

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Respuesta inmune a gangliósidos en un modelo experimental de neuropatía

Tesis de doctorado

Lic. Samanta Funes

2016

A Mariano y Olivia

Director: Dr. Gustavo Nores


Comisión de Tesis: Dra. Cristina Pistoresi

Dr. Gabriel Cuadra

Dr. Fernando Irazoqui

Evaluador externo: Dra. Graciela Cremaschi

AGRADECIMIENTOS



A las autoridades del Departamento de Química Biológica (FCQ - UNC) y del CIQUIBIC por permitirme realizar la tesis en sus instalaciones, así como al CONICET por el apoyo financiero.

A los miembros de la Comisión de Tesis: Dra. Cristina Pistoressi y Dr. Gabriel Cuadra por las sugerencias realizadas y la buena predisposición en todo momento. A la Dra. Graciela Cremaschi, quien en su rol de evaluadora externa brindó su tiempo al leer el manuscrito de tesis y se tomó la molestia de viajar desde Buenos Aires para estar presente este día.

A todos los profesores, becarios y profesores del CIQUIBIC que siempre han tenido la mejor predisposición para ayudar y generan un ambiente de trabajo agradable y distendido.

A mis amigas de laboratorio, “las hermanas y primas académicas” Euge, Romy Co, Viti, Yani, Romy Ce, Naty y Fran. Han sido mi familia cordobesa, me abrieron su corazón cuando llegué a esta ciudad y han sido mi sostén a lo largo de toda esta travesía. A Gastón, por todos sus consejos y continua predisposición. A Chari, no sólo por ser miembro de mi comisión de tesis sino por haber sido el “tío académico”.

A los amigos en la distancia Kary, Nico, Lau T, Mary, Pau, Ame, Stella, siempre presentes en todas las etapas de mi vida.

A Cecy, por ser amiga, consejera y hasta niñera.

A Lau L, amiga y confidente incondicional. Por tomarse el tiempo de corregir esta tesis y darme siempre el empujoncito necesario para seguir adelante.

A mis padres, hermana, abuelos/as, tíos/as, primos/as, por el apoyo, los consejos y sobretodo el amor.

A Mónica y Raúl, Lupe, Aril, Jose y Juani, mi segunda familia.

A Gus, “mi padre académico”, más que un director ha sido y siempre será para mí un segundo padre. No me olvido de “la Gringa”, gracias por todo el cariño.

A los conejos (¿por qué no?) quienes dieron su vida por la ciencia.

A Mariano y Oli, por soportar mis largas ausencias y frustraciones con paciencia y cariño. Por ser mis compañeros de aventuras, en esta etapa y todas las que están por venir.

A la vida, que siempre me regaló cosas bellas.

CONTENIDO



1. Índice General

CONTENIDO	2
1. Índice General	2
2. Índice de figuras	4
3. Índice de tablas	5
ABREVIATURAS/ACRÓNIMOS	6
SUMMARY	9
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	14
1. Aspectos generales	14
2. Neuropatías periféricas: Polineuropatías	17
3. Síndrome de Guillain-Barré	19
4. Patogénesis	25
4.a. La respuesta inmune en el sistema nervioso periférico	26
4.b. Inmunopatogénesis del SGB	28
4.c. Auto-anticuerpos asociados a la neuropatía	34
5. Anticuerpos anti-glicanos	38
6. Auto-tolerancia a GM1	43
7. Hipótesis de la “deriva del sitio de unión”	47
8. Modelos experimentales	53
9. Situación problema	59
OBJETIVOS	61
1. Objetivo General	61
2. Objetivos específicos	61
MATERIALES Y MÉTODOS	63
1. Glicolípidos	63

1.a. Glicolípidos para inmunización	63
1.b. Glicolípidos para TLC-I	63
2. Inmunización	64
3. Caracterización de anticuerpos.....	66
3.a. Cromatografía en placa fina Inmunotinción (TLC-I)	66
3.b. Revelado de placas con reactivo de orcinol	67
3.c. Ensayo de inmuno-absorción acoplado a enzima (ELISA)	67
3.d. Cálculo de los títulos de anticuerpos.....	68
3.e. Ensayo de inhibición por antígeno soluble (SABIA).....	69
3.f. Purificación de poblaciones de anticuerpos anti-gangliósidos	69
3.g. Afinidad relativa de anticuerpos IgM anti-gangliósidos	70
3.h. Detección de KLH con PNA mediante Western blot	70
4. Periodación de KLH	71
4.a. Ensayo de periodación.....	71
4.b. Ensayo de biotinilación-oxidación	72
RESULTADOS.....	74
1. Sueros pre-inmunes	74
2. Inmunización con KLH/gangliósidos	75
3. Inmunización con gangliósidos	78
4. Inmunización con BSA _m /BBG	80
5. Inmunización con KLH	83
5.a. Animales inmunizados con KLH	83
5.b. Respuesta inmune dirigida a KLH	85
5.c. Reactividad cruzada de anticuerpos	89
6. Evaluación de la función de KLH en el modelo experimental	92
7. Anticuerpos anti- gangliósidos y neuropatía	98
7.a. Concordancia anticuerpos anti-gangliósidos y signos clínicos	98
7.b. Anticuerpos IgM anti-GA1 de alta afinidad en suero pre-inmune	99
DISCUSIÓN	103
1. Primera parte	103

1.a. Modelo experimental	103
1.b. Función de KLH	108
1.c. KLH.....	108
1.d. BSA _m y KLH	114
2. Segunda parte	117
2.a. Factor de susceptibilidad a la neuropatía en el modelo experimental	117
2.b. Hipótesis de la deriva y factor de susceptibilidad	118
3. Conclusiones.....	121
4. Direcciones futuras	123
BIBLIOGRAFÍA	125
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS	141
Publicaciones.....	141
Presentación a congresos	141

2. Índice de figuras

<i>Figura 1. Estructura general de los glicoesfingolípidos.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 2. Series de glicoesfingolípidos.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 3. Representación esquemática de los gangliósidos.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 4. Clasificación de los subtipos de Guillain-Barré.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 5. Mimetismo molecular de gangliósidos y LOS de C. jejuni.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 6. Áreas del ataque inmune en el sistema nervioso periférico</i>	<i>29</i>
<i>Figura 7. Inmunopatología en AMAN y AIDP</i>	<i>31</i>
<i>Figura 8. Correcto funcionamiento de la auto-tolerancia.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 9. Modelos de CPK de oligosacáridos de GA1, GM1 y GD1b.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 10. Hipótesis integrada del origen de anticuerpos anti-GM1.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 11. Protocolos de inmunización</i>	<i>65</i>
<i>Figura 12. Reactividad de anticuerpos en sueros pre-inmune</i>	<i>74</i>
<i>Figura 13. Pesos de animales del Grupo KLH/BBG</i>	<i>75</i>
<i>Figura 14. Títulos de anticuerpos anti-GM1 IgM e IgG en el Grupo KLH/BBG.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 15. Reactividad de anticuerpos anti-gangliósidos en el Grupo KLH/BBG .</i>	<i>78</i>
<i>Figura 16. Pesos de los animales del Grupo BBG</i>	<i>79</i>
<i>Figura 17. Reactividad de anticuerpos anti-gangliósidos en el Grupo BBG.....</i>	<i>80</i>

<i>Figura 18. Pesos de los animales del Grupo BSAm/BBG</i>	<i>81</i>
<i>Figura 19. Título de anticuerpos anti-GM1 IgM e IgG en el Grupo BSAm/BBG ...</i>	<i>82</i>
<i>Figura 20. Reactividad de anticuerpos anti-gangliósidos en el Grupo BSAm/BBG</i>	<i>83</i>
<i>Figura 21. Pesos de los animales en el Grupo KLH</i>	<i>84</i>
<i>Figura 22. Reactividad de anticuerpos anti-gangliósidos en el Grupo KLH.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 23. Títulos de anticuerpos anti-KLH IgM e IgG.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 24. Anticuerpos anti-glicanos de KLH.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 25. Unión de PNA a KLH y KLH oxidada.....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 26. Control de pérdida de proteínas.....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 27. Unión de PNA a KLH y BSAm</i>	<i>89</i>
<i>Figura 28. SABIA con KLH soluble</i>	<i>89</i>
<i>Figura 29. Promedio del porcentaje de inhibición con KLH en la semana 4 post-inmunización.....</i>	<i>90</i>
<i>Figura 30. SABIA con KLH soluble en el Grupo KLH/BBG.....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 31. Pesos de los animales de los Grupos KLH+BBG y BSAm/BBG+KLH</i>	<i>94</i>
<i>Figura 32. Reactividad de anticuerpos anti-gangliósidos en el Grupo KLH+BBG.</i>	<i>95</i>
<i>Figura 33. Título de anticuerpos anti-GM1 IgM e IgG en el Grupo BSAm/BBG+KLH</i>	<i>96</i>
<i>Figura 34. Reactividad de anticuerpos anti-gangliósidos en el Grupo BSAm/BBG+KLH</i>	<i>97</i>
<i>Figura 35. Perfil de peso y reactividad anti-gangliósidos en el Grupo KLH/BBG .</i>	<i>98</i>
<i>Figura 36. Anticuerpos de alta afinidad en suero pre-inmune.....</i>	<i>100</i>
<i>Figura 37. Representación esquemática de la reactividad cruzada de anticuerpos con gangliósidos-KLH.....</i>	<i>113</i>
<i>Figura 38. Esquema general del desencadenamiento de la neuropatía.....</i>	<i>120</i>

3. Índice de tablas

<i>Tabla 1. Características clínicas de los dos principales subtipos de SGB</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 2. Severidad clínica y semana de aparición en el grupo KLH/BBG</i>	<i>76</i>
<i>Tabla 3. Comparación de parámetros en animales KLH/BBG.....</i>	<i>92</i>
<i>Tabla 4. Severidad clínica y semana de aparición en el grupo BSAm/BBG+KLH..</i>	<i>96</i>
<i>Tabla 5. Resumen de tratamientos</i>	<i>116</i>

ABREVIATURAS/ACRÓNIMOS

AFC: Adyuvante de Freund completo

AIDP: Polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda

AMAN: Neuropatía axonal motora aguda

AMSAN: Neuropatía axonal sensitivo-motora aguda

BAFF: Factor activador de células B

BBG: Gangliósidos de cerebro bovino

BCR: Receptor de células B

BMZ: Células B de la zona marginal

BSA: Albúmina de suero bovino

BSAm: Albúmina de suero bovino metilada

C. jejuni: *Campylobacter jejuni*

CIDP: Polineurorradiculopatía desmielinizante inflamatoria crónica

CMB: Citomegalovirus

CPA: Célula presentadoras de antígeno

DC: Células dendríticas

DTH: Reacción de hipersensibilidad de tipo retardada

EAN: Neuritis experimental autoinmune

ELISA: Ensayo de inmuno-absorción acoplado a enzima

Gal: Galactosa

GalCer: Galactosilceramida

GalNAc: N-acetil-Galactosamina

GlcCer: Glucosilceramida

GSC: Complejos de gangliósidos

GSL: Glicosfingolípidos

GA1: Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1`Cer

GD1a: Gal β 1-(NeuNAc α 2,3)3GalNAc β 1-(NeuNAc α 2,3) 4Gal β 1-4GlcC β 1-1`Cer

GD1b: Gal β 1-3GalNAc β 1-(NeuNAc α 2,8NeuNAc α 2,3)4Gal β 1-4GlcC β 1-1`Cer

GM1: Gal β 1-3GalNAc β 1-(NeuNAc α 2,3)4Gal β 1-4Glc β 1-1`Cer

GT1b: Gal β 1-(NeuNAc α 2,3)3GalNAc β 1-(NeuNAc α 2,8NeuNAc α 2,3)4Gal β 1-4GlcC β 1-1`Cer

HLA: Antígenos leucocitarios humanos

HRP: Peroxidasa de rábano

IgM: Inmunoglobulina M

IgG: Inmunoglobulina G

iN_{BH}s: Neutrófilos colaboradores de células B inducibles

IVIg: Inmunoglobulinas intravenosas

KLH: Hemocianina de lapa californiana

KLHox: Hemocianina de lapa californiana oxidada

KSCN: Tiocianato de potasio

LOS: Lipo-oligosacáridos

MAC: Complejo de ataque a la membrana

MFS: Síndrome de Miller-Fisher

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MR1: Genes relacionados con MHC 1

NAbs: Anticuerpos naturales

Nav: Canales de sodio dependientes de voltaje

NeuNAc: Ácido siálico

NOAbs: Anticuerpos de origen natural

PBS: Buffer fosfato salino

PM: Peso molecular

PNA: Lectina del maní

SABIA: Ensayo de inhibición con antígeno soluble

SGB: Síndrome de Guillain-Barré

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

TBS: Buffer salino Tris

TCR: Receptor de células T

TLC: Cromatografía en capa fina

TLR4: Receptor de tipo Toll

UA: Unidades arbitrarias

UFs: Unidades funcionales

VEB: Virus de Epstein Bar

SUMMARY

Gangliosides are abundant glycans in neural tissue. They have been proposed as one of the major antigenic targets in Guillain-Barré syndrome (SGB). Although the etiology of this autoimmune disease is unknown, it is believed that the immune response elaborated to a pathogen could cross-react with peripheral nerve gangliosides. Rabbits immunized with bovine brain gangliosides (BBG) and keyhole limpet hemocyanin (KLH) like carrier protein develops a neuropathy clinically similar to SGB. However the disease does not occur if methylated bovine serum albumin (BSAm) is used instead KLH.

In order to characterize the development of humoral immune response in this animal model, groups of animals were immunized with different immunogens. A group was immunized with KLH/BBG and another one with BSAm/BBG. To evaluate the carrier function of KLH in the experimental model also two other groups were immunized with an alternative immunization protocol (BSAm/BBG+KLH and KLH+BBG) in which KLH was administered in a separate emulsion. On the other hand, two control groups immunized only with gangliosides or only with KLH were also used. Clinical signs and the immune response generated (title, and isotype specificity of the anti- gangliosides antibodies) were evaluated in all groups.

All the animals immunized with KLH/BBG showed clinical signs of neuropathy and IgG antibodies were detected that recognize simple (GA1) and complex (GM1 and GD1b) structure gangliosides. These antibodies were partially blocked by pre-incubation with soluble KLH indicating cross-reactivity. The percentage of cross-reactivity with KLH was modified over time (change in antibodies specificity). The reduction in the percentage of cross-reactive antibodies generally coincides with the onset of clinical signs. No animals of the control groups got sick (KLH or BBG groups). Only in rabbits immunized with KLH was detected a slight reactivity of IgG isotype antibodies that recognize GA1, and was completely blocked by preincubation with soluble KLH. Using the peanut agglutinin (PNA) was confirmed in KLH, the existence of a determinant also present in GA1/GM1/GD1b (Gal β 1-3GalNAc). While the BSAm/BBG group did not get sick, when we also immunized this group with KLH separately (BSAm/BBG+KLH) the situation is reversed and neuropathy is generated. Nevertheless separately immunization with KLH and BBG (KLH+BBG) did not

produce clinical signs of disease. Finally among the animals that developed neuropathy, those with an early onset had a higher percentage of high affinity anti-GA1 antibodies at pre-immune serum compared with those with a late onset.

These results suggest that the presence of KLH in the immunization is required for development the disease. The antibodies begin recognizing the terminal sugars shared between KLH-gangliosides and then expand the identified region. Consequently it occur a change of antibodies specificity to gangliosides, accompanied by the onset of neuropathy. Although gangliosides do not possess the ability to generate an IgG isotype response, it may redirect the anti-GA1 response produced by KLH against gangliosides with more complex structures. Fine specificity and affinity of the anti-gangliosides antibodies are key in the onset of neuropathy, in fact a high percentage of anti-GA1 high affinity pre-immune antibodies was associated with early onset of the disease.

Two main conclusions are established. First, KLH would have two fundamental roles, carrier and specific immune stimulant. Second, the susceptibility factor to develop the neuropathy may be related to the affinity of anti-GA1 NOAbs present in the pre-immune serum. To our knowledge, this work is the first not only to describe in detail the immune response generated during the development of neuropathy in an experimental model but also to establish a possible host susceptibility factor.

RESUMEN

Los gangliósidos, glicanos propios abundantes en tejido neural, han sido propuestos como los principales blancos antigénicos en el Síndrome de Guillain-Barré (SGB). Aunque la etiología de esta enfermedad de tipo autoinmune es desconocida, se cree que la respuesta inmune elaborada hacia un patógeno, podría reaccionar en forma cruzada con gangliósidos de los nervios periféricos. Conejos inmunizados con una mezcla de gangliósidos de cerebro bovino (BBG) y hemocianina de lapa californiana (KLH por su sigla en inglés) como proteína *carrier*, desarrollan una neuropatía clínicamente similar al SGB. Sin embargo, la enfermedad no se produce si en lugar de utilizar KLH se emplea albúmina de suero bovino metilada (BSAm).

Con el objeto de caracterizar el desarrollo de la respuesta inmune humoral en este modelo animal, grupos de conejos fueron inmunizados con distintos inmunógenos. Un grupo fue inmunizado con KLH/BBG y otro con BSA_m/BBG. Con el objetivo de evaluar la función *carrier* de KLH en el modelo experimental, otros dos grupos fueron inmunizados en base a un protocolo alternativo de inmunización (BSAm/BBG+KLH y KLH+BBG), en el que KLH se administra en emulsiones separadas. Además, se utilizaron dos grupos controles inmunizando sólo con BBG o sólo con KLH. Se evaluaron tanto los signos clínicos como la respuesta inmune generada (título, isotipo y especificidad de los anticuerpos anti-gangliósidos).

Todos los animales inmunizados con KLH/BBG mostraron signos clínicos de neuropatía y se les detectaron inmunoglobulinas de isotipo G (IgG) que reconocen a gangliósidos de estructura simple (GA1) y compleja (GM1 y GD1b). Estos anticuerpos fueron parcialmente bloqueados por pre-incubación con KLH soluble indicando su reactividad cruzada. El porcentaje de reactividad cruzada con KLH se modificó a lo largo del tiempo (cambio de la especificidad de los anticuerpos). La reducción en el porcentaje de anticuerpos con reactividad cruzada coincide generalmente con el comienzo de los signos clínicos. Ningún animal de los grupos controles (Grupos BBG o KLH) se enfermó, y sólo en aquellos inmunizados con KLH se detectó una leve reactividad de anticuerpos de isotipo IgG que reconocen GA1 y que son totalmente bloqueados por preincubación con KLH soluble. Utilizando la lectina del maní (PNA) se corroboró en KLH la existencia de un determinante presente también en GA1/GM1/GD1b

(Gal β 1-3GalNAc). Si bien el grupo BSAm/BBG no enfermó, al inmunizar por separado también con KLH (BSAm/BBG+KLH) se revirtió esta situación y se generó la neuropatía. Sin embargo, la inmunización con BBG y KLH por separado (KLH+BBG) no produce signos clínicos de enfermedad. Finalmente, entre los animales que desarrollaron la neuropatía, aquellos que enfermaron tempranamente presentaron un mayor porcentaje de anticuerpos anti-GA1 de alta afinidad en suero pre-inmune, comparado con aquellos que enferman de forma tardía.

Estos resultados sugieren que, la presencia de KLH en la inmunización es requerida para generar la enfermedad. Los anticuerpos comenzarían reconociendo los azúcares terminales compartidos entre KLH y GA1 para luego expandir la región identificada. Como consecuencia, se produce un cambio de especificidad de los anticuerpos hacia los gangliósidos, acompañado del comienzo de la neuropatía. Si bien los gangliósidos no poseen la capacidad de generar una respuesta de isotipo IgG, podrían re-direccionar la respuesta anti-GA1 inducida por KLH hacia gangliósidos con estructuras más complejas. Tanto la especificidad fina, como la afinidad de los anticuerpos resultaría clave en el comienzo de la neuropatía, incluso un elevado porcentaje de anticuerpos anti-GA1 de alta afinidad en suero pre-inmune se asoció con el comienzo temprano de la misma.

Se establecen dos conclusiones principales. En primer lugar, KLH estaría cumpliendo el papel tanto de *carrier* como de inmuno-estimulador específico. En segundo lugar, el factor de susceptibilidad a desarrollar la neuropatía podría estar relacionado a la afinidad de los NOAbs anti-GA1 presentes en el suero pre-inmune. Según nuestro conocimiento, este trabajo es el primero no sólo en describir en detalle la respuesta inmune generada durante el desarrollo de la neuropatía en un modelo experimental, sino también en establecer un posible factor de susceptibilidad del huésped.

INTRODUCCIÓN

“Lo importante es no dejar de hacerse preguntas” Albert Einstein

INTRODUCCIÓN

1. Aspectos generales

Los glicosfingolípidos (GSL) son moléculas complejas compuestas por un mono u oligosacárido (porción hidrofílica) unido covalentemente a una ceramida (porción hidrofóbica), como se muestra en la Figura 1. En los animales superiores, la glucosa o la galactosa son los monosacáridos que se unen directamente a la ceramida, originando glucosilceramida (GlcCer) o galactosilceramida (GalCer). En el caso de la GlcCer, sucesivos monosacáridos pueden ser adicionados originando una serie de cadenas tipo que reciben nombres específicos.

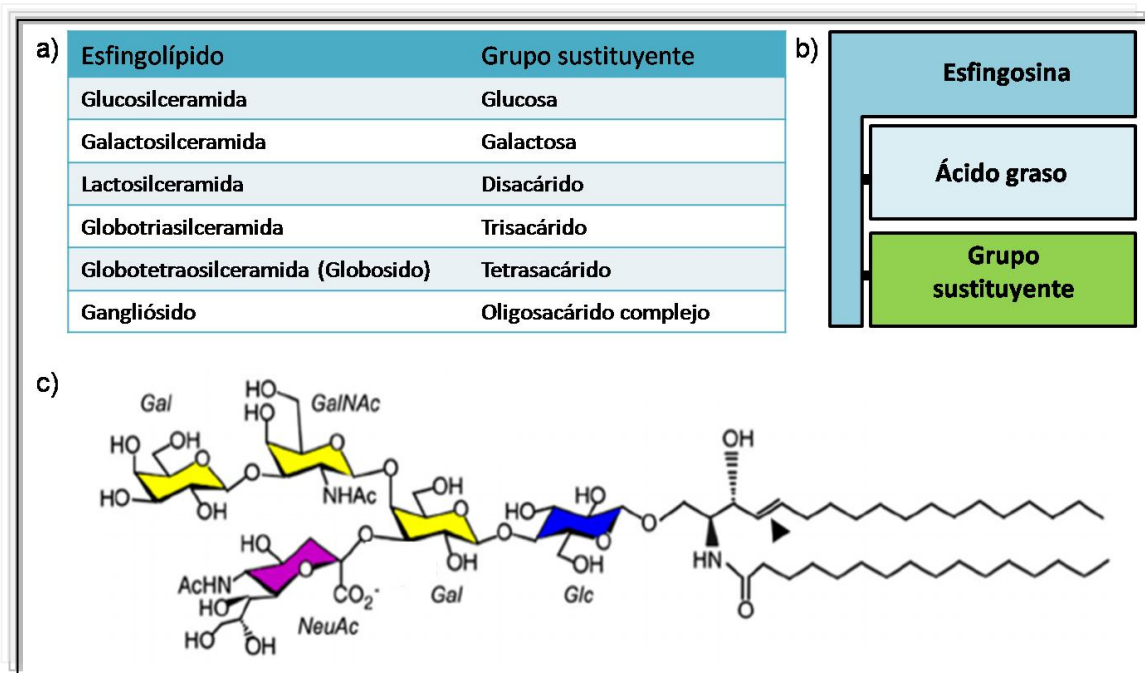


Figura 1. Estructura general de los glicosfingolípidos

Se esquematiza la estructura general de los glicosfingolípidos. a) Nomenclatura básica de GSL. b) Representación de la estructura de los GSL. c) Estructura del gangliósido GM1.

Existen grandes variaciones en el número y secuencia de la porción glucosídica, por lo que los GSL se agrupan en diferentes series de acuerdo a la porción interna de su oligosacárido. En los mamíferos, la mayoría de los GSL derivan de cuatro series: lacto, globo, ganglio y mucoserie (Figura 2).

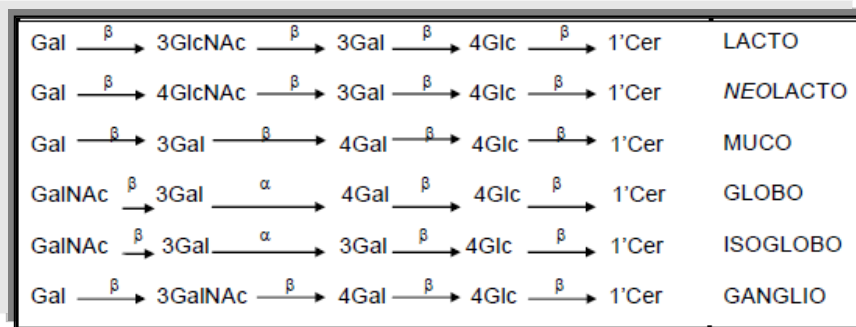


Figura 2. Series de glicoesfingolípidos

Los GSL pertenecen a distintas series en función de su cadena glucídica. Cuando el GSL presenta galactosa en lugar de glucosa unida a la ceramida se incluye dentro de la serie GALA.

Los GSL se hallan distribuidos en la mayoría de las células eucariotas respondiendo a un patrón específico de tipo celular. Se trata de moléculas anfipáticas que se encuentran ancladas en la hemicapa externa de la membrana plasmática, presentando las porciones glucídicas hacia el exterior (Khalili-Shirazi *et al.* 1997). Esta característica, sumada a la extensa variabilidad estructural de los dominios glucídicos llevó a considerarlos como moléculas de reconocimiento asociadas a eventos de comunicación celular (Saida *et al.* 1980). Los GSL han sido relacionados con procesos que involucran interacciones célula-célula, célula-sustrato y célula-mensajeros. Por otro lado, estas mismas características los convierten además en blancos de diversos factores patogénicos como virus, bacterias, toxinas y anticuerpos (Kojima y Hakomori 1989; Khalili-Shirazi *et al.* 1997; Tettamanti 2003; Aureli *et al.* 2015).

Los gangliósidos son un tipo de GSL que se caracteriza por poseer uno o más ácidos siálicos (NeuNac) en su estructura. La nomenclatura de los mismos, sugerida por Svennerholm en 1980, es la más utilizada en la actualidad y emplea

tanto el número de residuos de carbohidratos, como el patrón de sialilación de la molécula. Se utiliza en primer lugar, la letra G que se refiere a “gangliósido”, luego la letra M, D, T o Q indica si la molécula es mono, di, tri o tetra sialilado. El subíndice numérico asignado indicaba, en un primer momento, el orden de migración en un cierto sistema cromatográfico (Svennerholm 1980; Svennerholm 1993). A pesar de la subsecuente introducción de un sistema oficial más sistematizado (IUPAC-IUB 1998), hoy en día se continúa utilizando el sistema de Svennerholm (Figura 3).

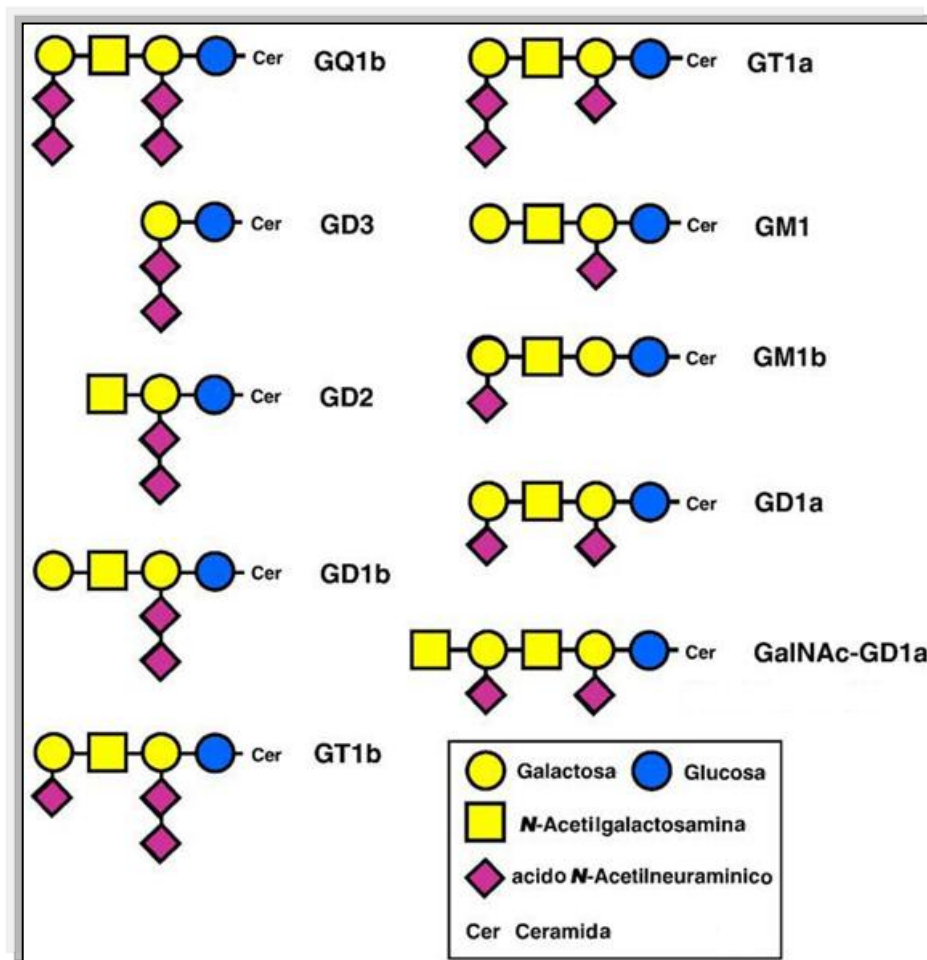


Figura 3. Representación esquemática de los gangliósidos

En la imagen se observan las referencias de cada símbolo (Yuki 2009)

Si bien los gangliósidos son componentes ubicuos de las membranas celulares de todos los vertebrados, son especialmente abundantes en tejido neural. Constituyen el 10-12% del contenido lipídico total de las membranas

neuronales (aunque la principal localización es en membrana externa, también se encuentra en estructuras sub-celulares como organelas, vesículas y otras estructuras de transporte) (Tettamanti 2003). En tejido nervioso periférico se ha observado además una heterogeneidad en los patrones de expresión de gangliósidos (Aureli *et al.* 2015). De esta forma, GM1 y GD1a se expresan predominantemente en axones de nervios motores (Ogawa-Goto *et al.* 1992), GQ1b en nervios craneales (Chiba *et al.* 1997) y GD1b en nervios sensoriales (Gong *et al.* 2002). Además, han sido localizados en plataformas de señalización especializadas dentro de la membrana celular y se ha observado que modulan el flujo de calcio, tanto en neuronas como en otras células (Ledeen y Wu 2002). Por estos motivos, se piensa que contribuyen a las funciones celulares básicas de transducción de señales.

Por otro lado, su enriquecimiento en tejido neural llevó a asociar a estos GSL con el funcionamiento del sistema nervioso (Ho *et al.* 1997a; Sheikh *et al.* 1998) y consecuentemente con trastornos neurológicos de origen metabólico (enfermedad de Tay-Sachs) y enfermedades neurodegenerativas (Sandhoff y Harzer 2013; Ariga 2014; Aureli *et al.* 2015). Adicionalmente, en diversas neuropatías de origen autoinmune, los gangliósidos han sido implicados adoptando el rol de antígenos (auto-antígenos) (Ilyas *et al.* 1988; Gallardo *et al.* 2001; Ariga 2014).

2. Neuropatías periféricas: Polineuropatías

Las neuropatías han sido clasificadas en tres grandes grupos: mononeuropatías, mononeuropatías múltiples y polineuropatías, en base a si se ven afectados un único nervio, múltiples únicos nervios o múltiples nervios respectivamente (Donofrio 2012).

Las polineuropatías son un grupo de desórdenes de nervios periféricos caracterizados por presentar un proceso simétrico y diseminado, habitualmente distal y gradual. Este proceso puede exhibir pérdida sensitiva, debilidad muscular o una combinación de ambas (Castañeda Fernández y del Corral García 2003).

La clasificación de las polineuropatías ha resultado bastante compleja debido a la amplia variedad existente en lo que respecta al tiempo de evolución, severidad y características de los síntomas. Por otro lado, la complejidad continúa incrementándose a medida que se identifican nuevos subgrupos y nuevas asociaciones.

En base al tiempo de evolución, las polineuropatías pueden ser agudas, subagudas o crónicas. Teniendo en cuenta la naturaleza de la lesión nerviosa se clasifican en axonales, desmielinizantes o mixtas. De acuerdo a las fibras afectadas, las polineuropatías pueden ser sensitivas, motoras o ambas. Finalmente, teniendo en cuenta las causas, pueden ser genéticas, traumáticas, isquémicas, tóxicas, inflamatorias, metabólicas o autoinmunes. Esta última categoría en la clasificación genera amplios debates por la existencia aún de aspectos no esclarecidos en la fisiopatología y origen (Castañeda Fernández y del Corral García 2003).

Las polineuropatías autoinmunes pueden ser iniciadas por un amplio rango de eventos inmunopatológicos, sin embargo con fines prácticos, se clasifican principalmente en neuropatías autoinmunes crónicas (Polineurorradiculopatía Desmielinizante Inflamatoria Crónica o CIDP) y agudas (Síndrome de Guillain-Barré o SGB) (Bourque *et al.* 2015).

3. Síndrome de Guillain-Barré

En 1916, Guillain, Barré y Strohl describieron por primera vez un síndrome que involucraba parálisis flácida simétrica y arreflexia¹ (Guillain *et al.* 1916). En la actualidad, debido a la erradicación de la poliomielitis, el denominado Síndrome de Guillain-Barré, es considerado la causa más frecuente de parálisis flácida aguda en el mundo. Se ha establecido una frecuencia de aparición en los países occidentales de 1,11 cada 100000 personas por año con mayor incidencia en adultos (Yuki y Hartung 2012; Winer 2014).

El Síndrome de Guillain-Barré (SGB) no se considera una única entidad, sino que se define como un conjunto de polineuropatías agudas severas. La clasificación de los subtipos se basa principalmente en el tipo de fibra afectada y la naturaleza del daño que ésta sufre (desmielinización o degeneración axonal).

Se ha detectado la existencia de una notable diferencia de distribución geográfica para cada subtipo de SGB. En occidente (Europa y América del Norte), la variante desmielinizante constituye el 90% de los casos de SGB, mientras que en China, Japón y México la variante axonal tiene la frecuencia más elevada, alrededor del 60% (Yuki y Hartung 2012; van den Berg *et al.* 2014).

El cuadro clínico de la neuropatía se presenta como una parálisis motora simétrica, arrefléctica, ascendente y de rápida evolución (horas-pocos días), frecuentemente acompañada de disestesia² y prurito. Se trata de una enfermedad monofásica, en donde la debilidad alcanza el grado máximo de severidad alrededor de las 4 semanas, seguida por una fase de *plateau* (entre 2

¹ Ausencia total de reflejos neurológicos, ya sea centrales o periféricos.

² Trastorno de la sensibilidad que puede corresponder a una disminución, a una exageración o a la suscitación de una sensación desagradable por parte de un estímulo normal.

días y 6 meses) para luego comenzar con la fase de recuperación. La mayoría de los pacientes requiere hospitalización y alrededor del 25%-30% puede llegar a requerir ventilación mecánica. La debilidad simétrica se presenta en los músculos proximales y distales de las extremidades, principalmente las inferiores, y al progresar puede llegar a conducir a la muerte por fallo respiratorio (Yuki y Hartung 2012; van den Berg *et al.* 2014; Bourque *et al.* 2015).

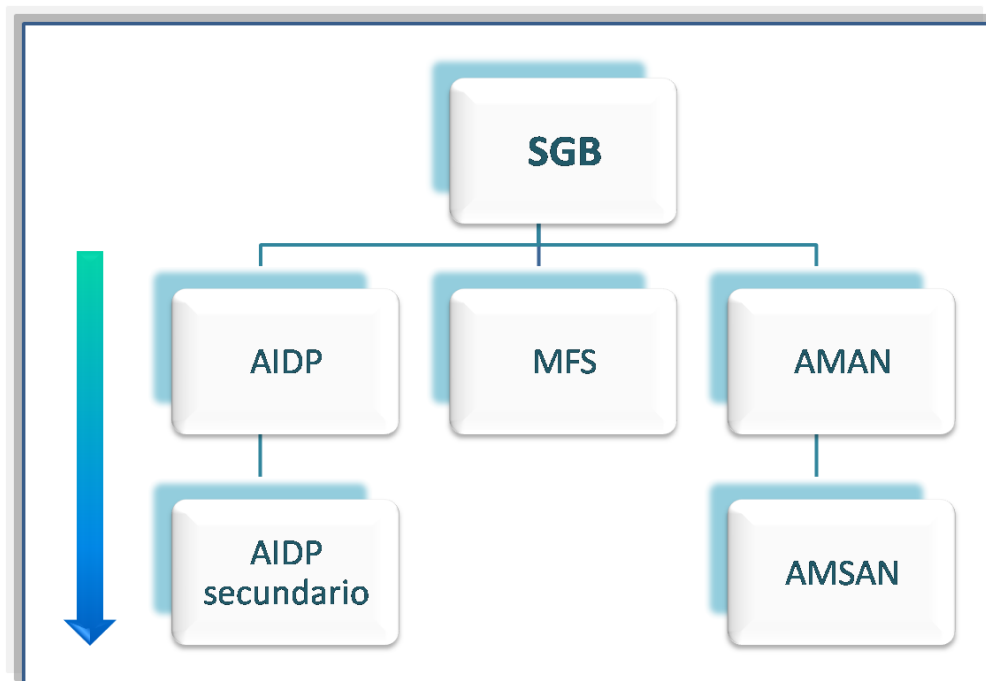


Figura 4. Clasificación de los subtipos de Guillain-Barré

Clasificación fisiológica y patológica tentativa. La flecha indica el incremento de la severidad del ataque inmune (Griffin *et al.* 1996).

Como se muestra en la Figura 4, se han descrito cuatro subtipos de Guillain-Barré, en base a lo detallado anteriormente (Ho *et al.* 1998; Uncini *et al.* 2013; van den Berg *et al.* 2014; Bourque *et al.* 2015):

Polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda o AIDP (*Acute Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy*): Es una forma sensitivo-motora del SGB y se considera el subtipo más frecuente encontrado en el mundo occidental (90% de los casos). Se caracteriza por la destrucción de las

células de Schwann, daño en la mielina, activación de macrófagos y linfocitos. En general es de rápida recuperación, a excepción de los casos severos en donde se ha observado daño axonal secundario.

Neuropatía axonal motora aguda o AMAN (*Acute Motor Axonal Neuropathy*):

Es una variante puramente motora del SGB. El daño es principalmente axonal, con destrucción de los nodos de Ranvier de las fibras motoras. Este subtipo progresa más rápidamente que el AIDP y presenta un cuadro de recuperación prolongada, aunque existen casos de rápida recuperación.

Neuropatía axonal sensitivo-motora aguda o AMSAN (*Acute Motor and Sensory Axonal Neurophy*):

Se considera una forma más severa del AMAN, en la que tanto las fibras sensitivas como motoras se encuentran afectadas. El mecanismo desencadenante es similar al de AMAN, pero las neuronas sensitivas y las raíces nerviosas también son afectadas. Presenta una lenta recuperación y a menudo incompleta.

Síndrome de Miller Fisher o MFS (*Miller Fisher syndrome*):

Es un subtipo poco común de SGB que se caracteriza por ataxia, oftalmoplejia³ y arreflexia. Presenta una modalidad desmielinizante similar al AIDP. Usualmente los pacientes presentan una buena evolución clínica, pero en algunos casos pueden desarrollar debilidad en sus miembros e insuficiencia respiratoria (Síndrome de superposición MFS-SGB) (Urushitani *et al.* 1995).

Actualmente, la velocidad de recuperación puede ser acelerada mediante administración de inmunoglobulinas intravenosas (IVIg) en altas dosis, plasmaféresis⁴, kinesioterapia y en algunos casos administración de corticoides.

³ Trastorno del sistema oculomotor que produce la incapacidad para mover voluntariamente el globo ocular. Parálisis de uno o más músculos oculares.

⁴ Método mediante el cual se extrae completamente la sangre del cuerpo y se procesa de forma que las células se separen del plasma. Las células de la sangre se devuelven luego al paciente sin el plasma, el cual el organismo sustituye rápidamente.

El pronóstico de recuperación varía entre semanas y meses en el 85% de los casos, aunque en algunos puede persistir la arreflexia. La mortalidad se considera de entre un 5% y 10%, produciéndose en general como consecuencia del compromiso pulmonar (el subgrupo AMSAN suele presentar el peor pronóstico) (Ho *et al.* 1998; Yuki y Hartung 2012).

Si bien las causas de la enfermedad son desconocidas, se considera una enfermedad post-infecciosa, ya que epidemiológicamente, en un elevado porcentaje de los casos, una infección gastrointestinal o respiratoria ligera precede a los síntomas neurológicos en 7-10 días. También se han descrito otros antecedentes como procesos quirúrgicos o inmunizaciones (vacunas antivirales). Aunque, al respecto, también se ha reportado un efecto “protector” de la vacunación contra la influenza en el riesgo de contraer SGB. Se cree que este efecto podría estar relacionado a la protección contra la gripe o una menor probabilidad de que individuos con una infección reciente sean vacunados (Tam *et al.* 2007; van den Berg *et al.* 2014). De todas formas, *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), el virus de Epstein Bar (VEB) y el Citomegalovirus (CMB) se consideran los antecedentes infecciosos más frecuentes asociados al SGB, si aunque algunos reportes también lo asocian con el *Mycoplasma pneumoniae*, el virus de la influenza, la varicela y el Zika (Willison y Yuki 2002; Yuki 2007b; Yuki y Hartung 2012; Cao-Lormeau *et al.* 2016; Phongsisay 2016).

El mimetismo molecular⁵, ha sido propuesto como uno de los mecanismos patogénicos de esta neuropatía (Yuki 2007b). Esta hipótesis se sustenta principalmente en dos puntos. Por un lado, se detecta la reacción cruzada de los anticuerpos generados por la infección bacteriana con auto-

⁵ Similitud en los determinantes antigénicos de dos moléculas concretas. Puede ocurrir que un microorganismo presente similitud con una molécula de un hospedador inmunocompetente. En tal caso, la respuesta inmune generada contra el microorganismo reaccionarían con la molécula del hospedador, originándole una enfermedad autoinmune.

antígenos (gangliósidos). Por otro lado, se ha identificado en lipo-oligosacáridos (LOS) un tetrasacárido terminal igual al encontrado en el gangliósido GM1 (Figura 5) (Yuki 2007b). Sin embargo, estrictamente el concepto de mimetismo molecular no podría aplicarse en este caso, debido a que la estructura reconocida por los anticuerpos es exactamente la misma en ambas moléculas.

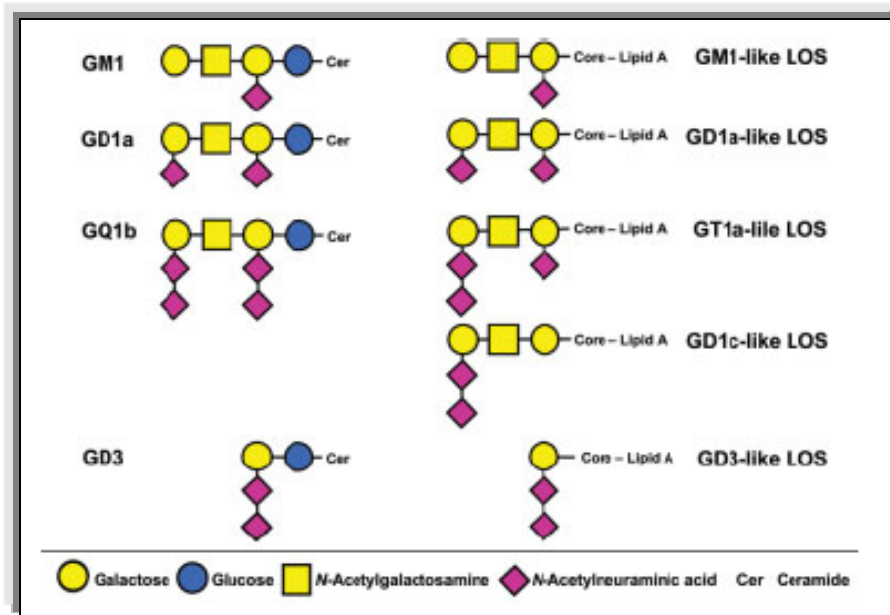


Figura 5. Mimetismo molecular de gangliósidos y LOS de *C. jejuni*

Se esquematizan por un lado los tetrasacáridos terminales de gangliósidos (izquierda) y por el otro (derecha) LOS símil gangliósidos presentes en *C. jejuni* aislados de pacientes con SGB (Yuki 2007b).

La síntesis de aquellos LOS similares a gangliósidos identificados en un subgrupo de cepas de *C. jejuni*, depende de un conjunto de genes polimórficos que varían enormemente entre cepas (van Belkum *et al.* 2001; Gilbert *et al.* 2002; Yuki 2007b). Los humanos se encuentran frecuentemente expuestos a cepas que exhiben esta estructura y sin embargo, sólo un individuo de cada 1000-5000 pacientes que sufren enteritis causada por *C. jejuni* desarrollará SGB en los dos meses subsiguientes (Nachamkin *et al.* 1999; McCarthy y Giesecke 2001; van den Berg *et al.* 2014). Por otro lado, en pacientes que han recibido tratamiento parenteral con gangliósidos, se observa que sólo un pequeño

número de ellos desarrolla SGB (Illa *et al.* 1995; Govoni *et al.* 2003). Curiosamente se ha observado una tasa de recurrencia elevada (5%-6%) (Kuitwaard *et al.* 2009) y la existencia de casos de SGB familiares (Ang *et al.* 2000).

La suma de estos hechos, resalta la existencia de un factor intrínseco en cada individuo que le brinda una susceptibilidad o predisposición a desarrollar la condición (Sheikh *et al.* 1998; Nachamkin *et al.* 1999; Rinaldi 2013). Sin embargo, aún no ha sido identificado un claro factor genético de riesgo. Se han intentado establecer factores inmuno-genéticos comunes en los pacientes que desarrollaron SGB, sin embargo, en su gran mayoría los resultados han sido negativos o heterogéneos para el antígeno linfocitario humano (HLA), el receptor de células T (TCR), polimorfismo de CD14, CD1 y TLR4 (Ma *et al.* 1998; Geleijns *et al.* 2004; Wu *et al.* 2012).

Según la bibliografía, hasta la fecha sólo se han detectado dos asociaciones entre el SGB y polimorfismos. Por un lado, se halló una asociación moderada con un polimorfismo en el gen de TNF- α (Wu *et al.* 2012), aunque dicha asociación sólo se observa para los subtipos AMAN y AMSAN en la población china (Jiao *et al.* 2012). Por otro lado, se detectó una asociación entre el polimorfismo del gen MBL2 (lectina de unión a manosa) y la severidad y el comienzo del SGB (Geleijns *et al.* 2006). Estas predisposiciones genéticas no estarían relacionadas al origen de los auto-anticuerpos, sino más bien al proceso desencadenado luego de la instauración de la respuesta inmune.

Como se señaló anteriormente, la naturaleza de la respuesta inmune está gobernada tanto por factores del huésped como del patógeno, recientemente se ha sugerido que la patogénesis es altamente dependiente de la microbiota intestinal del huésped y el sistema inmune innato (Bereswill *et al.* 2011; Willison y Goodyear 2013). En el ambiente correcto, la patogenicidad de *C. jejuni* induce a las células epiteliales a liberar varios factores (CXCL20, IL-8) que reclutan

células dendríticas, macrófagos y neutrófilos (respuesta predominantemente Th1⁶) (Young *et al.* 2007). Se ha sugerido que en la fase progresiva del SGB la respuesta predominante es Th1 mientras que en la fase de recuperación, la respuesta cambia hacia Th2⁷ (Nyati *et al.* 2011).

4. Patogénesis

Establecer un mecanismo inmunopatológico conjunto, o en base a la integración de los conocimientos de la fisiopatología del SGB, ha resultado complejo. Uno de los principales factores implicados, es la presencia de al menos dos patologías que conducen al diagnóstico clínico de SGB (una neuropatía desmielinizante y otra axonal). Sin mencionar que no siempre resulta posible separar estos subtipos utilizando estándares clínicos y ensayos electrofisiológicos. Otro de los factores involucrados fueron las dificultades de establecer un modelo animal reproducible (Rinaldi 2013).

La importancia de la respuesta inmune humoral y celular en el proceso de iniciación de la enfermedad ha sido motivo de discusión. Se cree en la actualidad, que AMAN es una enfermedad conducida por anticuerpos mientras que en AIDP se encuentra involucrada principalmente una respuesta inmune celular (Hughes y Cornblath 2005).

⁶ Clasificación de linfocitos en base al patrón de citoquinas producidas (IL-2, IFN- γ , TNF- α). Colaboran en la activación de macrófagos. Promueve la inmunidad celular.

⁷ Clasificación de linfocitos en base al patrón de citoquinas producidas (IL-4, IL-10). Colaboran en la activación de linfocitos B y son importantes en las reacciones alérgicas y en la defensa frente a parásitos.

4.a. La respuesta inmune en el sistema nervioso periférico

El sistema nervioso periférico (SNP) se encuentra relativamente aislado de la circulación sistémica debido a la presencia de la barrera hematoneural⁸, por lo que sólo pequeñas cantidades de proteínas circulantes pueden ingresar al espacio endoneural (Ho *et al.* 1998).

La presencia de la barrera hematoneural ha llevado tradicionalmente a considerar al SNP como “inmunológicamente privilegiado”. Este concepto ha sufrido revisión en los últimos años, debido no sólo a que diversos linfocitos pueden circular dentro y fuera del SNP sino que el mismo contiene numerosas células inmunes residentes (macrófagos, mastocitos y algunos linfocitos) (Kiefer *et al.* 2001). La relativa permeabilidad que posee la barrera hematoneural hace al SNP más susceptible que el sistema nervioso central (SNC) en lo que se refiere a desordenes mediados por anticuerpos (Ho *et al.* 1998).

La barrera hematoneural puede volverse accesible a la respuesta inmune humoral y celular bajo diversas condiciones, permitiendo el encuentro con los denominados “antígenos protegidos” (Köller *et al.* 2005; Bourque *et al.* 2015). Por ejemplo, durante una inflamación los macrófagos residentes, mastocitos y células de Schwann liberan citoquinas que inducen la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales. Una vez que los leucocitos atraviesan la membrana hematoneural, al menos cuatro mecanismos autoinmunes han sido involucrados en la disfunción y daño del SNP:

- 1- Lisis mediada por células T citotóxicas: La activación de las células T CD4+ puede conducir a dos tipos de respuestas. Una humoral u otra celular (Th1). Las células Th1 producen la activación de células T CD8+

⁸ Barrera entre los nervios periféricos y el endotelio vascular. Actúa como barrera de difusión, pero la permeabilidad a los iones es aún mayor que en la barrera hematoencefálica.

(citotóxicas) y macrófagos. Las células T CD8+ reconocen a un antígeno en el contexto de MHC clase I y pueden producir perforinas que dañan a la célula diana.

2- Ataque del complemento mediado por anticuerpos: En la respuesta de tipo Th2 las células TCD4+ reconocen el antígeno presentado por las células B en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II y las activan. Las citoquinas liberadas estimulan a las células B a diferenciarse a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Éstas últimas producen preferencialmente IgG1 e IgG3 fijadores de complemento. La activación de complemento produce un complejo de ataque a la membrana, lo que puede conducir a la entrada de calcio y la activación de enzimas sensibles al mismo. Esto conduce a la desmielinización y degeneración Walleriana⁹.

3- Daño de las membranas debido a citoquinas y radicales libres producidos por células inflamatorias: Los compuestos reactivos derivados de oxígeno, liberados por los macrófagos pueden contribuir al daño de la mielina, sumado a que las citoquinas como TNF α pueden producir necrosis.

4- Disrupción de la función del sistema nervioso mediado por anticuerpos: La unión de anticuerpos a dianas específicos puede conducir a la interrupción de su función y causar disfunción neurológica, como en el síndrome miasténico de Lambert-Eaton.

Existe evidencia de que diferencias sutiles en el organismo infeccioso pueden influenciar profundamente la generación de la respuesta inmune. Por

⁹ Degeneración nerviosa causada por la separación del centro trófico de una fibra nerviosa. Se produce una fragmentación del axón y de la vaina de mielina. La parte del axón separada del cuerpo celular de la neurona degenera.

ejemplo, los LOS conteniendo ácido siálico incrementan significativamente la activación de las células dendríticas, en comparación con aquellos no sialilados (Kuijf *et al.* 2010). Se ha observado que la sialilación incrementa la producción de IL-6 y IL-10 por macrófagos y células dendríticas *in vitro* y la producción de IFN- α y IFN- β *in vivo*, lo cual podría polarizar la respuesta inmune (potenciar la activación del receptor de células B (BCR), la producción de inmunoglobulinas y el cambio de isotipo) (Huizinga *et al.* 2012).

Además, el grado de sialilación de los LOS (mono- o di-sialilados) es capaz de influenciar intensamente la respuesta inmune. La infección de *C. jejuni* con actividad de α -2,3-monosialiltransferasa es más probable que resulte en la producción de anticuerpos dirigidos contra GM1 y GD1a induciendo AMAN. Mientras que *C. jejuni* con actividad α -2,3- y α -2,8-monosialiltransferasa produce anticuerpos anti GQ1b dando lugar a MFS (Koga *et al.* 2005; Yuki 2007a). Adicionalmente, los LOS monosialilados favorecen la respuesta de tipo Th2, promoviendo la inmunidad contra patógenos extracelulares y el cambio de clase en las células B. Mientras que los LOS disialilados incrementan la producción de IFN γ conduciendo a una respuesta Th1 celular (Bax *et al.* 2011).

La activación del receptor TLR4 por LOS bacterianos induce una potente respuesta inflamatoria. Se cree que esta interacción podría desempeñar un importante papel en la maduración de la respuesta humoral dirigida hacia los epítopes sialilados de LOS (Willison y Goodyear 2013).

4.b. Inmunopatogénesis del SGB

Estudios inmunológicos sugieren que la estructura diana del ataque difiere dependiendo del subtipo de SGB. De forma simplificada, en AIDP el ataque parece estar dirigido contra un componente de las células de Schwann

mientras que en AMAN, la diana parece ser el axolema y los nodos de Ranvier como se representa en la Figura 6 (Griffin *et al.* 1996; Willison 2005; Yuki 2007b).

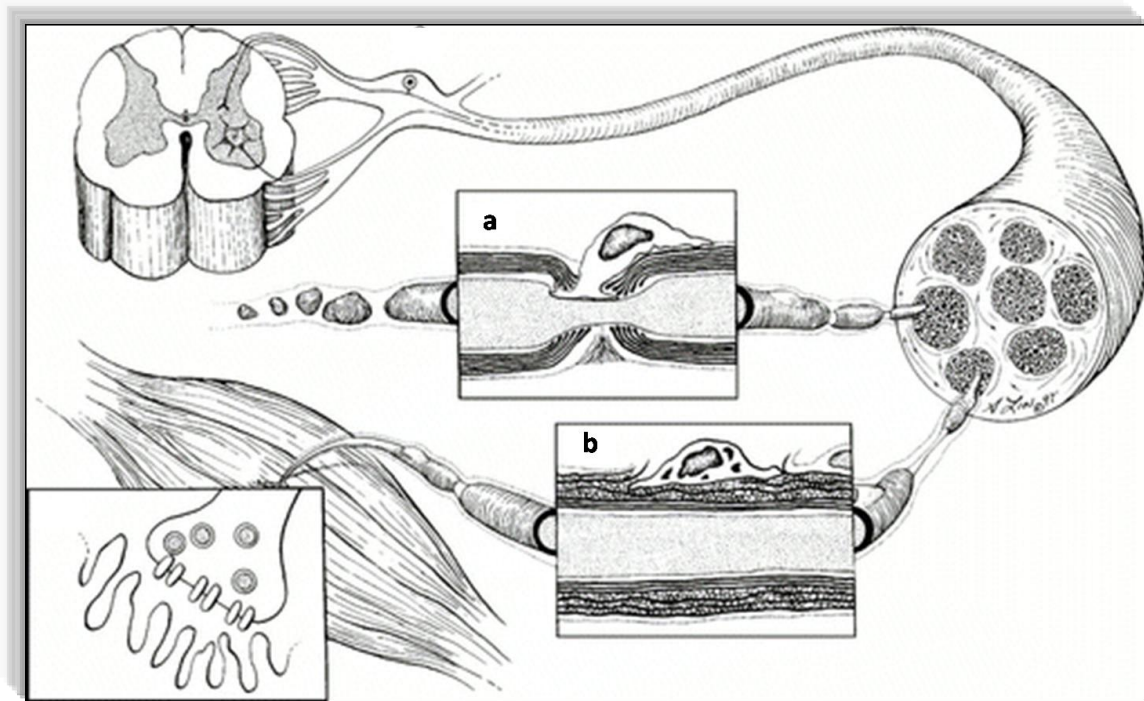


Figura 6. Áreas del ataque inmune en el sistema nervioso periférico

a) Nodos de Ranvier: Los anticuerpos anti-GM1 se concentran en el nodo seguido por el ataque de los macrófagos (AMAN). **b)** Mielina de la célula de Schwann: Los anticuerpos atacan la mielina seguida por activación del complemento y eliminación de la misma mediada por macrófagos (AIDP). Imagen adaptada de Ho *et al.* (Ho *et al.* 1998)

Aunque la respuesta auto-inmune generada en los distintos subtipos del SGB tiene el potencial de reaccionar con los gangliósidos de todas las membranas, el daño generado se restringe a las membranas de los nervios periféricos. Se cree que esta interacción específica está asociada a diversos factores, entre ellos la alta densidad antigénica combinada con una baja tasa de recambio y la relativa escasez de inhibidores del complemento en las membranas neurales. Estos factores sumados conducen a una extrema vulnerabilidad de la homeostasis neurofisiológica al daño mediado por anticuerpos y complemento (Fewou *et al.* 2012; Cunningham *et al.* 2016). La

extensión del daño puede depender de la especificidad de los anticuerpos, la integridad de la barrera hematoneural y los reguladores locales de la activación del complemento (Willison 2005).

Por otro lado, si bien, los anticuerpos anti-gangliósidos potencialmente podrían unirse a cualquier membrana que contenga gangliósidos, el acceso y la unión de los mismos están sujetos a impedimentos estéricos locales. Uno de los principales sitios de fácil acceso para los anticuerpos circulantes es el componente pre-sináptico de la unión neuromuscular el cual no sólo es rico en gangliósidos sino que también se encuentra fuera de la barrera hematoneural (Willison 2005).

AMAN

En AMAN, se ha observado en primer lugar una escasa o nula infiltración linfocitaria. En segundo lugar, los anticuerpos se depositan en los nodos y activan el complemento, por lo que el producto final de la activación del complemento se forma en el axolema nodal (Susuki *et al.* 2007; Susuki *et al.* 2012). Las agrupaciones de canales de sodio desaparecen cuando el complemento se deposita y el nodo comienza a exponer sus regiones paranodales (Figura 7). El ataque autoinmune causa la desaparición de las moléculas de adhesión en el paranodo, altera las uniones axogliales y desprende los bucles de la mielina terminal paranodal (Susuki *et al.* 2007; Kuwabara y Yuki 2013). Este efecto imita a la desmielinización paranodal, sin embargo la patología primaria se encuentra en el axón. Los macrófagos son reclutados e invaden los nodos de Ranvier insertándose entre el axón y la célula de Schwann que rodea al axolema, dejando la mielina intacta (Hafer-Macko *et al.* 1996b). El daño axonal inicialmente afecta al nodo y luego a la región paranodal, teniendo efectos substanciales en la conducción nerviosa (bloqueo).

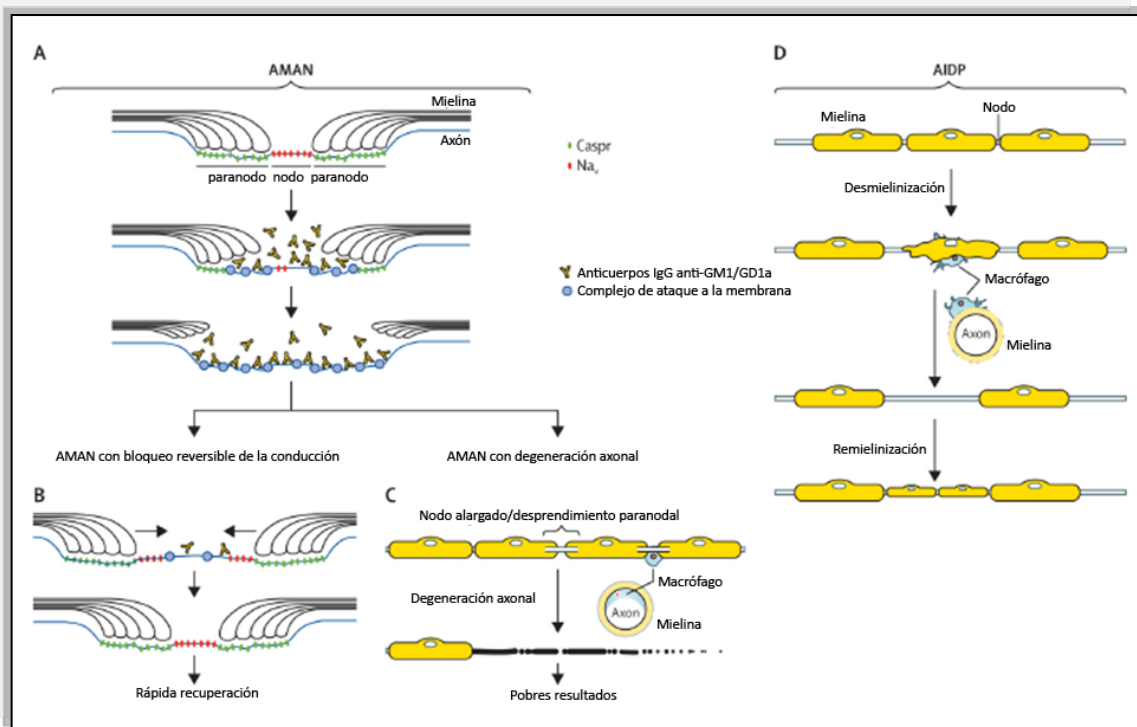


Figura 7. Inmunopatología en AMAN y AIDP

A) En un primer momento los anticuerpos IgG se depositan en el nodo donde ocurre el ataque autoinmune para luego extenderse a los paranodos. Las agrupaciones nodales de canales de sodio dependientes de voltaje (Nav) y las proteínas asociadas a contactina paranodal se destruyen. **B)** La rápida reparación de los nodos alterados (falta de conducción reversible) se asocia con la pronta recuperación, mientras que **(C)** la progresión del AMAN típico con degeneración axonal se asocia a malas recuperaciones. **D)** En AIDP se observa desmielinización segmentada y remielinización. Los macrófagos invaden la superficie externa de la vaina de mielina (Kuwabara y Yuki 2013).

La intrusión de los macrófagos probablemente abra el espacio periaxonal a los constituyentes endoneurales permitiendo la entrada de los anticuerpos y complemento hacia la región internodal. Algunos cambios estructurales nodales o paranodales son reversibles, resolviéndose el bloqueo de la conducción (Kuwabara y Yuki 2013). Sin embargo, en caso de un ataque severo, puede existir degeneración axonal, lo cual explica el retardo en la recuperación y la evolución deficiente que se observa ocasionalmente en pacientes con AMAN (Figura 7) (Kuwabara y Yuki 2013). Por otro lado, dependiendo del sitio de la transección (proximal o distal) la recuperación puede ser buena o mala debido a la distancia sobre la cual la regeneración resulta efectiva (Ho *et al.* 1997a; Ho *et*

al. 1997b; Kuwabara *et al.* 2003). Sin embargo, los pacientes con AMAN usualmente alcanzan rápidamente el pico de la enfermedad y se recuperan antes que aquellos con AIDP (Hiraga *et al.* 2003; Hughes y Cornblath 2005). Esto puede deberse a que en AMAN el proceso patológico bloquea la conducción pero no corta al axón, o tal vez porque no ocurre ninguna degeneración muy distal (Hiraga *et al.* 2003; Hughes y Cornblath 2005). El proceso inflamatorio ocurre principalmente en las raíces nerviosas o en los terminales nerviosos distales (Hafer-Macko *et al.* 1996a; Ho *et al.* 1997a).

AMSAN

En AMSAN la patología hallada es muy similar a lo observado en AMAN, con el mismo patrón de invasión de macrófagos. Sin embargo, las raíces dorsales y ventrales se ven afectadas. Por otro lado, se observa una escasa inflamación linfocitaria consistente con una patogénesis mediada por anticuerpos (Griffin *et al.* 1996; Hughes y Cornblath 2005).

AIDP

El subtipo AIDP por otro lado, se caracteriza patológicamente por la desmielinización, tanto de los nervios motores como los sensitivos y un grado variable de infiltración de linfocitos (Asbury *et al.* 1969; Prineas 1981; Hafer-Macko *et al.* 1996b). Existen dos hipótesis acerca de los mecanismos patogénicos involucrados. En la primera, los macrófagos activados se dirigen hacia la superficie de las células de Schwann o la vaina de mielina debido a la activación de linfocitos T. La invasión inicial de la membrana basal de las células de Schwann sería consecuencia de la liberación de radicales de óxido nítrico y otros mediadores por parte de los macrófagos (Kieseier *et al.* 2004). La hipótesis alternativa (no mutuamente excluyente) plantea que el evento inicial es la unión de auto-anticuerpos a la superficie de la célula de Schwann. De esta forma la fijación de complemento, el daño celular y la disolución vesicular de la mielina serían acontecimientos que preceden a la invasión celular. Esta teoría se

encuentra sustentada, adicionalmente, por material obtenido en autopsias de estadios tempranos de la enfermedad (Hafer-Macko *et al.* 1996b).

Clínicamente el proceso de desmielinización es generalizado, afectando a la mayoría de las extremidades mielinizadas (nervios motores y sensitivos) pero curiosamente no afecta a los axones mielinizados que inervan los músculos extraoculares afectados en el subtipo MFS (Willison 2005). La desmielinización puede ser extensiva a lo largo de los nervios, especialmente en las raíces nerviosas proximales y los segmentos nerviosos distales intramusculares donde la barrera hematoneural es débil (Olsson 1968; Kuwabara *et al.* 2003).

	AMAN	AIDP
Infección precedente	<i>C. jejuni</i>	CMV, VEB
Frecuencia	Europa y EEUU <10%; México 30%; Israel 22%; China 65%; Japón 38%	Europa y EEUU 90%; México 30%; Israel 63%; China 20%; Japón 40%
Pérdida sensitiva	Usualmente ninguna (<10%)	Frecuente (90%)
Dolor	Usualmente ninguno	Frecuente (>66%)
Recuperación	Dos patrones (rápido y lento)	Relativamente uniforme
Electrofisiología	Degeneración axonal, bloqueo de la conducción reversible	Desmielinización
Molécula diana	Gangliósidos (Usualmente GM1, GD1a)	Desconocido

Tabla 1. Características clínicas de los dos principales subtipos de SGB

Se detallan las principales características de AMAN y AIDP. Cuadro adaptado de Kuwabara y Yuki 2013.

Durante el proceso de recuperación, las células de Schwann proliferan y migran hacia los sitios lesionados para remielinizar los axones desnudos (Saida *et al.* 1980). La velocidad de recuperación pareciera ser independiente del sitio de desmielinización, ya que no hay evidencia de que la capacidad de remielinización varíe a lo largo del nervio (Saida *et al.* 1980; Willison 2005). Por otro lado, cabe destacar que en lesiones severas, es probable la presencia de lesiones axonales secundarias, como consecuencia de la liberación de enzimas y

radicales en la respuesta inmune dirigida contra la mielina (Hughes y Cornblath 2005; Willison 2005).

MFS

En lo que respecta a la patología de las formas puras de MFS, se trata de una patología benigna (casos usualmente sin complicaciones), en la que generalmente no se dispone de autopsias, o las regiones afectadas no pueden someterse a biopsia (Phillips *et al.* 1984).

Usualmente, los síntomas se encuentran acompañados por la presencia de anticuerpos que son capaces de reconocer al gangliósido GQ1b. Existe evidencia de que estos anticuerpos son capaces de alterar la liberación sináptica en los terminales nerviosos motores (Roberts *et al.* 1994; Buchwald *et al.* 1995; Buchwald *et al.* 1998). El principal hallazgo electrofisiológico es la conducción sensitiva anormal. Estas manifestaciones han sido consistentes con desmielinización de los nervios periféricos sensitivos o falla en la conducción a lo largo del axón (Hughes y Cornblath 2005). En estudios *in vitro* se ha observado que, luego de la unión de los anticuerpos y la fijación del complemento, un flujo incontrolado de calcio ingresa al nervio a través de los poros del complejo de ataque a la membrana (MAC). Esto provoca excitotoxicidad espontánea, degradación estructural del citoesqueleto axonal mediado por calpaína y daño mitocondrial mediado por calcio. El resultado final es parálisis (O'Hanlon *et al.* 2003).

4.c. Auto-anticuerpos asociados a la neuropatía

Desde la década de los 80, la presencia de anticuerpos anti-gangliósidos de especificidades bien definidas ha sido correlacionada con diversos síndromes clínicos (Ilyas *et al.* 1985a; Ilyas *et al.* 1985b; Freddo *et al.* 1986; Gallardo *et al.*

2001; Ariga 2014). Si bien en el suero de individuos sanos se detectan anticuerpos anti-gangliósido, éstos poseen títulos y afinidad bajos (Mizutamari *et al.* 1994), a diferencia de los pacientes con SGB que poseen anticuerpos con afinidades elevadas. Se ha observado además, que aquellos pacientes que presentan una elevación de los anticuerpos anti-GM1 de corta duración tienen una recuperación más rápida (Bech *et al.* 1997).

Recientemente, los estudios se han focalizado en los mecanismos efectores de los anticuerpos anti-gangliósidos (más allá de la contribución de la respuesta celular discutida en otras secciones). Evidencias experimentales respaldan el hecho de que estos anticuerpos causan tanto la alteración estructural como funcional del SNP (Halstead *et al.* 2004; Goodfellow *et al.* 2005; Buchwald *et al.* 2007; Susuki *et al.* 2007). Sumado a que tanto los anticuerpos anti-GD1a (Zhang *et al.* 2011) como los anti-GM1 (Ueda *et al.* 2010) pueden interferir en la regeneración neuronal.

Por otro lado, se ha observado que los efectos patológicos de los anticuerpos anti-gangliósidos son atenuados por la rápida internalización de los mismos en la unión neuro-muscular (Fewou *et al.* 2012; Cunningham *et al.* 2016). Sin embargo, los nodos de Ranvier son susceptibles al daño mediado por complemento y calpaína luego de la exposición a anticuerpos anti-GD1a en ratones (McGonigal *et al.* 2010). De forma interesante, los nodos distales parecen más susceptibles a la unión de los anticuerpos y la falla en la conducción nerviosa puede ocurrir aun sin pérdida de la integridad estructural. Este fenómeno puede ser asociado a algunos subtipos de AMAN de rápida recuperación clínica (Kuwabara y Yuki 2013; van den Berg *et al.* 2014).

El potencial patogénico de los anticuerpos anti-gangliósidos parece ser íntimamente dependiente de ciertos aspectos de su especificidad fina. El título de anticuerpos anti-GM1 medido en base a un ensayo en células puede

correlacionarse con la severidad de la enfermedad, a diferencia del título medido mediante ELISA clásico (Lardone *et al.* 2010).

Por otro lado, cada subtipo de SGB se encuentra asociado a diferentes especificidades de anticuerpos. En AMAN se detectan frecuentemente anticuerpos anti GM1a, GM1b, GD1a y GalNAc-GD1a (Ogawara *et al.* 2000; Willison y Yuki 2002; Yuki y Hartung 2012; van den Berg *et al.* 2014) mientras que en MFS se encuentran anti GQ1b, GD1b, GD3 y GT1a (asociados a oftalmoplegia y ataxia) (Yuki *et al.* 1999; Kaida y Kusunoki 2010). La identificación del antígeno diana en pacientes con AIDP ha generado diferentes resultados, sin embargo algunos estudios recientes han establecido una buena correlación con anticuerpos anti-complejos de gangliósidos (GSC) (Rinaldi 2013; Rinaldi *et al.* 2013).

Se denomina anticuerpos anti-GSC a aquellos que fallan en reconocer un glicolípido aislado, pero pueden reconocerlo en presencia de un segundo glicolípido adicional (Kaida *et al.* 2004; Kaida *et al.* 2007). Estos complejos heteroméricos se describen como glicolípidos distintos estructuralmente que interaccionan para formar nuevas formas moleculares capaces de potenciar o atenuar la unión de auto-anticuerpos (Willison y Goodyear 2013). Un amplio rango de estos complejos han sido identificados, involucrando muchos compañeros heteroméricos diferentes (Kaida *et al.* 2008; Rinaldi *et al.* 2013). Estos complejos se localizan en microdominios especializados (*lipid rafts*) en la membrana celular (Hakomori 2002). Se ha observado en estudios serológicos que los anticuerpos que son capaces de reconocer a los GSC también interaccionan con LPS de *C jejuni* (Kuijf *et al.* 2007). Además, en otro estudio se describió que estos anticuerpos anti-GSC son capaces de unirse a un dímero sintético de GM1 y GD1a, sugiriendo que el sitio de unión de estos anticuerpos involucra al menos una porción de cada oligosacárido (Mauri *et al.* 2012; Moyano *et al.* 2012).

Se ha observado que algunos anticuerpos anti-GSC tienen la capacidad de inducir efectos patogénicos, sugiriendo que las estructuras creadas por la interacción de glicolípidos podrían estar presentes en la membrana de los nervios periféricos y tal vez dirigir la patogénesis (Zitman *et al.* 2011). En los últimos años se ha destacado la influencia del ambiente lipídico, la orientación molecular de los glicolípidos y la presencia de complejos como potenciadores o inhibidores de la unión de los anticuerpos a glicolípidos (Willison y Goodyear 2013). Por ejemplo, la influencia ejercida por gangliósidos cercanos es capaz de inhibir la unión de los anticuerpos anti-GM1 (Greenshields *et al.* 2009). Por otro lado, aunque la influencia de los lípidos neutros y el colesterol ha sido arduamente estudiada en ensayos con estructuras artificiales tales como los liposomas (Pestronk *et al.* 1997), en la membrana plasmática la situación puede ser diferente. Por ejemplo, en un ensayo en el que se toman dos anticuerpos anti-GM1 de afinidades similares, sólo uno de ellos es capaz de reconocer GM1 en una membrana plasmática viva (Greenshields *et al.* 2009). Se cree que los GSC forman distintas plataformas de reconocimiento en el plano de la membrana plasmática, pudiendo influenciar la unión de los anticuerpos (Willison y Goodyear 2013).

En otras palabras, dilucidar los aspectos relacionados a este campo resulta complicado, se cree que los anticuerpos anti-glicolípidos asociados a neuropatías pueden ser potenciados o inhibidos por complejos, o aun ser independientes de éstos. El número potencial de glicolípidos asociados se incrementa dramáticamente cuando se consideran asociaciones heteroméricas, sumado a que se sabe que los anticuerpos anti-glicanos tienen la capacidad de unirse a más de un glicolípido (McAlarney *et al.* 1995). En la actualidad, se han desarrollado “*glicoarrays* combinados” que han permitido realizar *screening* e identificar muchos nuevos GSC asociados a subtipos de SGB (Rinaldi *et al.* 2012).

5. Anticuerpos anti-glicanos

Los individuos sanos poseen un conjunto de anticuerpos circulantes, preferencialmente de isotipo IgM denominados anticuerpos naturales (NABs). Los mismos son producidos espontáneamente y se caracterizan típicamente porque los genes de la región variable de inmunoglobulinas (V_H y V_L) no poseen ninguna o muy pocas mutaciones. Por esta razón, exhiben un repertorio de especificidades estable y restringido. Dentro de las estructuras conservadas que reconocen estos anticuerpos, se encuentran tanto proteínas como ácidos nucleicos, fosfolípidos y carbohidratos (Lutz *et al.* 2009; Lutz 2012; Panda y Ding 2015). La especificidad de unión que caracteriza a este tipo de anticuerpos le permite desempeñar su papel como primera línea de defensa contra patógenos. Sin embargo, los NABs no sólo reconocen estructuras microbianas sino también estructuras propias, lo que ha llevado frecuentemente a considerarlos como auto-reactivos. Se cree que esta propiedad de unión le permite identificar y seleccionar desechos celulares y células dañadas. Por lo cual, no sólo se les atribuyen funciones de defensa antimicrobiana, sino también de mantenimiento de la homeostasis (Lutz 2012).

Al momento del nacimiento, además de los anticuerpos IgG provenientes de la madre, sólo se encuentran en el organismo los NABs (Madi *et al.* 2012). Sin embargo poco tiempo después se detectan además otro tipo de anticuerpos a los que se han denominado “anticuerpos de origen natural” (NOAbs para diferenciarlos de los NABs). Los NOAbs surgen luego de que las bacterias colonizan el tracto gastrointestinal y respiratorio. Los anticuerpos que reconocen glicanos de estas bacterias se detectan en suero de niños de más de un mes de edad (Alaniz *et al.* 2004).

Un ejemplo de estos anticuerpos NOAbs corresponde al de los grupos sanguíneos A/B. Los NOAbs se unen a glicolípidos y glicoproteínas que exponen

los glicanos A/B, sin embargo son generados por determinantes presentes en lipopolisacáridos bacterianos (Springer 1971). De la misma forma, el suero de humanos adultos normales contiene anticuerpos que reconocen otros glicanos como el antígeno de xenotransplante α -Gal (Galili *et al.* 1985) varios glicolípidos de la serie artro (Nores *et al.* 1991) y el gangliósido GM1 (Mizutamari *et al.* 1994; Alaniz *et al.* 2004).

Se postula que los NOAbs que reconocen con baja afinidad el terminal Gal β (1-3)GalNAc presente en GM1 y otros glicolípidos, han sido originados en una respuesta inmune dirigida a un glicano aún desconocido presente en bacterias (Alaniz *et al.* 2004). La contradictoria presencia de anticuerpos que se unen a auto-antígenos (gangliósidos en este caso) en el suero de individuos sanos ha sido atribuida a la falta de actividad biológica de dichos anticuerpos (Mizutamari *et al.* 1998). Los mismos han sido encontrados también en el suero de conejos y pollos sanos (Datos no publicados).

Los anticuerpos anti-glicanos pueden ser considerados como proteínas de unión a carbohidratos, en donde el sitio de unión tiende a encontrarse sobre la superficie de la molécula y no en bolsillos profundos (Vyas 1991; Sonnino *et al.* 2016). La afinidad de la unión resulta de la combinación de las fuerzas de atracción y repulsión puntuales, por lo que una afinidad elevada se obtiene cuando se encuentran involucrados un gran número de puntos de atracción y un bajo número de puntos de repulsión (Roitt 2008). Los anticuerpos tienen la capacidad de reconocer antígenos con una variabilidad estructural casi ilimitada y los anticuerpos anti-glicanos son capaces de unirse a un rango extremadamente amplio de glicoconjugados (glicolípidos, glicoproteínas) (Sonnino *et al.* 2016). Si bien algunos de estos anticuerpos se consideran frecuentemente poli-reactivos¹⁰ otros se presentan como altamente específicos.

¹⁰ Tienen la capacidad de unirse a ligandos estructuralmente diferentes con distinta afinidad y avidéz.

Existe evidencia de que diversas especificidades de anticuerpos son codificadas por conjuntos restringidos de genes V_H/V_L . Éstos residen dentro del repertorio natural de anticuerpos, el cual puede ser expandido por LOS bacterianos una vez liberados de la tolerancia (Paterson *et al.* 1995; Willison 2005). Se sabe que la respuesta de anticuerpos en el SGB posee cambio de clase desde IgM hacia los isotipos IgG1 e IgG3 fijadores de complemento (Willison y Veitch 1994; Van Sorge *et al.* 2004). Éste cambio podría ocurrir simultáneamente en un rango de clones dentro del repertorio de células B, aunque este repertorio se cree que está clonalmente restringido (Willison 2005; Townson *et al.* 2007). Los anticuerpos producidos por un único clon de células B comparten el mismo tipo de cadena liviana de inmunoglobulina (κ o λ). Este uso exclusivo de cadena liviana puede ser utilizado para distinguir entre anticuerpos producidos por poblaciones de células B monoclonales o policlonales. Se ha observado que la mayoría de los pacientes con SGB producen anticuerpos IgM anti-GM1 con una mezcla de cadenas κ y λ compatible con un origen oligoclonal. Además en un estudio con 23 pacientes, un único tipo de cadena liviana anti-GM1 se demostró en el 39% de los casos de SGB (Cats *et al.* 2015).

En otro estudio inmuno-genético se analizaron seis clones de linfocitos B productores de anticuerpos IgM anti-GM1 (provenientes de cinco pacientes distintos). El análisis genético de los genes V_H y V_L demostró mutaciones somáticas substanciales en todos ellos aunque los dos anticuerpos derivados de un único paciente contienen los mismos reordenamientos V-D-J y V_L -J_L, y las mismas mutaciones únicas. Aunque el repertorio de genes V_H que pueden unir gangliósidos puede ser extremadamente variable, cada gen particular o familia de genes puede unir gangliósidos siguiendo ciertos requerimientos estructurales. Los anticuerpos anti-gangliósidos relacionados a GM1 podrían ser codificados por la combinación de genes V_H/V_L diversificados y de estructuras canónicas restringidas. El uso de estas estructuras restringidas es consistente con el número limitados de formas mediante las cuales pueden unirse los Ab,

debido al pequeño tamaño de los epítopes glucídicos. Las mutaciones somáticas en los genes V fueron consistentes con una respuesta inmune dirigida por antígeno (Paterson *et al.* 1995). Resultados similares han sido obtenidos con clones que reconocen GA1 (Weng *et al.* 1992). Por otro lado, los genes que codifican los anticuerpos IgM monoclonales de ratones inmunizados con GM1 exhibieron una homología cercana a los genes de la línea germinal con muy pocas mutaciones (Weng *et al.* 1994).

Además de observarse una “restricción clonal” en pacientes con SGB, la distribución de subclases de IgG de los anticuerpos anti-GM1 parece estar restringida principalmente a IgG1 e IgG3 (Guijo *et al.* 1992; Willison y Veitch 1994; Yuki *et al.* 1995; Koga *et al.* 2003; Yuki 2007b). Al examinarse 42 pacientes con SGB, las frecuencias de las subclases de IgG anti-GM1 fueron 76% para IgG1 y 31% para IgG3 (10% de los pacientes tienen ambos isotipos). Además IgG1 fue asociado con gastroenteritis previa causada por *C. jejuni* mientras que IgG3 fue asociado con infecciones respiratorias. Si bien la severidad de la enfermedad fue similar entre los pacientes positivos para IgG3 e IgG1, la rápida recuperación fue frecuente en pacientes con IgG3 e infrecuente en pacientes que tenían anticuerpos IgG1 (Koga *et al.* 2003).

A un nivel mecánico, el cambio hacia las subclases de IgG implicaría que la colaboración de las células T es requerida. Sin embargo, aún no se comprende cómo los glicolípidos son presentados al sistema inmune para generar este tipo de respuesta (Willison y Goodyear 2013). Si bien los anticuerpos anti-carbohidratos pueden ser generados de una forma dependiente de células T (células NKT/CD1), la medida en que este mecanismo contribuye a la respuesta es controversial. Esto se debe a que se ha observado que la respuesta anti-carbohidratos requiere células T CD4+ pero no necesariamente células NKT y CD1 (Christiansen *et al.* 2011). Por otro lado, se sabe que diversos polisacáridos modificados pueden ser procesados por células

presentadoras de antígeno (CPA), presentados mediante el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHCII) y luego activar células T (Cobb *et al.* 2004). Finalmente cabe destacar, además, que existen moléculas alternativas relacionadas a MHC (como MR1) que son capaces de presentar lípidos (Le Bourhis *et al.* 2011).

Con respecto a la respuesta inmune independiente de células T, resulta necesario subrayar que las células dendríticas (DC) y los neutrófilos pueden tomar a las bacterias y migrar hacia el bazo, para producir luego diferenciación en las células B de la zona marginal (BMZ). En este contexto, se ha descrito una nueva población de neutrófilos, los cuales han sido denominados neutrófilos colaboradores de células B inducibles (iN_{BHS}) (Puga *et al.* 2011). Éstos producen el ligando inductor de proliferación APRIL, IL-21 y el factor activador de células B (BAFF de las siglas en inglés) el cual colabora en la respuesta de anticuerpos anti-gangliósidos (Matsumoto *et al.* 2010). Los iN_{BHS} son capaces de estimular a las células BMZ para secretar IgM (Puga *et al.* 2011), pero también son capaces de inducir mutagénesis y cambio de clase (Willison y Goodyear 2013).

Se postula que la interacción entre los iN_{BHS} y las células BMZ produce una defensa de tipo innata contra infecciones microbianas, la cual en el SGB es posible que conduzca a la ruptura de la tolerancia. La infección con *C. jejuni* podría reclutar neutrófilos/ iN_{BHS} quienes toman y presentan el antígeno en las áreas de células B. Esta interacción podría producir un cambio de clase considerado “no clásico” y la generación de anticuerpos anti-gangliósidos de corta vida secretados por células plasmáticas. Este mecanismo sin embargo aún no explica la respuesta autoinmune transiente y la aparente falla para producir células B de memoria (Willison y Goodyear 2013).

Para concluir, cabe destacar que también se ha detectado en pacientes con AIDP el uso limitado de los genes $V\beta$ del receptor de células T (TCR) en

células activadas lo que podría indicar una respuesta restringida a un antígeno común (Khalili-Shirazi *et al.* 1997).

6. Auto-tolerancia a GM1

En condiciones fisiológicas normales, una red bien equilibrada de células inmunocompetentes y factores solubles regula la actividad del sistema inmune. El mantenimiento de la auto-tolerancia es un requisito clave. En las enfermedades autoinmunes, sin embargo, la auto-tolerancia se rompe y las células B y T auto-reactivas que son parte del repertorio inmune normal son activadas. Por qué y cómo la auto-reactividad escapa a los mecanismos de regulación siguen siendo los interrogantes centrales (Goodnow 2007).

Cuando los anticuerpos auto-reactivos anti-glicanos resultan ser de alta afinidad poseen la capacidad de inducir una enfermedad autoinmune. En el caso del Síndrome de Guillain-Barré, la respuesta inmune generada hacia los gangliósidos parece ser debida a una ruptura transitoria de la tolerancia ya que el resultado es una respuesta autoinmune aguda (Ho *et al.* 1997b; Hughes y Cornblath 2005; Willison y Goodyear 2013).

El reordenamiento génico que ocurre durante el desarrollo de los linfocitos en los órganos linfoides primarios es un proceso al azar. Esto conlleva a que, inevitablemente, se generen algunos linfocitos con afinidad por auto-antígenos. Estas células son normalmente removidas del repertorio, o mantenidas bajo control por una variedad de mecanismos a fin de generar un estado de “auto-tolerancia” (Hartley y Goodnow 1994; Murphy 2011). Sin embargo, algunos linfocitos escapan a estos mecanismos y pueden subsecuentemente ser activados y dar lugar a una enfermedad autoinmune. En parte, esta auto-reactividad ocurre debido a que el reconocimiento de los auto-

antígenos es “inespecífico” y por lo tanto imperfecto. Es decir, muchos de los linfocitos con algún grado de auto-reactividad pueden también desarrollar una respuesta contra antígenos extraños, por lo que su eliminación deterioraría la función del sistema inmune (Murphy 2011).

Aquellos mecanismos que previenen la autoinmunidad pueden considerarse como una sucesión de puntos de control. El mecanismo de tolerancia central elimina los nuevos linfocitos que sean fuertemente auto-reactivos. Mientras que aquellos linfocitos maduros que no poseen una habilidad de auto-reconocimiento fuerte en los órganos linfoides centrales, pueden ser eliminados o inactivados en la periferia (anergia), como se esquematiza en la Figura 8 (Goodnow 2007; Murphy 2011). El destino del clon auto-reactivo depende de la fuerza de la estimulación antigénica (afinidad, valencia, concentración, contexto) y de la localización del antígeno (grado de exposición) (Hartley y Goodnow 1994; Klinman 1996; Goodnow *et al.* 2005). Se ha observado, por otro lado, que algunas células auto-reactivas no son anergizadas en sí, pero permanecen inactivas debido a que las células T colaboradoras pertinentes han sido eliminadas (Adelstein *et al.* 1991).

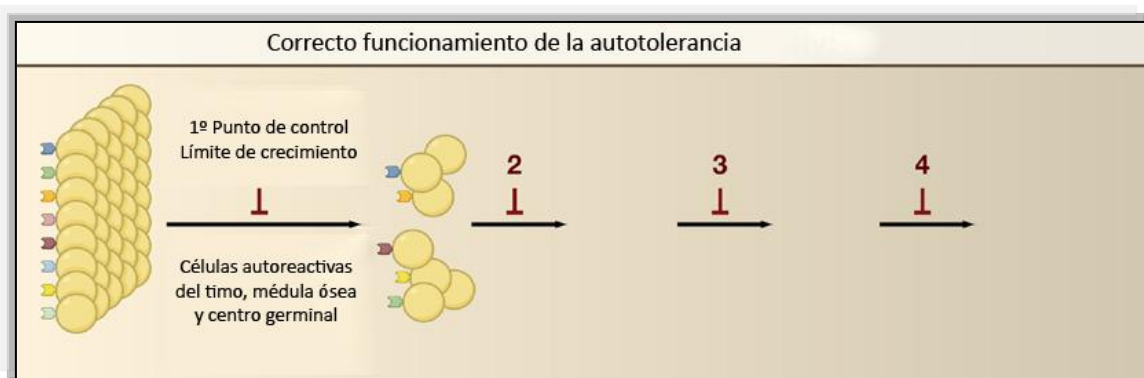


Figura 8. Correcto funcionamiento de la auto-tolerancia

La diversificación somática aleatoria de los genes del receptor de antígeno puede producir muchos clones que lleven receptores auto-reactivos. Normalmente, la supervivencia y el crecimiento de estos clones se evita mediante la presencia de múltiples puntos de control (Goodnow 2007).

Hallar rupturas aisladas en uno o más puntos de protección contra la autoinmunidad es relativamente común, aun en individuos sanos (Mizutamari *et al.* 1994; Ventura *et al.* 2004; Goodnow *et al.* 2005). Sin embargo, la activación de linfocitos auto-reactivos no conlleva necesariamente una enfermedad autoinmune, la misma se desarrolla sólo cuando se produce una reacción sostenida (generación de células y moléculas efectoras que producen daño en los tejidos) (Murphy 2011). Si bien los mecanismos involucrados aún no se conocen completamente, la autoinmunidad se considera el resultado de una combinación de factores: una susceptibilidad genética, la ruptura de los mecanismos naturales de tolerancia y la aparición de un “disparador ambiental” tal como una infección (Bach 2005; Murphy 2011). Muchos linfocitos circulantes poseen baja afinidad por auto-antígenos y no responden ante ellos. Estos linfocitos pueden ser considerados como células “auto-reactivas latentes”, ya que podrían ser reclutadas en una respuesta autoinmune si su umbral de activación se reduce, por ejemplo, mediante factores co-activadores. Otro mecanismo mediante el cual estas células pueden ser conducidas a la acción es mediante un cambio en la disponibilidad o la forma del auto-antígeno. Durante una infección, la combinación de mediadores inflamatorios liberados por CPAs y linfocitos activados puede tener efectos en los linfocitos auto-reactivos (Bach 2005; Sfriso *et al.* 2010). Además, las citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6) deterioran la actividad supresora de las células T reguladoras, permitiendo que las células T auto-reactivas se diferencien a células efectoras (Bach 2005). Cabe destacar además, que ciertos patógenos se encuentran particularmente asociados con enfermedades autoinmunes debido a que expresan antígenos que se asemejan a moléculas del huésped, como se ha detallado anteriormente (mimetismo molecular). Este fenómeno puede involucrar anticuerpos que posean reacción cruzada con auto-antígenos y/o activación de células T auto-reactivas (Barnaba y Sinigaglia 1997; Yuki 2007b).

Por otro lado, en los órganos linfoides secundarios las células B activadas sufren hipermutación somática¹¹ que podría transformarlas en auto-reactivas o, al menos, aumentar su afinidad por auto-antígenos. Existe un mecanismo de control en este punto, por lo que las células hipermutadas que fuertemente entrecrucen sus BCRs en el centro germinal sufrirán apoptosis en vez de proliferar (Hannum *et al.* 1996; Murphy 2011).

El gangliósido GM1 es un auto-antígeno ubicuo y expuesto en la superficie de una amplia variedad de células. Por lo tanto, se espera que en individuos normales, aquellos linfocitos capaces de ser estimulados por GM1 hayan sido eliminados o permanezcan quiescentes. Sustenta este supuesto la dificultad que existe para generar anticuerpos de alta afinidad (Kawashima *et al.* 1992; Lopez *et al.* 2002b). La generación de ratones *knockout*¹² que carecen de gangliósidos complejos permite la producción de anticuerpos de alta afinidad e indica que en ratones normales la tolerancia hacia los auto-antígenos es el principal factor regulador (Lunn *et al.* 2000; Bowes *et al.* 2002). Es decir, si bien las células B auto-reactivas pueden ser producidas, se encontrarían de alguna forma “controladas” ya que, como se señaló anteriormente, los anticuerpos de isotipo IgM anti-GM1 son parte del repertorio inmunológico de los individuos normales (Mizutamari *et al.* 1994). Los mismos son de baja afinidad y su sitio de reconocimiento se encuentra íntimamente relacionado con la porción terminal Gal β (1-3)GalNAc del gangliósido (Sadiq *et al.* 1990; Mizutamari *et al.* 1994; Mizutamari *et al.* 1998). Debido a su baja afinidad, se consideran inocuos y sus niveles de circulación en plasma son mantenidos constantes, probablemente

¹¹ Implica un proceso de mutación programada que afecta a las regiones variables de los genes de inmunoglobulina. A diferencia de muchos otros tipos de mutación afecta solo a células inmunitarias individuales y no se transmiten a la descendencia.

¹² Ratón modificado por ingeniería genética para que uno o más de sus genes estén inactivados mediante una técnica de ingeniería genética llamada *gene knockout*.

debido a la continua estimulación de los linfocitos por glicanos bacterianos (Alaniz *et al.* 2004).

7. Hipótesis de la “deriva del sitio de unión”

A diferencia de los anticuerpos IgM anti-GM1 de baja afinidad presente en individuos sanos, en el suero de pacientes con neuropatías se detectan anticuerpos con altas afinidades y capacidad de lisis dependiente de complemento (Nobile-Orazio *et al.* 1992; Mizutamari *et al.* 1998; Lopez *et al.* 2001). Además, los anticuerpos asociados a la neuropatía presentan distintas especificidades finas (Baba *et al.* 1989; Lopez *et al.* 2001). De acuerdo a la reactividad cruzada con GA1/GD1b, pueden definirse cuatro poblaciones de anticuerpos anti-GM1 (Lopez *et al.* 2001; Lardone *et al.* 2016). Cabe destacar que, en el suero de pacientes se detectan tanto los anticuerpos de alta afinidad como los de baja afinidad que presentan reacción cruzada con GA1 (presentes en el suero de individuos sanos). Además, cada paciente presenta diferentes patrones de poblaciones de anticuerpos, sugiriendo un componente al azar presente en el origen de los mismos (Lopez *et al.* 2001; Lopez *et al.* 2002a; Lardone *et al.* 2016).

Como se detalló anteriormente, la mayoría de los anticuerpos anti-gangliósido reconocen epítopes que incluyen 2 o 3 azúcares, y el componente no glicano usualmente no se encuentra involucrado en la unión. Los anticuerpos anti-glicano pueden reconocer secuencias de carbohidratos en uno o más glicoconjugados, como ocurre con los NOAbs, sin embargo la especificidad y afinidad de los mismos se encuentra restringida por la auto-tolerancia (Marcus 1969). Dependiendo de la especificidad fina, los anticuerpos anti-GM1 reconocerán o no a las glicoproteínas (Apostolski *et al.* 1994).

Para estudiar la especificidad fina de los anticuerpos, podemos tomar las estructuras de los distintos gangliósidos reconocidos por los mismos. Para ello se consideran las estructuras de los gangliósidos como “contenidas” unas dentro de otras, desde la más simple a la más compleja. La estructura de GA1 estaría “contenida” dentro de la estructura de GM1, y ésta dentro de la de GD1b.

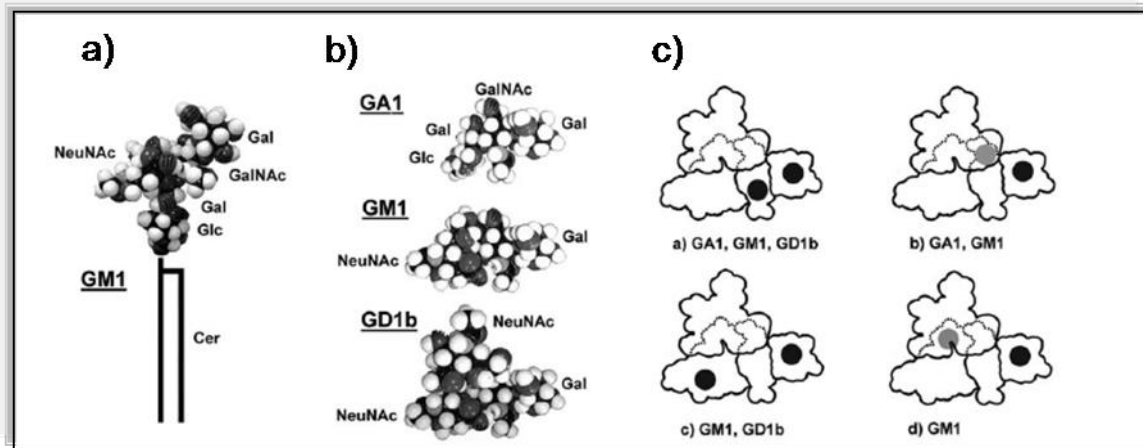


Figura 9. Modelos de CPK de oligosacáridos de GA1, GM1 y GD1b

a) Vista lateral de GM1 **b)** Vista axial (“cara terminal”) de los tres oligosacáridos **c)** Diagramas esquemáticos de la “cara terminal” de los oligosacáridos del glicolípido y las áreas propuestas implicadas en la unión de las diferentes poblaciones de anticuerpos anti-GM1 (puntos). El color de la mancha indica si el área de GM1 no está cubierta (negro) o cubierta (gris) por el segundo NeuNAc presente en la molécula GD1b. (Lopez *et al.* 2001)

El observar la estructura de los gangliósidos, observamos que la cara axial o terminal (Figura 9) se encuentra estabilizada por puentes de hidrógeno y, aunque la estructura se considera flexible permitiendo cierta libertad de movimiento, la cara terminal siempre está expuesta y por lo tanto es accesible a los anticuerpos (Acquotti *et al.* 1990; Brocca *et al.* 2000; Lopez *et al.* 2001). Dentro de la cara axial de GM1 se distinguen dos regiones: Una “región terminal” formada por las superficies expuestas de Gal y GalNAc y una “región lateral” formada por la superficie expuesta del ácido siálico (NeuNAc). Ambas regiones se encuentran parcialmente cubiertas por el segundo NeuNAc de la

molécula de GD1b como se observa en la Figura 9 (Lopez *et al.* 2002a). La exposición del Gal terminal es un importante requerimiento de unión, ya que ninguna de las poblaciones de anticuerpos en pacientes o individuos sanos reconoce GM2 (Versión de GM1 sin Gal) (Mizutamari *et al.* 1994).

En base a las diferentes reactividades cruzadas de los anticuerpos anti-GM1 se pueden definir diferentes poblaciones que reconocen distintas zonas del gangliósido (es decir, distintos requerimientos estructurales representados en la Figura 9) (Lopez *et al.* 2001). Aquellos anticuerpos que reconocen GM1 y GA1, se unen a la “región terminal” (Incluyendo el residuo GalNAc). Si los anticuerpos poseen mayor afinidad por GM1 que por GA1, entonces la “región lateral” se encuentra involucrada en la unión. Por otro lado, la reactividad cruzada con GD1b está definida por el área cubierta por el segundo NeuNAc (si ésta no es requerida el anticuerpo se une a GD1b). La unión de anticuerpos anti-GM1 que no poseen reacción cruzada con GA1 requiere dos características estructurales: por un lado una pequeña área de unión en la “región terminal” que no es suficiente para soportar la unión por sí sola, y por otro lado áreas adicionales en la “región lateral”. La variabilidad de unión de las poblaciones de anticuerpos anti-GM1 refleja pequeñas diferencias en las áreas de la molécula de GM1 requeridas para la unión del anticuerpo (Lopez *et al.* 2001). Los patrones de reconocimiento definen distintas poblaciones de anticuerpos. En cada individuo, se encuentran patrones de poblaciones restringidos, concordante con mutaciones sufridas por unos pocos linfocitos (Paterson *et al.* 1995; Lopez *et al.* 2001; Lardone *et al.* 2016).

Los NOAbs y los anticuerpos asociados a enfermedades comparten ciertos requerimientos estructurales, esta similitud de reconocimiento sugiere que estos últimos (poblaciones presentes en pacientes) se originan a partir de los primeros (poblaciones normales de anticuerpos). Las mutaciones que afectan el sitio de unión del anticuerpo podrían producir cambios en la

estructura tridimensional del mismo, eliminando o creando nuevos puntos de unión sobre la molécula de GM1. El aumento del área de unión podría generar (aunque no necesariamente) un incremento de la afinidad de la unión. Aquellas mutaciones que producen cambios en la región de unión de la molécula podrían tener como consecuencia un cambio de especificidad.

Para que los linfocitos puedan ser activados por GM1, primero deberían haber sufrido estas mutaciones que expandan el sitio de unión e incrementen la afinidad por GM1. El mecanismo clásico de producción de anticuerpos resulta similar al proceso Darwiniano, en el cual el antígeno actúa como un factor de selección natural del mejor ajuste, es decir, los clones de mayor afinidad. Esta hipótesis en la que los anticuerpos anti-GM1 asociados a enfermedades se originan a partir de los NOAbs que sufren mutaciones al azar en el sitio de unión muestra similitud conceptual con el fenómeno evolutivo de “deriva génica”¹³. Por lo tanto en nuestro laboratorio se propuso denominarla hipótesis de la “deriva del sitio de unión” (Lopez *et al.* 2001; Lopez *et al.* 2002a).

En definitiva, esta hipótesis propone que los linfocitos B normales que producen anticuerpos anti-GM1 sufren mutaciones azarosas que modifican los genes V y consecuentemente el sitio de unión del anticuerpo (Lopez *et al.* 2002a). Algunas de estas mutaciones pueden producir un mejor ajuste en el área de contacto del anticuerpo, generando nuevos puntos de unión (expansión del sitio de unión) y por ende incrementando la afinidad. Una vez que los linfocitos alcanzan cierto nivel de afinidad, se vuelven susceptibles a ser estimulados por GM1 endógeno o exógeno (Figura 10). Durante el proceso de expansión del sitio de unión, existen varios “camino potenciales” que conducen

¹³ Fuerza evolutiva que actúa cambiando las frecuencias alélicas de las especies. Es un efecto estocástico que es consecuencia del muestreo aleatorio en la reproducción (pérdida de unos alelos por azar y no por selección natural). Normalmente se da la pérdida de los alelos menos frecuentes y la fijación de los más frecuentes, resultando una disminución en la diversidad genética de la población.

a distintas especificidades finas. Cuando uno o unos pocos linfocitos están involucrados se generará un patrón de poblaciones restringido, sumado a que cada linfocito sigue un camino al azar generando un patrón variable de poblaciones entre pacientes (Lopez *et al.* 2001; Lardone *et al.* 2016). Por ende, la hipótesis presume que los anticuerpos producidos serán finalmente mono u oligoclonales, como efectivamente ha sido observado (Paterson *et al.* 1995; Townson *et al.* 2007). Cuando se estudia la respuesta inmune a GM1 en conejos, se observa una progresiva aparición de poblaciones de anticuerpos anti-GM1 con diferentes especificidades y mayor afinidad (Lopez *et al.* 2002b).

La frecuencia con que ocurre este fenómeno de “deriva” es un punto que aún resta por ser dilucidado. La enfermedad es un fenómeno de baja frecuencia lo que podría implicar una baja frecuencia de “deriva”, sin embargo no se descarta que el fenómeno tenga una alta frecuencia asociada a un mecanismo de control eficiente. En plasma de individuos sanos se han detectado anticuerpos que específicamente reconocen y bloquean anticuerpos anti-GM1 asociados a enfermedad, dando sustento a la existencia de dicho mecanismo (Lopez *et al.* 2000). Estos mismos anticuerpos se consideran parcialmente responsables de los beneficios terapéuticos del tratamiento con inmunoglobulina intravenosa (Ho *et al.* 1997b; Hiraga *et al.* 2003) y su existencia sugiere que los anticuerpos anti-GM1 son generados continuamente en los individuos normales.

Como se mencionó anteriormente, el mimetismo molecular se ha propuesto como el mecanismo que explica el origen de los anticuerpos anti-GM1 en el SGB (Yuki 2007b). Sin embargo, sólo una pequeña proporción de individuos infectados con las cepas de *C. jejuni* con LOS símil GM1 desarrollan SGB (Nachamkin *et al.* 1999). Esto sugiere que el mimetismo antigénico por sí solo no es suficiente para explicar el origen de los anticuerpos y deben existir otros factores del huésped o la bacteria aún no identificados. A esta situación se

le suma que sólo unos pocos pacientes tratados con gangliósidos parenterales desarrollan la neuropatía (Illa *et al.* 1995). Sin embargo, la hipótesis de la deriva del sitio de unión, ofrece solución a los interrogantes asociados al factor de susceptibilidad del huésped. A modo de resumen, esta hipótesis se basa en los siguientes hechos fundamentales:

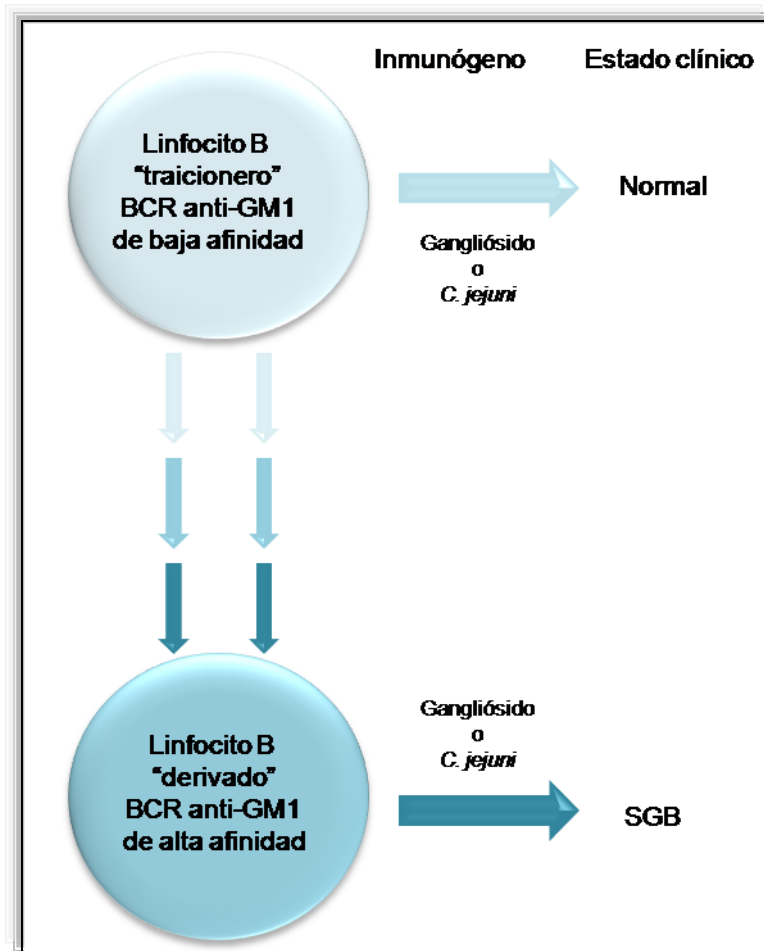


Figura 10. Hipótesis integrada del origen de anticuerpos anti-GM1

Los linfocitos B activables por GM1 (o LPS de bacterias) no están presentes en individuos sanos. Pero si linfocitos B que reconocen un glicano bacteriano desconocido y producen anticuerpos IgM que reaccionan con gangliósidos con baja afinidad (NOAbs). Uno o unos pocos de estos linfocitos "traidores" pueden derivar (mutar y aumentar la afinidad hacia GM1). Cuando se alcanza un valor umbral de afinidad, se vuelven activables por GM1 propio o extraño. Algunos protocolos de inmunización sólo producen anticuerpos de baja afinidad, sin embargo otros generan de alta afinidad e inducen la enfermedad (Nores *et al.* 2008).

1. Debido a que GM1 es un auto-antígeno los clones de células B que lo reconocen con alta afinidad no están presentes en los individuos sanos;

2. Dentro del repertorio humano normal de anticuerpos anti-bacterianos (NOAbs) se encuentran aquellos de isotipo IgM que reconocen GM1 con baja afinidad y una especificidad bien definida;

3. Los anticuerpos relacionados con la enfermedad tienen una mayor afinidad por GM1, y muestran una variabilidad restringida en su especificidad fina.

Los clones de células B de pacientes (productores de anticuerpos asociados a neuropatías) se originarían a partir de los denominados “linfocitos traicioneros” (Productores de NOAbs anti-GM1). Estos han obtenido su nombre debido a que potencialmente podrían producir anticuerpos dañinos a través del mecanismo de “deriva”. Se ha postulado además una tercera hipótesis que integra a las anteriores y las considera complementarias. Establece que la deriva del sitio de unión genera el “factor de susceptibilidad del huésped” mencionado en la hipótesis del mimetismo molecular.

8. Modelos experimentales

El origen de la enfermedad podría comprenderse en función de cómo el mecanismo de auto-tolerancia es pasado por alto. Se ha observado que el sistema inmune es muy tolerante a los auto-gangliósidos y la habilidad de superar esta tolerancia es infrecuente, sin embargo cuando ocurre se da lugar a una respuesta robusta y transitoria (Goodnow 2007; Willison y Goodyear 2013).

El modelo experimental se ha intentado implementar desde la década de los 70 mediante inmunización de animales. Sin embargo, cabe destacar, que la

inducción de la enfermedad se vio influenciada no sólo por el protocolo de inmunización, sino también por la susceptibilidad de la especie. Por ejemplo conejos y pollos son susceptibles a desarrollar la variante axonal de la enfermedad, mientras que el mismo protocolo de inmunización produce una pobre respuesta de anticuerpos en ratones (Miyoshi *et al.* 1982; Wirguin *et al.* 1997; Bowes *et al.* 2002; Usuki *et al.* 2006; Yuki 2012).

La neuritis experimental autoinmune (EAN) se ha considerado un modelo de SGB y CIDP, aunque se asemeja principalmente al SGB desmielinizante (clínica y patológicamente). EAN se ha desarrollado en ratones, conejos, ratas y cobayos (Hahn 1996). Puede ser inducido mediante inmunización con homogenato de nervio periférico, con proteínas de mielina del SNP o por transferencia de células T sensibilizadas con dichas proteínas (Kieseier *et al.* 2004; Soliven 2014). Típicamente, luego de dos semanas los animales desarrollan ataxia y debilidad. Sin embargo, se ha sugerido que EAN no es un modelo válido de SGB debido a que no se observa una proporción considerable de pacientes con células T auto-reactivas (Yuki y Hartung 2012). Además, este modelo ha sido criticado por la falla en la identificación de un antígeno diana para las células T auto-reactivas (Soliven 2014).

La primera clave de que los glicolípidos podían ser la diana de la respuesta inmune surgió en los años 70, cuando se logró inducir una neuritis mediante inmunización de conejos con gangliósidos o galactocerebrósidos (Nagai *et al.* 1976; Saida *et al.* 1979). A esta neuropatía motora se la denominó “Síndrome gangliósido”. Si bien estos conejos tienen altos títulos de anticuerpos anti-GM1, no presentan síntomas clínicos de neuropatía y los anticuerpos son de baja afinidad (Lopez *et al.* 2002b). Años después, implementando algunas modificaciones en el protocolo de inmunización y utilizando GD1b como inmunógeno, se logró inducir una neuropatía experimental sensorial en conejos (Kusunoki *et al.* 1996). Basado en estas modificaciones, en 2001 se desarrolló un

modelo experimental de SGB en el que los conejos eran inmunizados con gangliósidos de cerebro bovino (BBG) o GM1. Los animales producían altos títulos de anticuerpos IgG anti-GM1 y también exhibían signos clínicos y cambios patológicos similares a aquellos encontrados en pacientes con AMAN (Yuki *et al.* 2001). Además, se detectaron anticuerpos anti-GM1 de alta afinidad en el comienzo de la enfermedad pero no después, sugiriendo que esta característica es esencial en el desarrollo de la patología (Comín *et al.* 2006). Los hallazgos patológicos fueron principalmente degeneración de tipo Walleriana sin infiltración de leucocitos ni desmielinización. Sin bien GM1 se expresa en SNP y SNC, los cambios patológicos sólo se observan en nervios periféricos. Esto probablemente se deba a la mayor permeabilidad de la barrera hematoneural comparado a la barrera hematoencefálica (Yuki 2012). En el axolema nodal o internodal de las raíces anteriores espinales se observaron depósitos de IgG (Susuki *et al.* 2012). Además, los nervios espinales anteriores mostraron infiltración de macrófagos en el espacio periaxonal aunque manteniéndose casi intactas las vainas de mielina (Susuki *et al.* 2003). Estos hallazgos resultan semejantes a lo observado en autopsias de casos humanos de AMAN (McKhann *et al.* 1993). La modificación importante que se implementó en el protocolo fue el uso de la hemocianina de lapa californiana (KLH) como *carrier*¹⁴ para el inmunógeno. Cabe destacar que el modelo de SGB axonal en conejos pudo generarse también por inmunización de LOS símil GM1 de *C. jejuni* (Yuki *et al.* 2004; Caporale *et al.* 2006), con GM1 o con LPS de *C. jejuni* de pacientes con la enfermedad (Yuki *et al.* 2001; Yuki *et al.* 2004; Susuki *et al.* 2007). El resultado es la producción de anticuerpos anti-GM1 que se unen a los nodos y activan el complemento, la serie de anormalidades producidas podría estar induciendo la falla en la conducción nerviosa y debilidad muscular (Susuki *et al.* 2007).

¹⁴ Proteína inmunógena grande que al asociarse con un hapteno o una molécula poco inmunogénica forma un complejo inmunológicamente activo.

Sin embargo, otros laboratorios reportaron que aún utilizando dicha modificación, se producían altos títulos de anticuerpos anti-GM1 sin inducción de anormalidades neurológicas (Dasgupta *et al.* 2004). Además, el protocolo de inmunización ha estado sujeto a críticas, debido al nivel de dolor infligido a los animales como consecuencia del número y vía de inmunización con AFC (Nachamkin 2002). En 2008, nuestro laboratorio no sólo fue capaz de inducir exitosamente una enfermedad similar a la descrita en 2001, sino que además introdujo modificaciones que contemplan la aprobación del protocolo por comités de uso y cuidado animal en Estados Unidos (Moyano *et al.* 2008).

En resumen, los modelos de neuropatía periférica humana pueden ser inducidos en conejos por inmunización con glicolípidos (o LOS). La inmunización con GD1b induce una neuropatía aguda sensitiva similar a la enfermedad humana (AMSAN), en la cual se encuentran frecuentemente anticuerpos anti este gangliósido (Kusunoki *et al.* 1996). La inmunización con GM1 produce una neuropatía aguda periférica histológicamente similar a AMAN (Yuki *et al.* 2001; Susuki *et al.* 2003; Moyano *et al.* 2008).

No obstante, en general resulta difícil transferir la enfermedad a ratones, aun mediante implantación de hibridomas¹⁵ secretores de anticuerpos anti-gangliósidos, lo cual produce una neuropatía axonal leve (Sheikh *et al.* 2004). En este modelo se observó que la susceptibilidad para desarrollar anticuerpos anti-gangliósidos está influenciada también por la densidad de gangliósidos en la membrana (Goodfellow *et al.* 2005). Por otro lado, la inmunización de ratones con LOS genera sólo una respuesta transiente de tipo IgM anti-gangliósidos que carece de una respuesta inmune secundaria desarrollada (Bowes *et al.* 2002; Yuki *et al.* 2004). La respuesta humoral generada se encuentra exacerbada en

¹⁵ Línea celular inmortal capaz de producir un anticuerpo monoclonal de interés, es obtenida mediante la fusión de un linfocito B productor del anticuerpo específico de interés, con una línea celular de mieloma (linfocito B canceroso) que no produce una inmunoglobulina propia.

ratones deficientes de gangliósidos en comparación con los ratones normales, indicando que es la tolerancia y no una imposibilidad intrínseca de respuesta inmune quien regula la generación de anticuerpos (Lunn *et al.* 2000; Bowes *et al.* 2002; Yuki *et al.* 2004).

Los modelos experimentales inducidos son útiles para investigar las enfermedades autoinmunes, aunque los protocolos basados en el uso de adyuvantes se consideran bastante artificiales. La mayoría de las enfermedades autoinmunes humanas ocurren espontáneamente, aunque con algunos factores desencadenantes exógenos (Soliven 2014). Por lo que resulta interesante la existencia de casos de neuropatía parálitica espontánea en pollos de granjas pertenecientes a pacientes con SGB. En base a esta observación, se han realizado experimentos en los que se alimentaron pollos con cultivos de *C. jejuni* aislados de pacientes y éstos desarrollaron una neuropatía parálitica desmielinizante similar al SGB luego de alrededor de 12 días (Li *et al.* 1996). Fueron evaluados tanto la respuesta inmune Th1/Th2 como los cambios histopatológicos del nervio ciático de los pollos que desarrollan la neuropatía, observándose semejanzas con la AIDP humana (Bader *et al.* 2010; Nyati *et al.* 2012). Además, al desafiar oralmente a los pollos con una cepa de *C. jejuni* de un paciente con SGB, que contiene LOS que imitan al gangliósido GM1, se inducen anticuerpos específicos IgM e IgG anti-LOS y anti-GM1. La inoculación de la cepa sin la estructura símil GM1 induce anticuerpos anti-LOS pero no anti-gangliósidos (Ang *et al.* 2010). La producción de anticuerpos anti-GM1 también se ha logrado mediante inmunización de pollos con gangliósidos y cepas de *C. jejuni* (Miyoshi *et al.* 1982; Usuki *et al.* 2006).

Por otro lado, involuntariamente el modelo de inmunización fue reproducido en humanos cuando la inyección con gangliósidos se volvió popular en el tratamiento de varias dolencias como las del ciático y los accidentes cerebrovasculares. Un pequeño número de casos de SGB se reportó luego de

estas inyecciones. En general, todos los pacientes con el subtipo AMAN tuvieron anticuerpos anti-GM1, a diferencia de aquellos individuos que recibieron la inyección pero no enfermaron (Illa *et al.* 1995).

A fin de demostrar el rol patogénico de los anticuerpos anti-gangliósidos, se ha planteado la necesidad de establecer experimentos de transferencia pasiva o inyecciones intraneurales (Toyka *et al.* 2002). En conejos este experimento ha resultado poco exitoso, posiblemente debido a las cantidades inadecuadas de anticuerpos anti-GM1 (Kusunoki *et al.* 1999). Sin embargo al inyectar suero de un paciente con anticuerpos anti-GM1 que tenía la enfermedad de la neurona motora, en nervio ciático de rata junto a complemento humano, se detectó el bloqueo de la conducción y la presencia de depósitos de inmunoglobulina en los nodos de Ranvier (Santoro *et al.* 1992). Además, algunos resultados se han logrado obtener en el modelo murino. Como se mencionó anteriormente, una neuropatía mixta (desmielinizante-axonal) suave fue inducida en ratones con un hibridoma secretor de anticuerpos anti-GD1a y GT1b (Sheikh *et al.* 2004). Estos resultados conducen a suponer que además de los anticuerpos circulantes, factores como la accesibilidad de los mismos y resistencia de las fibras nerviosas al daño mediado por anticuerpos son importantes en el desarrollo de la neuropatía (Yuki 2007b). Por otro lado, en el modelo murino *ex-vivo*, la transferencia pasiva de anticuerpos anti-GM1 y anti-GD1a produce una réplica del SGB axonal en presencia de complemento humano (Goodfellow *et al.* 2005; Greenshields *et al.* 2009). Adicionalmente, en este modelo, el bloqueo del clivaje de los componentes del complemento previene la disfunción y el daño a las estructuras nerviosas (Halstead *et al.* 2008). Se ha observado también que la presencia de anticuerpos anti-GM1 y anti-GD1a impide la regeneración axonal luego del daño axonal periférico (Lopez *et al.* 2010). La suma de estos resultados obtenidos en modelos murinos contribuye a sustentar el rol patogénico de los anticuerpos anti-gangliósido.

En nuestro laboratorio se ha logrado reproducir un modelo animal experimental de neuropatía basado en la inmunización de conejos con gangliósidos y KLH. El modelo permite el estudio en detalle de la generación de la respuesta inmune a gangliósidos, sus características y el rol que ésta desempeña en el desarrollo de neuropatías autoinmunes. El conocimiento de la respuesta inmune elaborada podría facilitar no sólo la comprobación de la hipótesis de la "Deriva del sitio de unión", sino también el desarrollo de terapias específicas en estadios tempranos de la enfermedad.

9. Situación problema

El Síndrome de Guillain-Barré es considerada la principal causa de parálisis neuromuscular postinfecciosa del mundo, luego de la erradicación de la poliomielitis, con una incidencia de 1:100000. Posee un comienzo rápido y en el 20% de los casos conduce a una parálisis total, requiriendo terapia intensiva prolongada con ventilación mecánica.

Los tratamientos óptimos actuales incluyen plasmaféresis e inmunoglobulinas intravenosas, terapias que carecen de especificidad inmunológica y sólo reducen la severidad de la enfermedad. La inmunopatología del SGB es multifactorial y compleja, sin embargo, comprenderla se considera un pre-requisito para lograr desarrollar inmunoterapias efectivas.

OBJETIVOS

“La formulación de un problema, es más importante que su solución” Albert Einstein

OBJETIVOS

1. Objetivo General

De acuerdo a los antecedentes expuestos, para este trabajo se planteó, como objetivo general, caracterizar el modelo experimental del Síndrome de Guillain Barré.

2. Objetivos específicos

Como objetivos específicos se plantearon los siguientes puntos:

1. Caracterizar la respuesta inmune humoral anti-gangliósidos en el modelo animal de neuropatía.
2. Estudiar el papel que desempeñaría la proteína KLH en el desencadenamiento de la enfermedad.
3. Estudiar el posible mecanismo que originaría los anticuerpos anti-gangliósidos en el modelo experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

“Los que se enamoran de la práctica sin la teoría son como los pilotos sin timón ni brújula, que nunca podrán saber a dónde van” Leonardo Da Vinci

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Glicolípidos

1.a. Glicolípidos para inmunización

La fracción de gangliósidos totales de cerebro bovino fue preparada por extracción de Folch, DEAE-Sephadex, metanólisis alcalina y cromatografía en fase reversa a partir de cerebro bovino. La composición de gangliósidos en esta preparación resultó similar a la preparación comercial Cronassial (GM1: 30%, GD1a: 48%, GD1b: 10%, GT1b: 12%). La preparación es libre de asialo GM1 (GA1).

1.b. Glicolípidos para TLC-I

Los glicolípidos GM1, GD1a, GD1b, y GT1b se prepararon a partir de cerebro humano. La fase superior del extracto lipídico de la partición de Folch se purificó por cromatografía en fase inversa y columna de DEAE-Sephadex. Fracciones de mono, di, y trisialogangliósidos se obtuvieron mediante elución secuencial de la columna, utilizando acetato de sodio 10, 25 y 40 mM en metanol, respectivamente. GM1, GD1a, GD1b, y GT1b se purificaron a partir de sus respectivas fracciones de HPLC. El denominado asialo-GM1 (GA1) fue preparado por hidrólisis ácida de BBG. La mezcla de gangliósidos fue disuelta en cloroformo:metanol:agua (60:30:4,5)

2. Inmunización

Conejos neozelandeses machos con un peso aproximado de 3 Kg fueron inmunizados en base a dos protocolos:

Clásico: Basado en un protocolo previamente utilizado en nuestro laboratorio (Yuki *et al.* 2001; Moyano *et al.* 2008) y luego levemente modificado para realizar una única inmunización. Se preparó una emulsión conteniendo:

1) 0,5 mg de gangliósidos purificados a partir de cerebro bovino (BBG);

2) 0,5 ml de hemocianina de lapa californiana *Megathura crenulata* (KLH, 2 mg/ml, *Calbiochem*) o Albúmina de suero bovino metilada (BSAm 2 mg/ml, *Sigma*) en buffer fosfato salino: 100 mM NaCl, 20 mM $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ (PBS);

3) 0,5 ml adyuvante de Freund completo (AFC, *Sigma*).

Un volumen total de un ml de la emulsión fue inyectado por única vez a cada animal en forma subcutánea en 5 puntos del lomo de los conejos. Este protocolo de inmunización fue aplicado a los grupos KLH/BBG y BSAm/BBG. Adicionalmente, un grupo de animales fue inyectado solo con BBG y AFC (Grupo BBG) y finalmente un grupo sólo se inmunizó con KLH y AFC (Grupo KLH).

Alternativo: Este protocolo se basó en modificaciones del protocolo anterior. Para ello se inmunizaron animales por vía subcutánea utilizando dos emulsiones separadas aplicadas simultáneamente en distintas ubicaciones en el lomo del animal.

La emulsión “a” se compuso de 0,5 mg de BBG en PBS y 0,5 ml AFC.

La emulsión “b” contenía 0,5 ml de KLH (*Calbiochem*) en PBS y 0,5 ml de AFC.

La emulsión “c” contenía 0,5 mg de BBG; 0,5 ml de BSAm en PBS y 0,5 ml de AFC.

Para distintos experimentos se utilizaron en un mismo animal combinaciones de las emulsiones. Para los animales del grupo KLH+BBG se usó la emulsión “a” y la “b”. Para el grupo BSAm/BBG+KLH se utilizaron las emulsiones “b” y “c”.

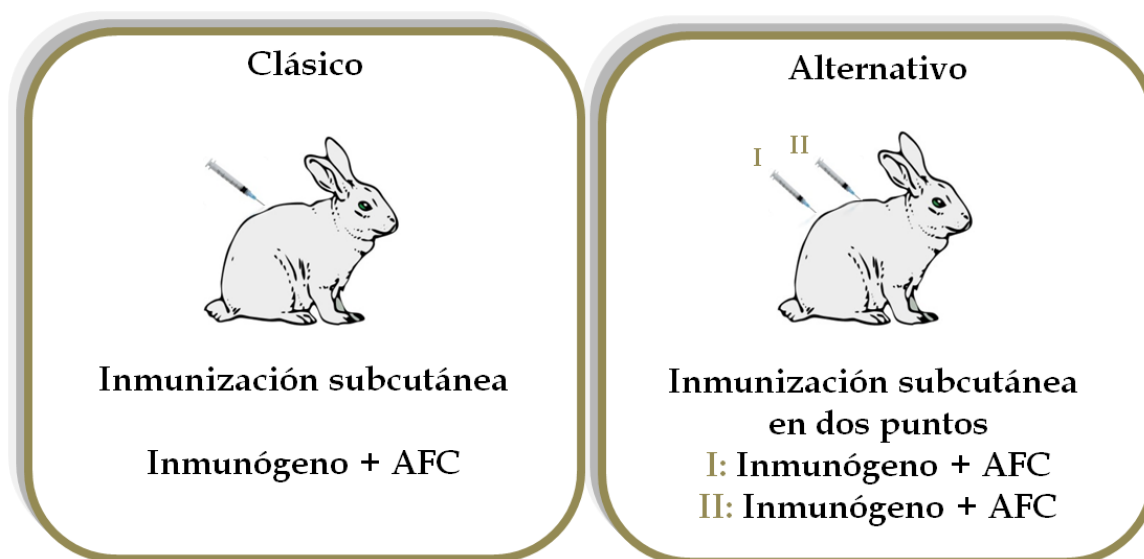


Figura 11. Protocolos de inmunización

Se utilizaron dos protocolos denominados Clásico y Alternativo. Como se esquematiza, en el modelo clásico se realiza una única inmunización subcutánea con una emulsión (inmunógeno y AFC). En cambio en el protocolo Alternativo se inmuniza subcutáneamente con dos emulsiones (I y II) por única vez en dos puntos diferentes. Cada emulsión posee inmunógenos distintos acompañados de AFC.

El peso de todos los animales fue monitoreado semanalmente a lo largo de 3-4 meses. Cada dos semanas se tomaron muestras de sangre por punción venosa de la oreja y a partir de éstas, se obtuvieron los sueros por centrifugación, los cuales fueron almacenados a -20°C . En distintos experimentos se inmunizaron un total de 35 conejos, cada experimento fue realizado de acuerdo a normas internacionales e institucionales para el cuidado del animal.

Se evaluaron los grados de severidad clínica de la enfermedad, en base a las siguientes consideraciones para el modelo experimental:

Grado 1: Disminución del peso corporal y debilidad muscular reversible en los miembros posteriores. Temblores.

Grado 2: Disminución del peso corporal y debilidad muscular reversible en los cuatro miembros. Temblores.

Grado 3: Disminución del peso corporal y debilidad muscular irreversible en los cuatro miembros. Temblores. Muerte.

3. Caracterización de anticuerpos

3.a. Cromatografía en placa fina Inmunotinción (TLC-I)

La mezcla de glicolípidos purificados en el laboratorio (GA1, GM1, GD1a y GD1b) fue resuelta sobre placas de sílica (TLC Sílica gel 60, *Merck*, Alemania) en el solvente de corrida cloroformo:metanol:CaCl₂ 0,2% acuoso (50:40:10) usando una cuba diseñada para obtener cromatogramas altamente reproducibles (Nores *et al.* 1994). Luego del secado al aire las placas fueron sumergidas durante 1,5 min en una solución 0,5% de poli-isobutilmetacrilato (*Aldrich Chemical Company*) en n-hexano:cloroformo (9:1) y secadas durante 1 h. Las placas fueron incubadas toda la noche con diluciones convenientes de los sueros en albúmina sérica bovina (BSA) 1% en PBS con 0,05% de Tween 20 (BSA 1%-PBSt). Después de 3 lavados con PBS, la unión de los anticuerpos fue detectada por medio de la incubación durante 1,5 h con anticuerpos contra inmunoglobulinas G y M de conejo (anti- γ y anti- μ específicos *Sigma*) conjugados a peroxidasa del rábano (HRP de sus siglas en inglés). Ambos anticuerpos fueron utilizados en una dilución 1/2000 en BSA 1%-PBSt. Todos los

pasos de incubación fueron realizados a 4°C. Después de lavar con PBS se llevó a cabo el revelado utilizando una solución de sustrato conteniendo: 0,01% de H₂O₂ y 2,8 mM de 4-cloro-1-naftol en metanol en buffer Tris/HCl (Tris 20 mM pH 7,4 ajustado con HCl) a una proporción 1:29 a temperatura ambiente. La reacción de desarrollo de color fue detenida luego de 20 min lavando las placas con PBS. Las inmuno-tinciones fueron escaneadas y procesadas mediante el uso del software *GelAnalyzer* para realizar las cuantificaciones correspondientes.

3.b. Revelado de placas con reactivo de orcinol

Para la detección de los glicolípidos resueltos mediante TLC se utilizó la técnica de orcinol-ácido sulfúrico. Para ello las placas fueron sumergidas durante 0,5 min en una solución conteniendo: 0,5 % de orcinol en H₂SO₄ 3 N. Posteriormente fueron reveladas a 110 °C durante 2,5 min. El reactivo orcinol es utilizado para la detección de carbohidratos.

3.c. Ensayo de inmuno-adsorción acoplado a enzima (ELISA)

Glicolípidos

Las placas de microtitulación fueron sensibilizadas con 25 pmoles del glicolípido GM1 en 50 µl de metanol. Después del secado a 37°C toda la noche, los reservorios fueron bloqueados con BSA 1%-PBS durante 1 h (100 µl/reservorio) y luego fueron lavados con PBS. Diluciones convenientes de los sueros en BSA 1%-PBS (50 µl/reservorio) fueron adicionados e incubados toda la noche. Luego de 3 lavados con PBS se incubó por 1,5 h con anticuerpos específicos contra inmunoglobulinas G y M de conejo conjugados a HRP, en una dilución 1/2000 (anti-γ y anti-μ específicos *Sigma*) en BSA 1%-PBS. Todos los pasos de incubación fueron realizados a 4°C. Después de los lavados con PBS, el

revelado se llevó a cabo utilizando una solución de o-fenilendiamina 15 mM y H_2O_2 0,015 % en buffer acetato de sodio pH 5,0; a temperatura ambiente. El desarrollo de color fue frenado después de 30 min por la adición de H_2SO_4 0,5 N (50 μl /reservorio) para luego medir la densidad óptica (DO) a 490 nm (*Bio-Rad Microplate Reader - Model 630*). La unión no específica de los anticuerpos al antígeno (valor de D.O. en los reservorios sin glicolípidos) fue sustraída en cada medición. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Proteínas

Las placas de microtitulación fueron sensibilizadas con 50 μl de una solución de KLH (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en buffer carbonato (NaHCO_3 0,1 M pH 8,3 NaCl 0,5 M) toda la noche a 4°C. Los reservorios fueron bloqueados con BSA 1%-PBSt durante 1 h (100 μl /reservorio) y luego fueron lavados con PBS. Diluciones convenientes de los sueros en BSA 1%-PBSt (50 μl /reservorio) fueron adicionadas e incubadas toda la noche. Luego de 3 lavados con PBS se incubó por 1,5 h con anticuerpos específicos contra inmunoglobulinas G y M de conejo conjugados a HRP, en una dilución 1/2000 (anti- γ y anti- μ específicos *Sigma*) en BSA 1%-PBSt. Todos los pasos de revelado fueron idénticos al protocolo utilizado con glicolípidos (apartado anterior).

3.d. Cálculo de los títulos de anticuerpos

Se define al título como la relación $V_L/V_{p0,5}$, es decir como la recíproca de la dilución de suero con la cual se alcanza la mitad de la unión máxima de antígeno-anticuerpo (siendo V_L el volumen de incubación = volumen de suero + volumen de diluyente). Cuando se grafica la unión de antígeno-anticuerpo (medida como D.O.) en función de los μl de suero utilizados, se obtiene una hipérbola que puede linearizarse en un gráfico de dobles inversas. Esta recta tiene como ordenada al origen a la recíproca del valor máximo de unión

antígeno-anticuerpo. Además extrapolando la misma al eje x se obtiene el valor igual a $-1/V_{p0,5}$.

Por lo tanto $V_{p0,5}$ se puede calcular a partir de los parámetros de esta recta. De esta manera el título de los anticuerpos se determina considerando todos los puntos de la curva de unión antígeno-anticuerpo, promediando los errores experimentales asociados a la detección de la misma (Mizutamari *et al.* 1994). Los títulos determinados se expresan en unidades arbitrarias (UA).

3.e. Ensayo de inhibición por antígeno soluble (SABIA)

El análisis de especificidad de los anticuerpos anti-GSL fue realizado mediante la pre-incubación de los sueros (o anticuerpos inmuno-purificados) con concentraciones convenientes de antígeno soluble (glicolípidos o KLH). Al cabo de 1 h, la reactividad no eliminada por la pre-incubación fue analizada y cuantificada por ensayos de TLC-Inmunotinción.

3.f. Purificación de poblaciones de anticuerpos anti-gangliósidos

Según el protocolo (Hirabayashi *et al.* 1983) se incubaron 1,5 ml del gangliósido (0,25 μ mol en metanol: KCl 0,2 M (1:1 v/v)) con 1 ml de octyl-Sepharose (*Sigma, St. Louis, MO, USA*) por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Luego el gel fue lavado 3 veces con 5 volúmenes de cama de PBS. Los pasos restantes fueron realizados a 4°C. Alícuotas del gel (0,2 ml) fueron cargadas en columnas de 0,5 x 0,5 cm. Las muestras de suero fueron circuladas a través de la columna 3 veces. El material no retenido se reservó. Luego de lavar la columna con PBS, se eluyeron los anticuerpos usando tiocianato de potasio (KSCN) 3 M en PBS (5 volúmenes de cama). Las fracciones de material eluído fueron desalinizadas en una columna de exclusión molecular Sephadex G-

25 (*Sigma, St. Louis, MO, USA*) de 6 x 0,5 cm y diluías al volumen original de suero con PBS-BSA 1%. Todas las fracciones (no retenidas y eluidas) fueron alicuotadas y almacenadas hasta su utilización a -20 °C.

3.g. Afinidad relativa de anticuerpos IgM anti-gangliósidos

Para la estimación de la afinidad relativa de los anticuerpos anti-gangliósidos se realizaron lavados con KSCN 1 M y 3 M a las placas de TLC-I luego de la incubación con los sueros, y previo a la incubación con el anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas M de conejo conjugados a HRP, en una dilución 1/2000 en BSA 1%-PBSt. Se consideraron como anticuerpos de baja afinidad relativa a aquellos eliminados por el lavado con KSCN 1 M, mientras que los anticuerpos resistentes fueron considerados como de alta afinidad relativa (Mizutamari *et al.* 1994).

3.h. Detección de KLH con PNA mediante Western blot

Debido al elevado peso molecular (PM) de la proteína KLH, se realizaron geles de poliacrilamida en gradiente (4-10 %). Se sembraron 3 µg de proteína por pocillo y se corrieron a voltaje constante (90V). La transferencia a membranas de nitrocelulosa se realizó por 40 min a 350 mA.

A fin de detectar el epítoto Galβ1-3GalNAc en la proteína KLH, las membranas fueron primero bloqueadas con PVP al 1 % en buffer TBS (Buffer salino Tris) y tween-20 al 0.05 %. PNA se incubó toda la noche a 4°C con la lectina del maní (PNA) conjugada a biotina (0.002 µg/µl) para luego ser incubada 30 min a temperatura ambiente con streptavidina conjugada a IRDye 800 CW

(1/30000). El revelado de las membranas se llevó a cabo mediante el sistema de captura de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR).

La presencia de anticuerpos anti-KLH en suero pre-inmune se determinó mediante incubación de las membranas de nitrocelulosa (previamente transferidas y bloqueadas) con los sueros de conejos 1/20 toda la noche a 4°C. Posteriormente se incubó con anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas M de conejo conjugado a HRP, en una dilución 1/2000 en polivinilpirrolidona (PVP) 1%-TBSt. Después de lavar se reveló utilizando una solución de sustrato conteniendo: 2,8 mM de 4-cloro-1-naftol y 0,01% de H₂O₂ en metanol-20 mM de buffer Tris/HCl, pH 7,4 (1:29) a temperatura ambiente. Las inmunotinciones fueron escaneadas para su análisis.

4. Periodación de KLH

4.a. Ensayo de periodación

Se sensibilizaron placas de microtitulación con 50 µl de una solución de KLH (10 µg/ml) en buffer carbonato (NaHCO₃ 0,1 M pH 8,3 NaCl 0,5 M) toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados con buffer acetato de sodio 50 mM pH 4,5, los glicanos de KLH se oxidaron con 50 µl de periodato de sodio 15 mM en buffer acetato por 1 h en oscuridad. Los pocillos se lavaron nuevamente con buffer acetato de sodio. Los aldehídos reactivos generados fueron bloqueados mediante la posterior incubación con 50 µl de borohidruro de sodio 50 mM en PBS por 30 min. Luego de 3 lavados con PBS, los reservorios fueron bloqueados con BSA 1%-PBSt durante 1 h (100 µl/reservorio) (Woodward *et al.* 1985).

A continuación se incubó por 2 h con PNA conjugada a HRP 20 µg/ml (Sigma) en BSA 1%-PBSt. Alternativamente, se incubaron diluciones convenientes de los sueros en BSA 1%-PBS (50 µl/reservorio) toda la noche.

Luego de 3 lavados con PBS se incubó por 1,5 h con anticuerpos específicos contra inmunoglobulinas G de conejo conjugados a HRP, en una dilución 1/2000 en BSA 1%-PBS. Todos los pasos de revelado fueron idénticos a aquellos descritos en el protocolo de ELISA (Woodward *et al.* 1985).

4.b. Ensayo de biotilación-oxidación

El pH de una solución (200 µg/ml) de proteína en PBS (BSA o KLH) fue ajustado con NaOH 1M para luego ser incubada con hidroxisuccinamida biotilada en DMF (10 µg/ml) por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente la solución fue dializada con PBS a 4°C durante toda la noche y se utilizó para sensibilizar placas de microtitulación (50 µl/resevorio - 10 µg/ml) en buffer carbonato (NaHCO₃ 0,1 M pH 8,3 NaCl 0,5 M) toda la noche a 4°C. Las proteínas biotiladas fueron oxidadas mediante el protocolo de periodato de sodio descrito anteriormente.

El revelado se llevó a cabo directamente utilizando una solución de o-fenilendiamina 15 mM y H₂O₂ 0,015% en buffer acetato de sodio, pH 5,0; a temperatura ambiente. El desarrollo de color fue frenado después de 30 min por la adición de H₂SO₄ 0,5 N (50 µl/reservorio) para luego medir la densidad óptica (DO) a 490 nm (Bio-Rad Microplate Reader - Model 630).

RESULTADOS

"No todo lo que cuenta puede ser cuantificado, y no todo lo que puede ser cuantificado cuenta" Albert Einstein

RESULTADOS

1. Sueros pre-inmunes

En el suero de todos los animales, antes de ser inmunizados, se detectaron reactividades de anticuerpos anti-gangliósidos (GA1, GM1 y GD1b) de isotipo IgM. A modo de ejemplo se muestran reactividades observadas en el suero pre-inmune de cuatro conejos (Figura 12). Cabe destacar que en las placas se separaron por cromatografía los siguientes gangliósidos GA1, GM1, GD1a, GD1b y GT1b, sin embargo no se detectaron en ningún caso la presencia de anticuerpos que reconozcan GD1a y/o GT1b (Figura 12).

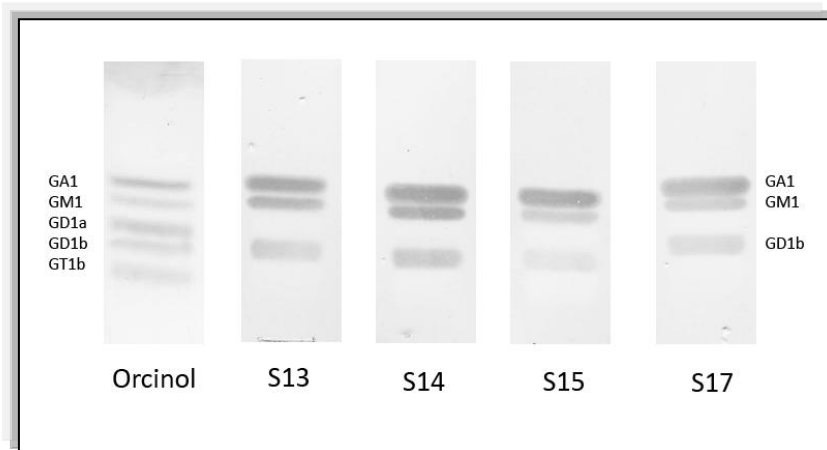


Figura 12. Reactividad de anticuerpos en sueros pre-inmune

Las reactividades de anticuerpos anti-gangliósidos (GA1, GM1 y GD1b) de isotipo IgM fueron detectadas mediante TLC-I en distintos sueros pre-inmunes a una dilución de 1 en 20. Mediante tinción con orcinol se observan todos los gangliósidos que fueron sembrados en las placas.

2. Inmunización con KLH/gangliósidos

Con el objetivo de reproducir el modelo experimental del SGB en conejos, se utilizó KLH como proteína *carrier*. Los animales fueron inmunizados siguiendo el protocolo clásico, con un inóculo constituido por la mezcla de KLH y BBG (KLH/BBG).

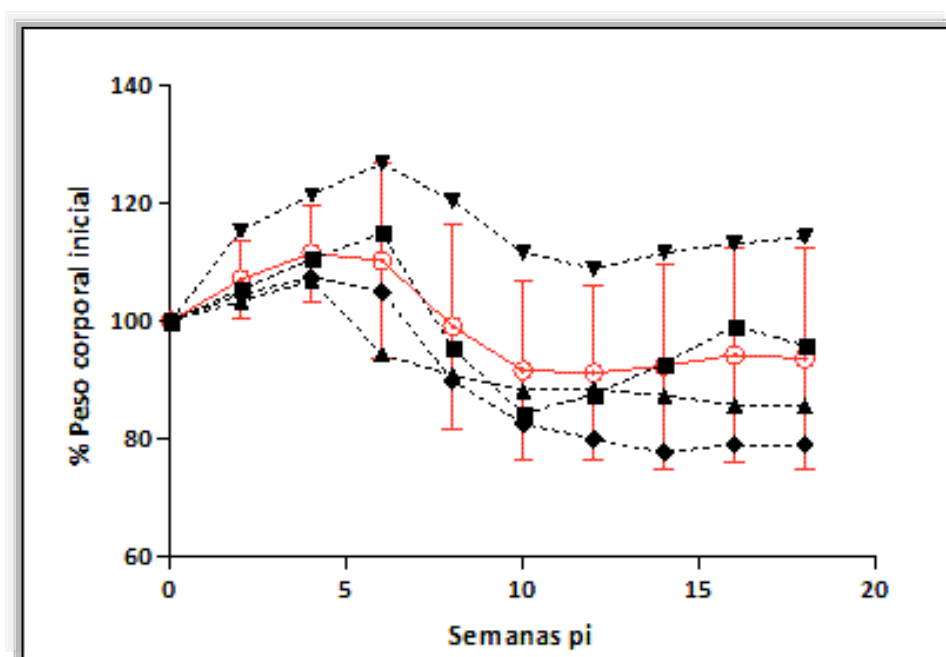


Figura 13. Pesos de animales del Grupo KLH/BBG

Variación del peso de animales a lo largo de las semanas luego de haber sido inmunizados con BBG y KLH. En líneas punteadas se grafican los datos individuales. En línea completa roja se grafica el promedio y su respectiva desviación estándar. $n=4$.

Como resultado, el 100% de los animales de este grupo enfermó con una heterogeneidad clínica de la neuropatía similar a la observada en humanos (Tabla 2). En la Figura 13 se observa la caída pronunciada del peso en todos los animales asociada al comienzo de la enfermedad.

La heterogeneidad se vio reflejada no sólo en la severidad de la enfermedad, (la cual varió entre los grados 1 y 3) sino también en el momento en que comenzaron los signos clínicos. Los animales mostraron una pérdida de

peso corporal de alrededor del 25% con respecto al momento de la inmunización, así como debilidad muscular, temblores y parálisis.

Grupo KLH/BBG	Severidad (grados 1-3)	Aparición (semanas)
S23	1	7
S24	1	5
S25	2	7
S26	2	6
S43	1	11
S44	2	11
S45	3	5

Tabla 2. Severidad clínica y semana de aparición en el grupo KLH/BBG

Se detallan para cada animal del grupo KLH/BBG, la semana en la que se observó el comienzo en la reducción del peso corporal (aparición) y el grado de severidad clínica.

El comienzo de los síntomas se observó entre la semana 5 y 11 post-inmunización (Tabla 2). En dicho experimento sólo un animal falleció a causa de la enfermedad (grado 3 de severidad clínica). El resto de los mismos se recuperaron espontáneamente luego de algunas semanas, en forma similar a lo observado en pacientes humanos.

Por otro lado, al igual que los títulos de anticuerpos anti-GM1 medidos en los sueros de pacientes con SGB, el valor determinado en los conejos del grupo KLH/BBG fue altamente variable.

Como ya se mencionó anteriormente, los anticuerpos de isotipo IgM anti-GM1 se encuentran normalmente presentes en el suero de los animales pre-*inmunes* (Figura 12) aunque poseen un título muy bajo que no puede ser detectado mediante el ensayo de ELISA. Sin embargo, luego de la inmunización con KLH/BBG, este título se incrementó (en promedio 6000 UA para IgM y 12000 para IgG). Es importante destacar que los valores máximos de títulos de

anticuerpos anti-GM1 varían enormemente en cada conejo, (se detectaron valores máximos de hasta 30000 UA para el isotipo IgG).

Por otro lado, en promedio, el valor máximo para el isotipo IgM se observa en la semana 5 post-inmunización, mientras que para el isotipo IgG se detecta alrededor de la semana 7 luego de la inmunización. Debido a esta gran variabilidad se grafican los títulos de anticuerpos IgM e IgG anti-GM1 determinados a diferentes semanas post-inmunización en un animal representativo (Figura 14).

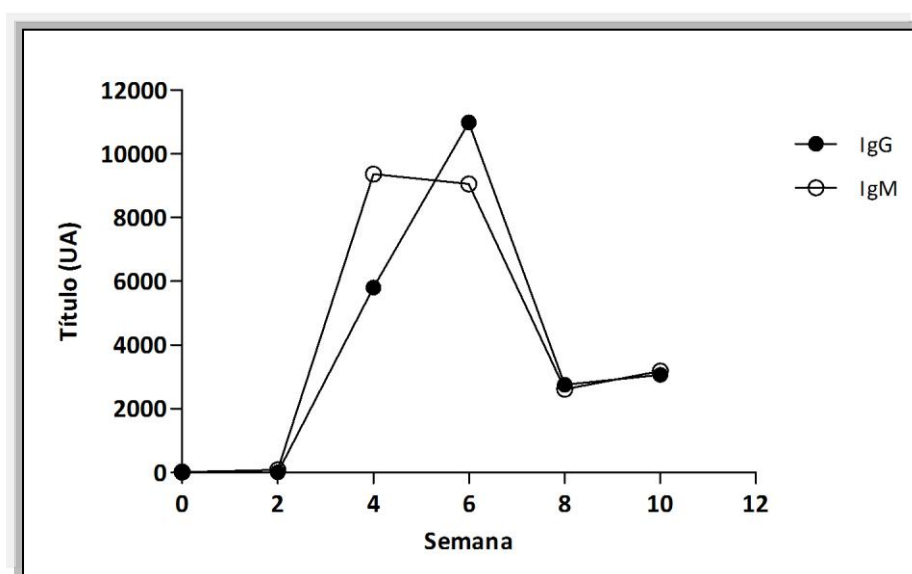


Figura 14. Títulos de anticuerpos anti-GM1 IgM e IgG en el Grupo KLH/BBG

Caso representativo de la variación del título de anticuerpos anti-GM1 en el suero de un animal luego de haber sido inmunizado con KLH y BBG. El marcador blanco indica la variación del isotipo IgM mientras que el marcador negro indica la variación en el isotipo IgG.

Al evaluar las reactividades en TLC-I, todos los sueros pre-inmunes presentaron reactividades de anticuerpos anti-gangliósidos de isotipo IgM, las cuales se incrementaron luego de la inmunización (Figura 15), en concordancia con lo observado en la determinación de los títulos de anticuerpos. Asimismo, se observa un incremento de la reactividad de anticuerpos IgG anti-gangliósidos alrededor de la semana 4, estas reactividades se mantienen constantes a lo largo de las semanas post-inmunización (Figura 15).

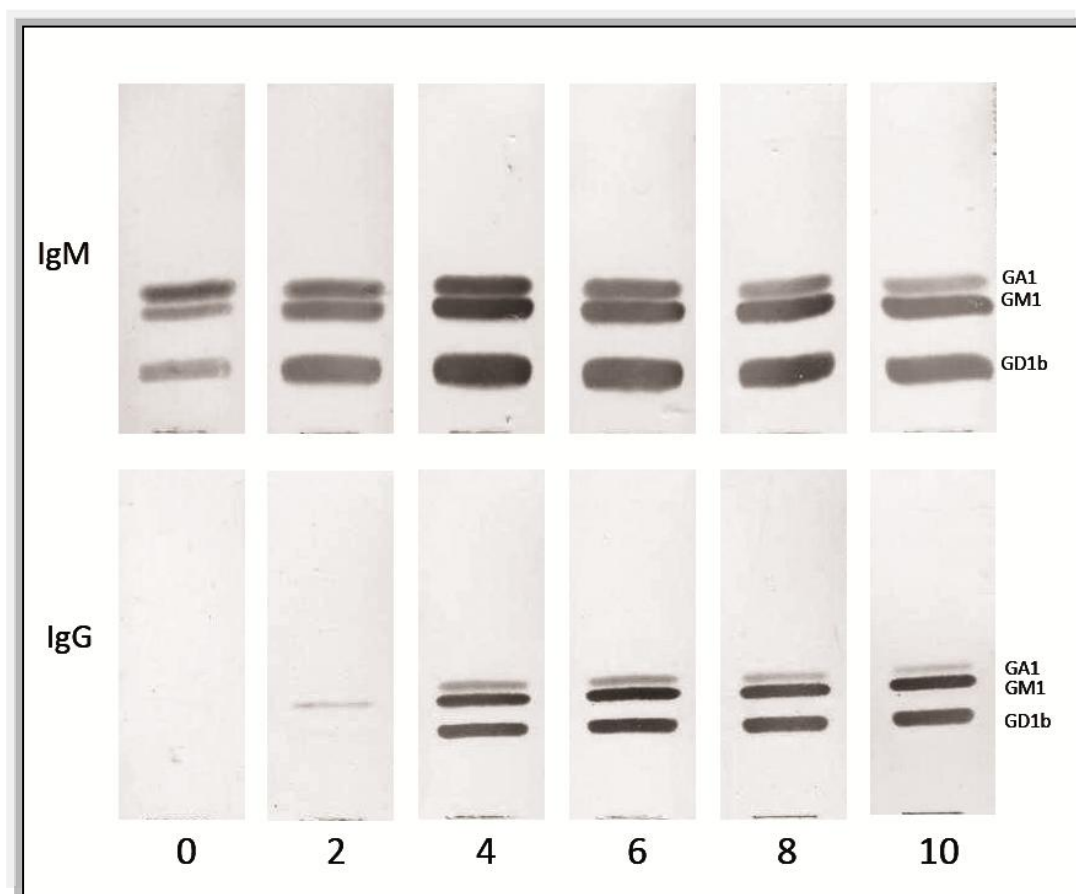


Figura 15. Reactividad de anticuerpos anti-gangliósidos en el Grupo KLH/BBG

Ejemplo representativo de las reactividades de los anticuerpos anti-gangliósidos (GA1, GM1, GD1b) para los isotipos IgM e IgG a distintas semanas post-inmunización determinados mediante TLC-I. Se utilizó suero de un animal inmunizado con BBG y KLH a diferentes diluciones. Para las semanas 0 y 2 se utilizó una dilución 1 en 20 y para las siguientes semanas una dilución 1 en 500.

3. Inmunización con gangliósidos

Un grupo de conejos control fue inmunizado sólo con gangliósidos (Grupo BBG) y luego monitoreado por más de 15 semanas, durante este período de tiempo no mostraron reducción significativa del peso (Figura 16). Adicionalmente ninguno de los animales inmunizados exhibió signos clínicos de enfermedad.

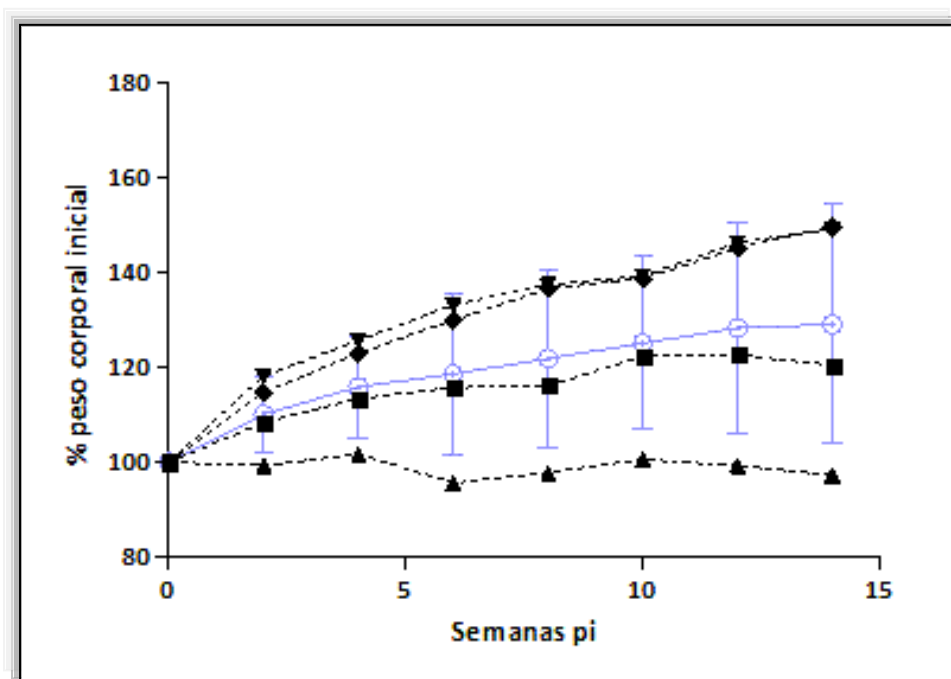


Figura 16. Pesos de los animales del Grupo BBG

Variación en el peso de los animales a lo largo de las semanas luego de haber sido inmunizados con BBG. En líneas punteadas se grafican datos individuales. En líneas completas azules se grafica el promedio y su respectiva desviación estándar. n=4.

Al evaluar la presencia y reactividad de los anticuerpos anti-gangliósidos mediante TLC-I se observó, en primer lugar, la presencia de anticuerpos de isotipo IgM anti-GM1, GA1 y GD1b en el suero pre-inmune (Figura 17). A lo largo de las semanas, los anticuerpos IgM anti-gangliósidos se vieron incrementados, sin embargo los anticuerpos anti-gangliósidos de isotipo IgG no se observaron en ningún momento a lo largo del experimento (Figura 17).

Si bien mediante TLC-I se observa la presencia de anticuerpos anti-GM1 de isotipo IgM, no fue posible determinar los títulos, probablemente debido al límite de detección de la técnica de ELISA. Este ensayo nos indica que los gangliósidos por sí solos son poco inmunogénicos.

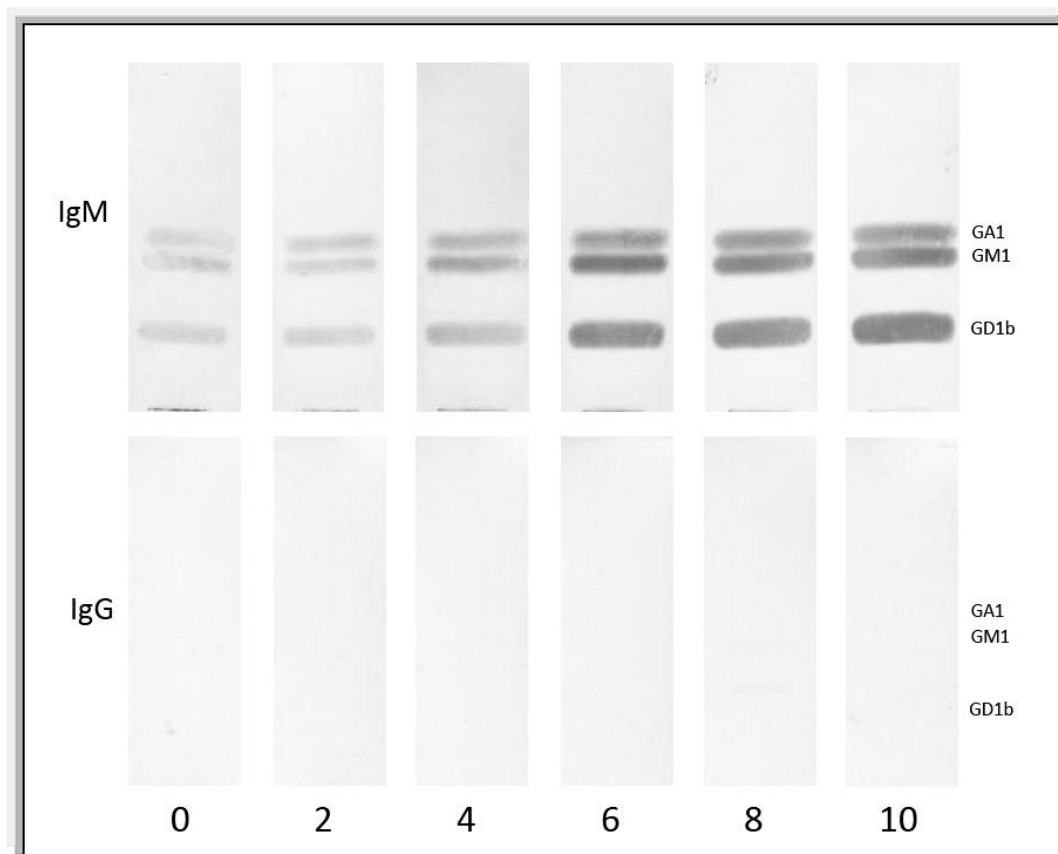


Figura 17. Reactividad de anticuerpos anti-gangliósidos en el Grupo BBG

Caso representativo de las reactividades de los anticuerpos anti-gangliósidos (GA1, GM1, GD1b) para los isotipos IgM e IgG a distintas semanas post-inmunización determinadas mediante TLC-I. Se utilizó el suero de un animal inmunizado con una mezcla de BBG a diferentes diluciones. Para las semanas 0 y 2 se utilizó una dilución 1 en 20 y para las siguientes semanas una dilución 1 en 500.

4. Inmunización con BSAm/BBG

A fin de incrementar la inmunogenicidad de los gangliósidos, el mismo experimento se repitió pero utilizando BSAm como proteína *carrier* en la emulsión con gangliósidos (Grupo BSAm/BBG). Uno de los animales inmunizados con esta mezcla mostró una reducción del peso corporal luego de la semana 10 post-inmunización (Figura 18). Al promediar los pesos de los animales del grupo se observa una reducción de alrededor del 13% en

promedio. Sin embargo no se evidenció ningún signo clínico de enfermedad a lo largo del experimento en ninguno de los animales del grupo.

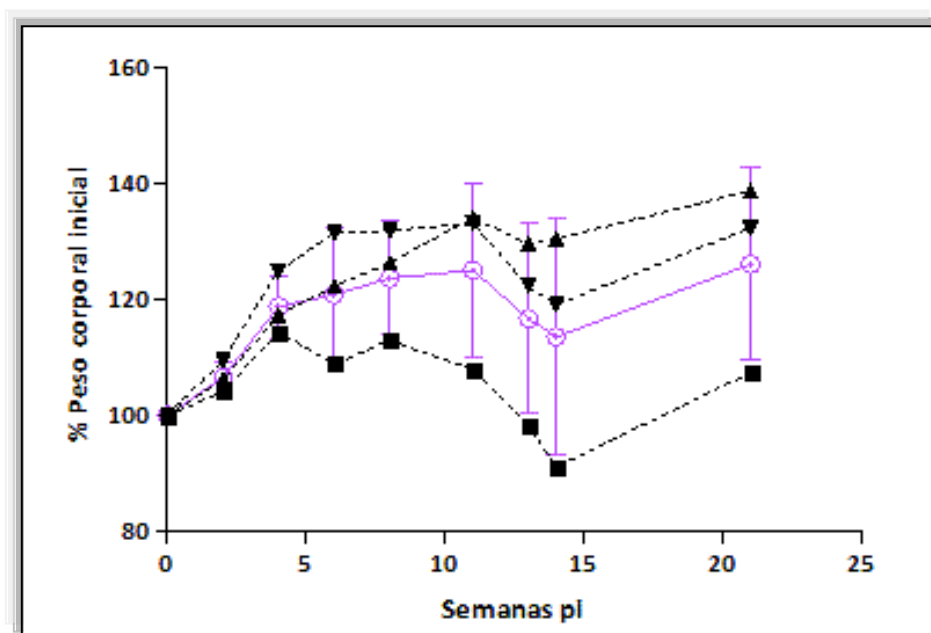


Figura 18. Pesos de los animales del Grupo BSAm/BBG

Variación del peso de los animales a lo largo de las semanas luego de haber sido inmunizados con BBG y BSAm. En líneas punteadas se grafican los datos individuales. En línea completa violeta se grafica el promedio y su respectiva desviación estándar. n= 3.

Por otro lado, se realizó la medición de los títulos de los anticuerpos anti-GM1 mediante la técnica de ELISA a distintas semanas post-inmunización para los isotipos IgG e IgM. Se detectó un incremento de los mismos alrededor de la semana 4 luego de la inmunización para ambos isotipos, como se muestra en el ejemplo representativo de la Figura 19. Cabe destacar que los títulos de anticuerpos anti-GM1 (tanto de isotipo IgM e IgG) fueron menores a los obtenidos en el grupo KLH/BBG (Figuras 19 y 14). Para el grupo BSAm/BBG, los valores máximos de títulos promediados fueron 600 UA para IgM y 400 UA para IgG.

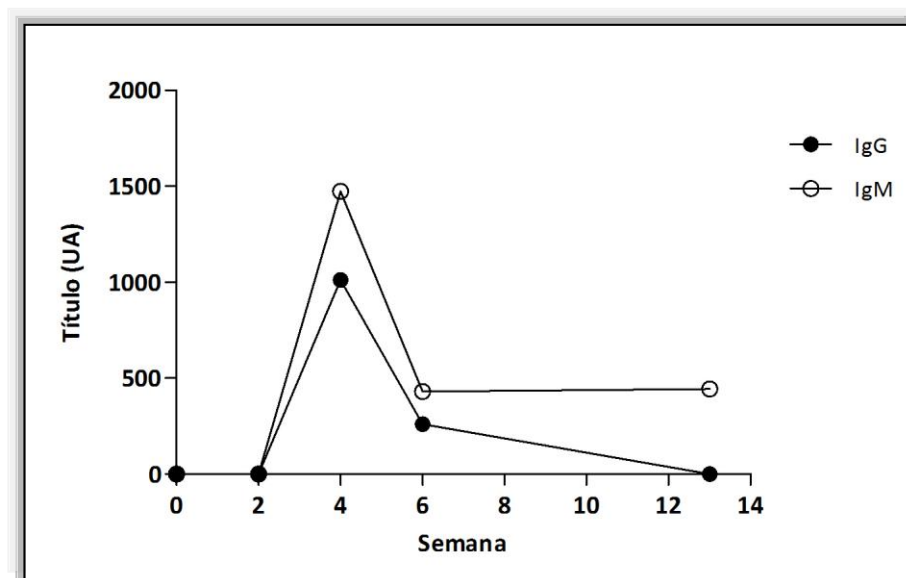


Figura 19. Título de anticuerpos anti-GM1 IgM e IgG en el Grupo BSAm/BBG

Caso representativo de la variación del título de anticuerpos anti-GM1 en el suero de un animal luego de haber sido inmunizado con BBG y BSAm. El marcador blanco indica la variación del isotipo IgM mientras que el marcador negro indica la variación en el isotipo IgG.

Finalmente se evaluó la reactividad de los sueros contra gangliósidos mediante TLC-I. En todos los casos los anticuerpos de isotipo IgM anti-gangliósidos se incrementaron a lo largo de las semanas. Mientras que al evaluar los anticuerpos de isotipo IgG, éstos aparecen con grados variables de intensidad y generalmente alrededor de la semana 4 luego de la inmunización (Figura 20).

Si bien la presencia de BSAm en la emulsión incrementa la respuesta inmune, con respecto a la inmunización con BBG (incremento del título de anticuerpos anti-GM1 y aparición de anticuerpos IgG anti-gangliósidos), la misma no resulta ser suficiente para inducir un efecto patológico.

La evaluación de los tres modelos de inmunización descriptos (KLH/BBG, BBG y BSAm/BBG) nos indica que la proteína KLH es, de algún modo, necesaria para inducir la enfermedad en los animales.

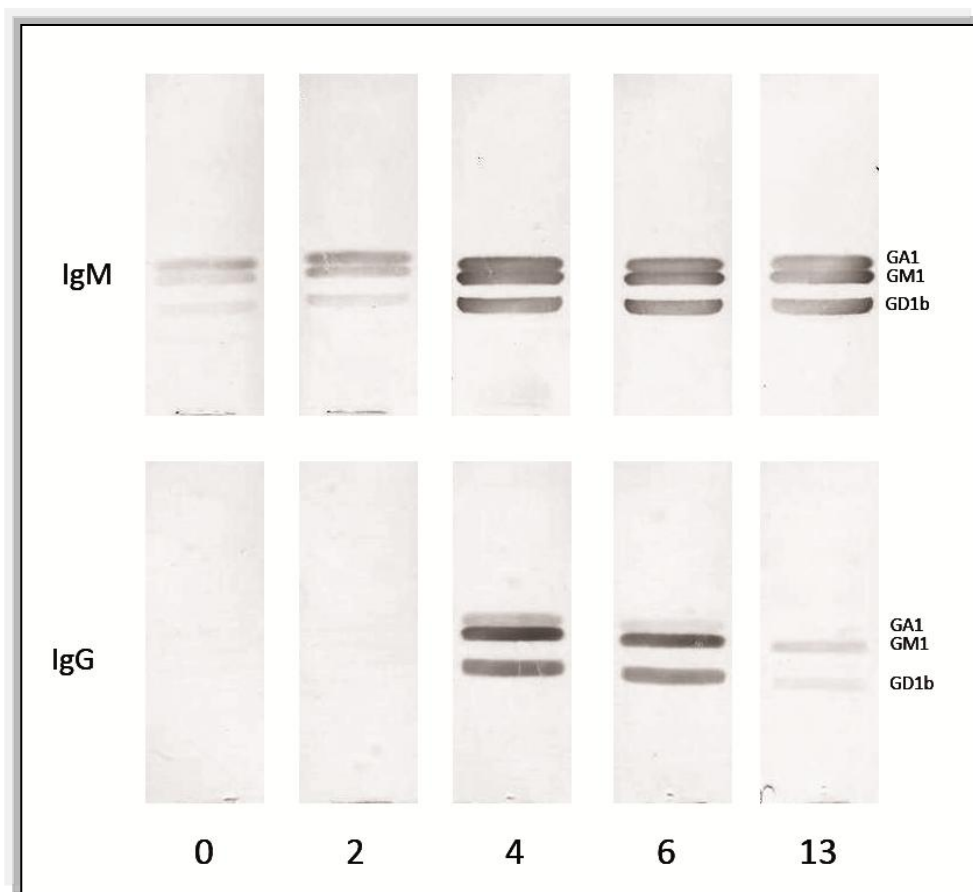


Figura 20. Reactividad de anticuerpos anti-gangliósidos en el Grupo BSA/BGG

Caso representativo de las reactividades de los anticuerpos anti-gangliósidos (GA1, GM1, GD1b) para los isotipos IgM e IgG a distintas semanas post-inmunización determinados mediante TLC-I. Se utilizó el suero de un animal inmunizado con BGG y BSA a diferentes diluciones. Para las semanas 0 y 2 se utilizó una dilución 1 en 20 y para las siguientes semanas una dilución 1 en 500

5. Inmunización con KLH

5.a. Animales inmunizados con KLH

A fin de evaluar la función que cumple la proteína KLH en el sistema empleado para generar la neuropatía, se procedió a inmunizar conejos sólo con KLH y ACF (Grupo KLH).

Como resultado, ninguno de estos los animales exhibió una reducción de peso a lo largo de las semanas luego de ser inmunizados (Figura 21). Tampoco se observaron signos clínicos de enfermedad.

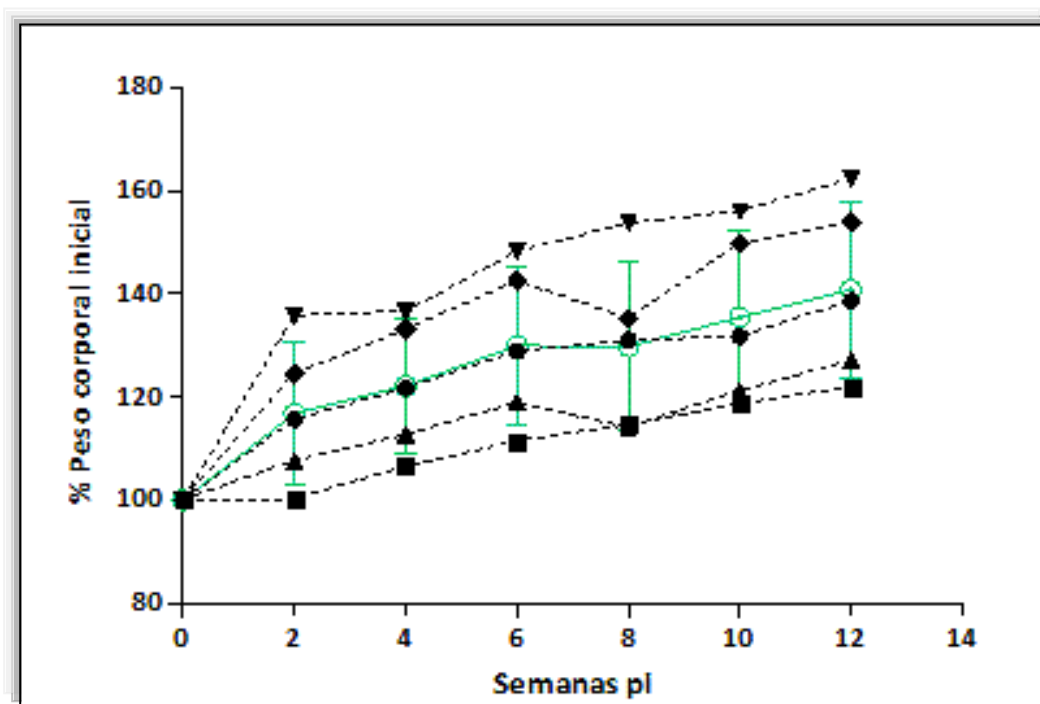


Figura 21. Pesos de los animales en el Grupo KLH

Variación del peso de los animales a lo largo de las semanas luego de haber sido inmunizados con KLH. En líneas punteadas se grafican los datos individuales. En línea completa se grafica el promedio y su respectiva desviación estándar. n=5.

No fue posible detectar el título de anticuerpos anti-GM1 mediante ELISA, en los sueros recolectados a lo largo del experimento. Sin embargo, mediante TLC-I, pudieron evaluarse las reactividades de los anticuerpos anti-gangliósidos. De esta forma se observó que la inmunización afecta a la producción de anticuerpos de isotipo IgM anti-gangliósidos, generando un incremento de estos a partir de la semana 4 luego de la inmunización (Figura 22).

Con respecto al isotipo IgG, llamativamente, la inmunización con KLH generó la aparición de una banda correspondiente a anticuerpos anti-GA1 a tiempos posteriores a las 4 semanas post-inmunización (Figura 22). Este

resultado nos condujo a la necesidad de estudiar más en detalle la respuesta inmune producida por la proteína KLH.

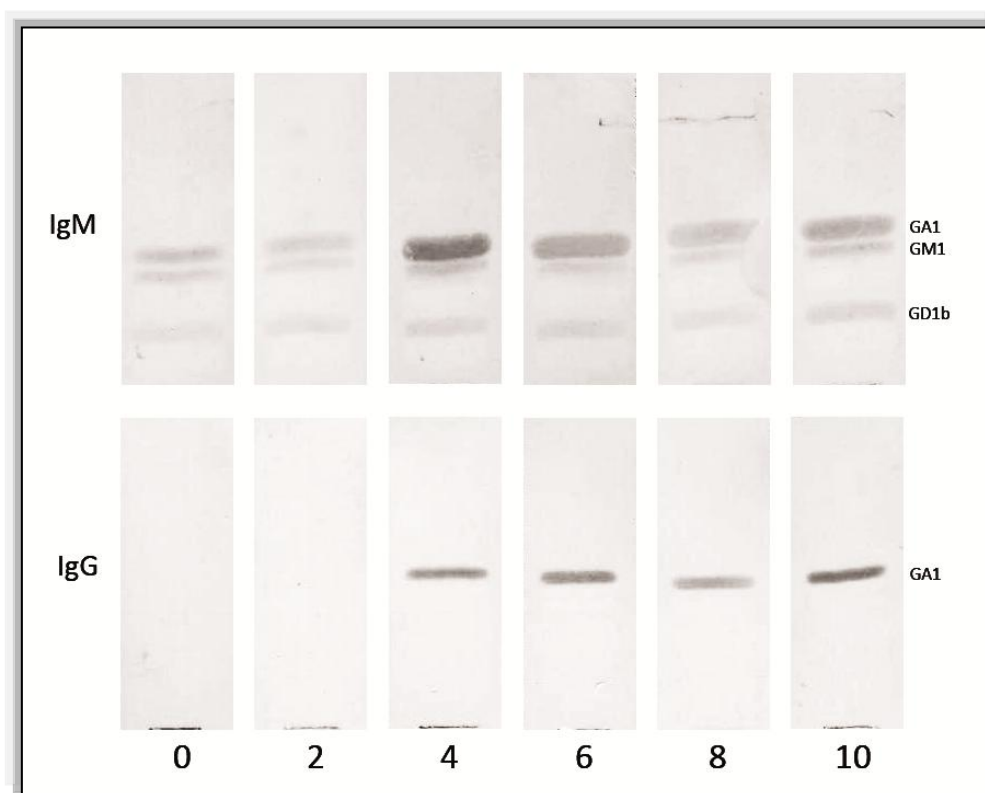


Figura 22. Reactividad de anticuerpos anti-gangliósidos en el Grupo KLH

Caso representativo de las reactividades de los anticuerpos anti-gangliósidos (GA1, GM1, GD1b) para los isotipos IgM e IgG a distintas semanas post-inmunización determinados mediante TLC-I. Se utilizó el suero de un animal inmunizado con KLH a una dilución 1 en 20.

5.b. Respuesta inmune dirigida a KLH

Se determinaron los títulos de anticuerpos anti-KLH de isotipo IgG e IgM en el suero de distintos animales inmunizados con KLH. Se observa al promediar, que el título máximo del isotipo IgM se encuentra entre la semana 2 y 4, mientras que el título máximo del isotipo IgG se ubica en la semana 6 (Figura 23). En todos los casos, el título de anticuerpos anti-KLH fue extremadamente elevado principalmente para el isotipo IgG en el que determinaron títulos de hasta 500000 UA.

Se detectó además, en el suero pre-inmune (semana 0 pi) la presencia de anticuerpos anti-KLH de isotipo IgM con títulos de alrededor de 200 UA (Figura 23).

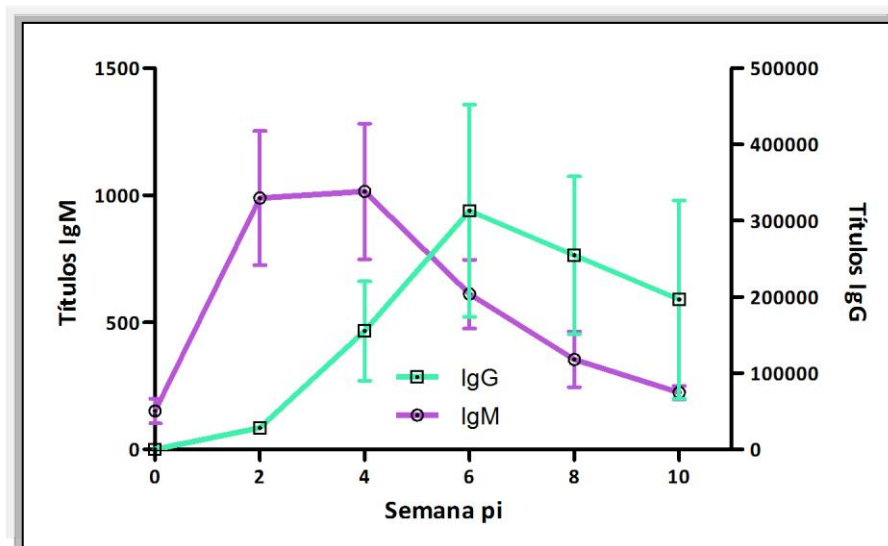


Figura 23. Títulos de anticuerpos anti-KLH IgM e IgG

Promedio de los títulos de los animales a lo largo de las semanas luego de haber sido inmunizados con KLH y BBG (Grupo KLH/BBG). El isotipo IgG se grafica con marcador cuadrado verde. El isotipo IgM se grafica mediante marcador redondo violeta. Las barras indican la desviación estándar. N=4

Aproximadamente el 4% de la masa molecular de KLH está conformada por componentes glucídicos (Harris y Markl 1999), y se postula que tales componentes son de gran importancia en la antigenicidad de esta molécula (Kurokawa *et al.* 2002). Debido a que la inmunización de animales con la proteína KLH dio lugar a la producción de anticuerpos que reaccionaron con gangliósidos, se evaluó la contribución de los glicanos de KLH en la respuesta inmune desarrollada. Con este objetivo, los glicanos de KLH fueron oxidados con periodato de sodio y fue medido el título de los sueros de los conejos del Grupo KLH, tanto frente a KLH oxidada (KLHox) como frente a KLH control.

Al evaluar los resultados se observó una pérdida de alrededor del 75% del título de los anticuerpos anti-KLH luego de la oxidación (Desde 24000 UA a 6800 UA) (Figura 24).

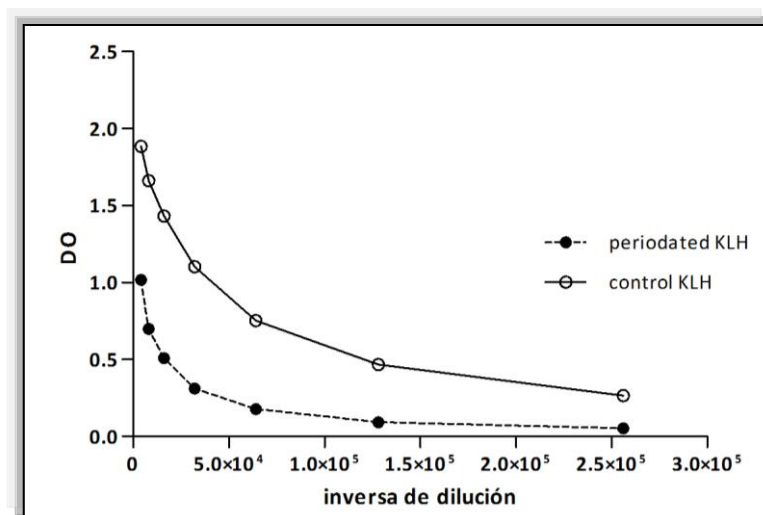


Figura 24. Anticuerpos anti-glicanos de KLH

Caso representativo la unión de anticuerpos a la proteína KLH o KLH oxidada con periodato de sodio inmovilizada a una placa de ELISA. El suero utilizado corresponde a un animal inmunizado solo con KLH. El marcador negro indica la unión a KLH oxidada y el marcador blanco indica la unión a KLH control.

Los glicoconjugados (glicolípidos, glicoproteínas) pueden compartir algunas estructuras glucídicas. El determinante Gal β (1-3)GalNAc se encuentra presente tanto en algunos glicolípidos (porción glucídica terminal de los gangliósidos GA1/GM1/GD1b) como en glicoproteínas (Momoi *et al.* 1982). Como la lectina PNA tiene la habilidad de unirse al determinante Gal β (1-3)GalNAc, su presencia en la proteína KLH fue evaluada. La presencia del determinante en la proteína KLH se detectó mediante dot blot, western blot y ELISA (Figura 25 y 27), tal como ha sido descrito en la bibliografía (Wirguin *et al.* 1995). La capacidad de unión de PNA fue eliminada completamente cuando KLH se sometió previamente al proceso de oxidación con periodato de sodio (Figura 25).

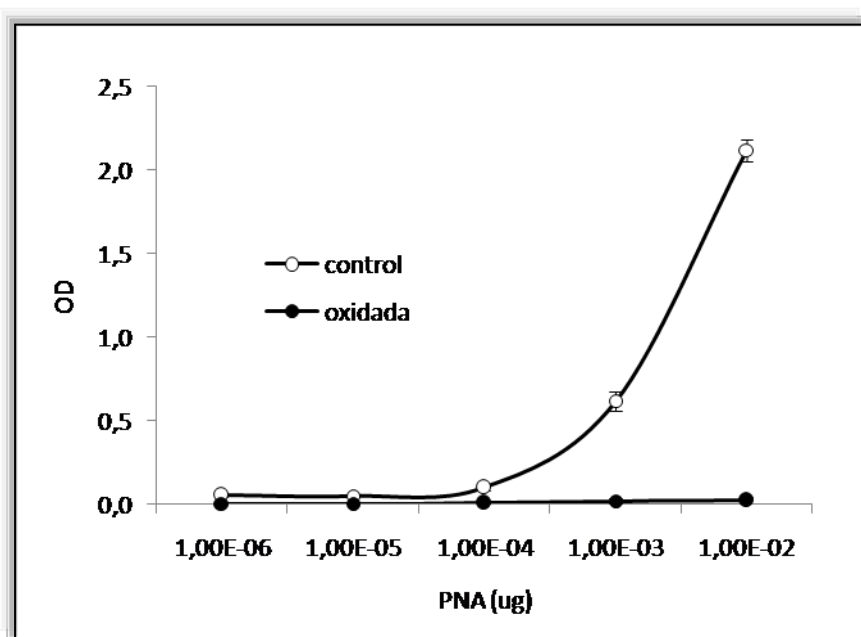


Figura 25. Unión de PNA a KLH y KLH oxidada

Unión de la lectina PNA a la proteína KLH oxidada (marcador negro) y sin oxidar (marcador blanco). La unión se determinó mediante ELISA, en la cual se utilizaron 10 µg/ml de KLH para sensibilizar. Se grafica el promedio y su respectiva desviación estándar.

Como control experimental se comprobó que el tratamiento de periodación no desprende las proteínas de la base sólida. Para ello KLH fue biotinilada y sometida al mismo proceso de oxidación (Figura 26).

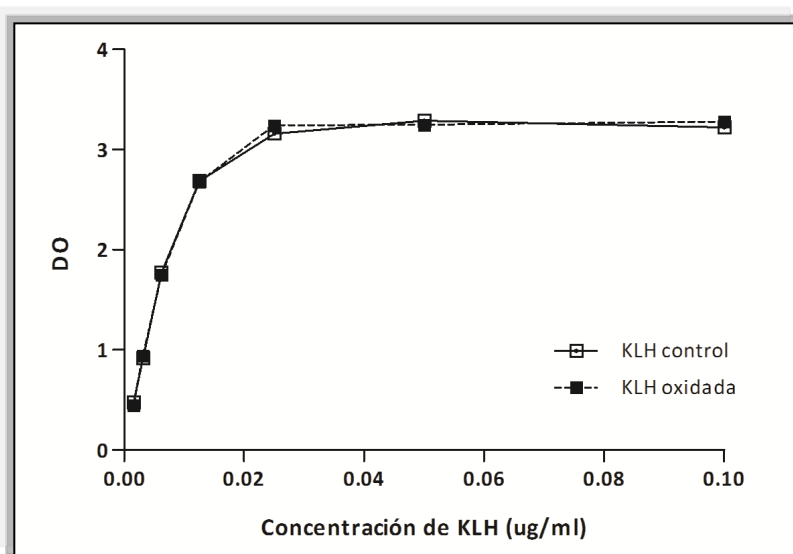


Figura 26. Control de pérdida de proteínas

Presencia de KLH biotinilada adherida a la superficie sólida antes y después de haber sido oxidada mediante tratamiento con periodato de sodio.

Por otro lado se comprobó mediante dot blot que BSAm, a diferencia de KLH, no es reconocida por la lectina PNA, es decir que no contendría el epítipo Gal β (1-3)GalNAc (Figura 27).

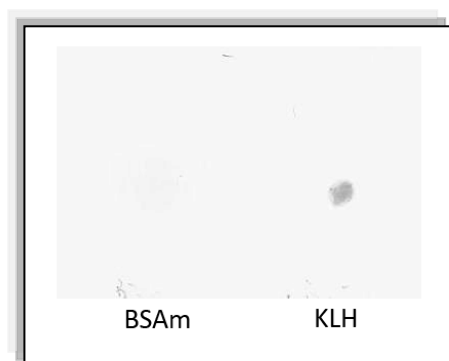


Figura 27. Unión de PNA a KLH y BSAm

Dot blot en el que se sensibilizó con 50 μ g de BSAm o KLH. La presencia del determinante Gal β (1-3)GalNAc se evalúa mediante determinación de la unión de PNA-HRP (2 μ g/ml).

5.c. Reactividad cruzada de anticuerpos

Se estudió posteriormente la especificidad de los anticuerpos generados en los animales inmunizados sólo con KLH o con KLH/BBG. En los primeros se detectó en general la presencia de anticuerpos de isotipo IgG que reconocen GA1, esta población de anticuerpos es totalmente bloqueada por preincubación con KLH soluble (Figura 28.I).

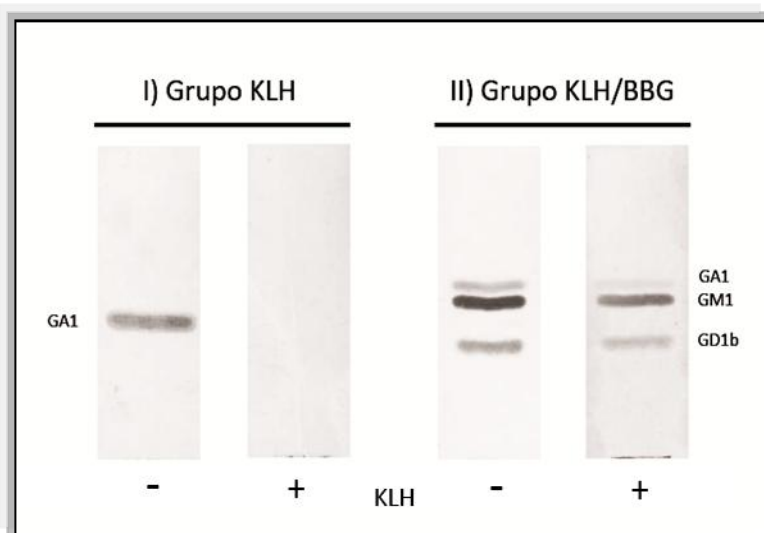


Figura 28. SABIA con KLH soluble

Casos representativos de inhibición de la reactividad de los anticuerpos IgG anti-gangliósidos (GA1, GM1, GD1b) con 100 μ g/ml de KLH determinado mediante SABIA. Se utilizaron sueros de animales inmunizados con I) KLH o II) KLH/BBG.

Por otro lado, todos los animales del Grupo KLH/BBG generaron anticuerpos IgG que reconocen gangliósidos de estructura simple (GA1) y compleja (GM1 y GD1b). Mediante SABIA, estos anticuerpos fueron parcialmente bloqueados por pre-incubación con KLH soluble, indicando la reactividad cruzada de algunas poblaciones (Figura 28.II).

A continuación, se estudió en detalle la inhibición con KLH soluble en los sueros de animales KLH/BBG. Para ello, se evaluó el porcentaje de inhibición en el primer tiempo en que es posible detectar anticuerpos IgG anti-gangliósidos (semana 4 luego de la inmunización). Como resultado se observó que KLH presenta una reactividad cruzada similar con GA1 (64%), GM1 (69%) y GD1b (66%) (Figura 29).

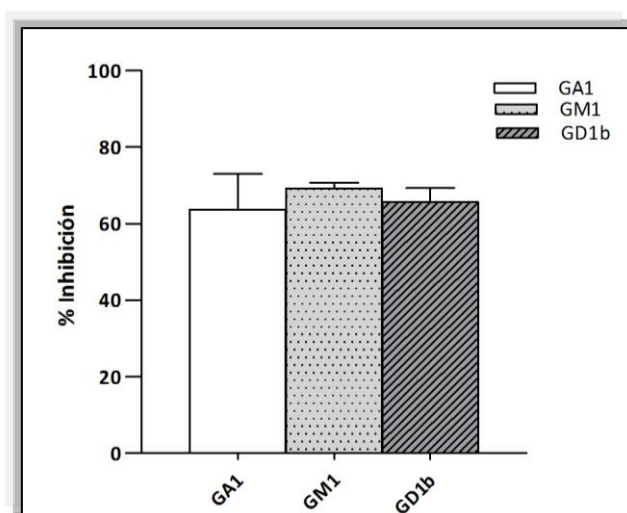


Figura 29. Promedio del porcentaje de inhibición con KLH en la semana 4 post-inmunización

Promedio del porcentaje de inhibición de anticuerpos IgG anti-gangliósidos con KLH soluble (100 $\mu\text{g/ml}$) determinado mediante SABIA. Las barras rayadas representan la inhibición de GD1b, las punteadas GM1 y las blancas GA1. Se utilizaron sueros de la semana 4 post-inmunización a una dilución 1/500. $n=4$. Mediante barras se grafica la desviación estándar.

Al mismo tiempo, se observó que el porcentaje de inhibición de cada anticuerpo anti-gangliósido (anti GA1, GM1 y GD1b) varía ampliamente en cada animal y en cada tiempo post-inmunización. (Figura 30).

Al evaluar distintos casos particulares, pudo observarse una tendencia a reducirse el porcentaje de inhibición de los anticuerpos anti-gangliósidos luego de la semana 4 (inicial), (dicha tendencia se detecta aun promediando valores dispersos entre animales).

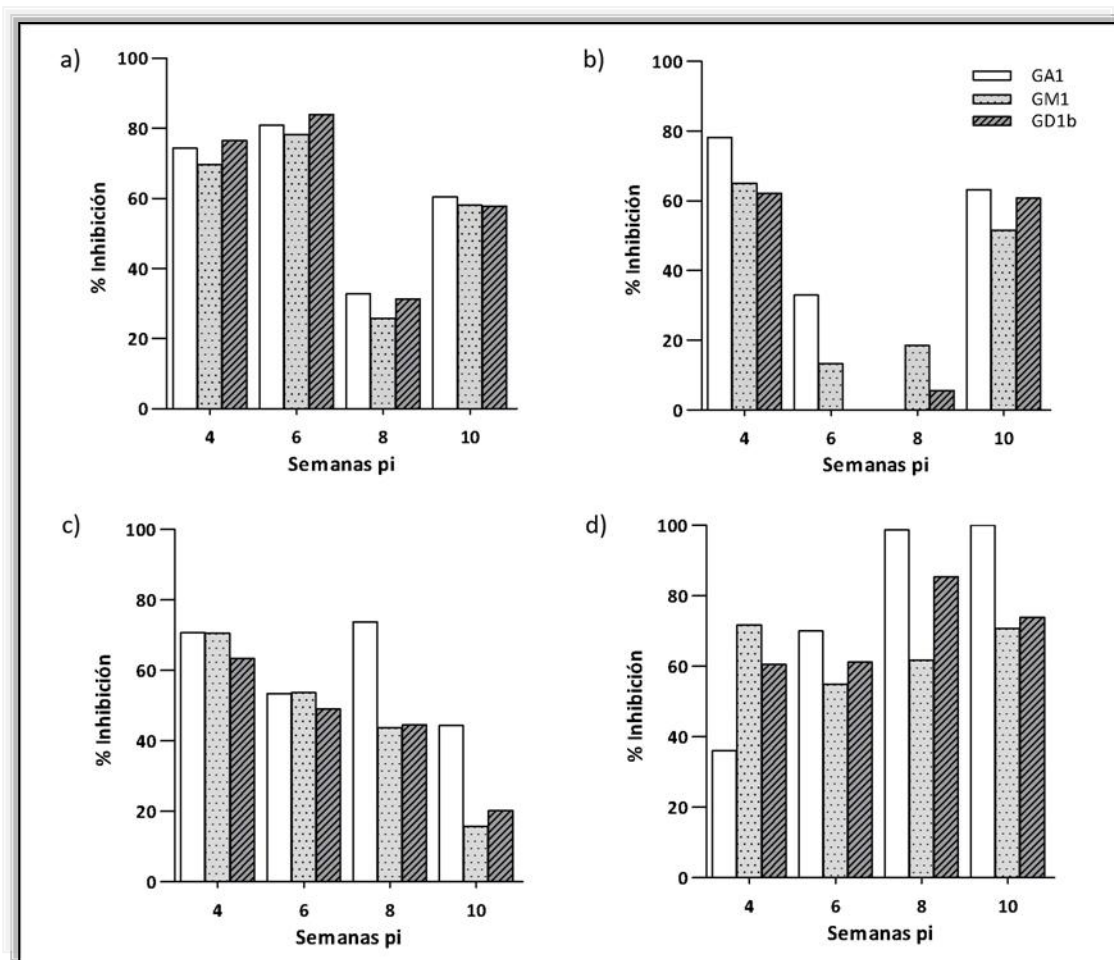


Figura 30. SABIA con KLH soluble en el Grupo KLH/BBG

Porcentaje de inhibición de los anticuerpos IgG anti-gangliósidos con KLH soluble (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) determinado mediante SABIA. Los sueros corresponden a distintas semanas luego de la inmunización con KLH/BBG. La inhibición a lo largo del tiempo varía en cada animal. Se grafican los siguientes ejemplos: a) Conejo S26; b) Conejo S25; c) Conejo S23; d) Conejo S24.

La mayoría de los anticuerpos en un principio reconocen tanto a KLH como a los gangliósidos (66% de los anticuerpos poseen reactividad cruzada en la semana 4) pero luego la proporción se reduce (en promedio 28% de anticuerpos poseen con reactividad cruzada en la semana 8). Esto indicaría la

presencia de una mayor proporción de anticuerpos específicos de gangliósidos. Cuatro casos representativos se observan en la Figura 30.

El aumento de la proporción de los anticuerpos específicos de gangliósidos (es decir de anticuerpos resistentes a la inhibición con KLH soluble) se observa en la mayoría de los casos antes de la aparición de signos clínicos de neuropatía (Tabla 3).

En base a los resultados obtenidos, nos propusimos evaluar la función de la proteína KLH en el modelo experimental.

Semana Animal	Aumento de especificidad anti-Gg	Comienzo disminución de peso	Comienzo de los temblores
S23	6	7	7
S24	4	5	6
S25	6	7	7
S26	8	6	6

Tabla 3. Comparación de parámetros en animales KLH/BBG

Se detalla para cada animal la semana en que se observaron la reducción en el porcentaje de inhibición con KLH, la reducción del peso corporal y los primeros signos clínicos.

6. Evaluación de la función de KLH en el modelo experimental

Las evidencias experimentales indican que la inmunización con KLH/BBG es el único protocolo que desencadena la neuropatía. Utilizar BSA_m como proteína *carrier* estimula la respuesta inmune anti-gangliósidos, con respecto al grupo inmunizado con BBG solo, pero aun así no es suficiente para generar signos clínicos neurológicos. Por otro lado, KLH por si sola es capaz de generar anticuerpos anti-GA1 (detectados mediante TLC-I), es decir posee un efecto “inmunoestimulador específico”. La sumatoria de estos resultados permite

sugerir dos posibles funciones de KLH en el sistema, las cuales no son mutuamente excluyentes:

1. *Rol inmuno-estimulador no específico*: KLH podría ser eficiente como proteína *carrier*, es decir que su presencia en el inmunógeno mejora la respuesta inmune a gangliósidos.

2. *Rol inmuno-estimulador específico*: KLH posee la capacidad de producir anticuerpos con reactividad cruzada (KLH-gangliósidos). Esta respuesta podría luego ser redireccionada por gangliósidos produciendo un cambio de especificidad fina.

Con el objetivo de evaluar dichas funciones se planteó un esquema de inmunización alternativo (Figura 11). El mismo se basa en la inmunización empleando los mismos inmunógenos usados hasta el momento, pero administrados por separado en el mismo animal.

En primer lugar, se inmunizaron conejos con KLH y BBG administrados en distintas emulsiones (KLH+BBG). La proteína KLH demostró previamente su capacidad de estimular levemente la producción de anticuerpos anti-gangliósidos. Este esquema propone estudiar si los gangliósidos poseen la capacidad de re-direccionar la respuesta inmune sin encontrarse en la misma emulsión que KLH.

En segundo lugar, se repitió la inmunización con BSA_m/BBG, mediante la cual, habíamos observado previamente que no se generan signos clínicos de neuropatía. Sin embargo, en este nuevo ensayo se agregó el estimulador específico, es decir que los animales se inmunizaron con un segundo inmunógeno conteniendo sólo KLH y AFC (denominado Grupo BSA_m/BBG+KLH). En este ensayo los gangliósidos poseen una proteína *carrier* (BSA_m) y además un “estimulador específico” (KLH) pero en dos emulsiones diferentes.

Como resultado de la primera prueba, ninguno de los animales del Grupo KLH+BBG evidenció descenso de su peso corporal ni tampoco desarrolló signos de enfermedad a lo largo del experimento (Figura 31).

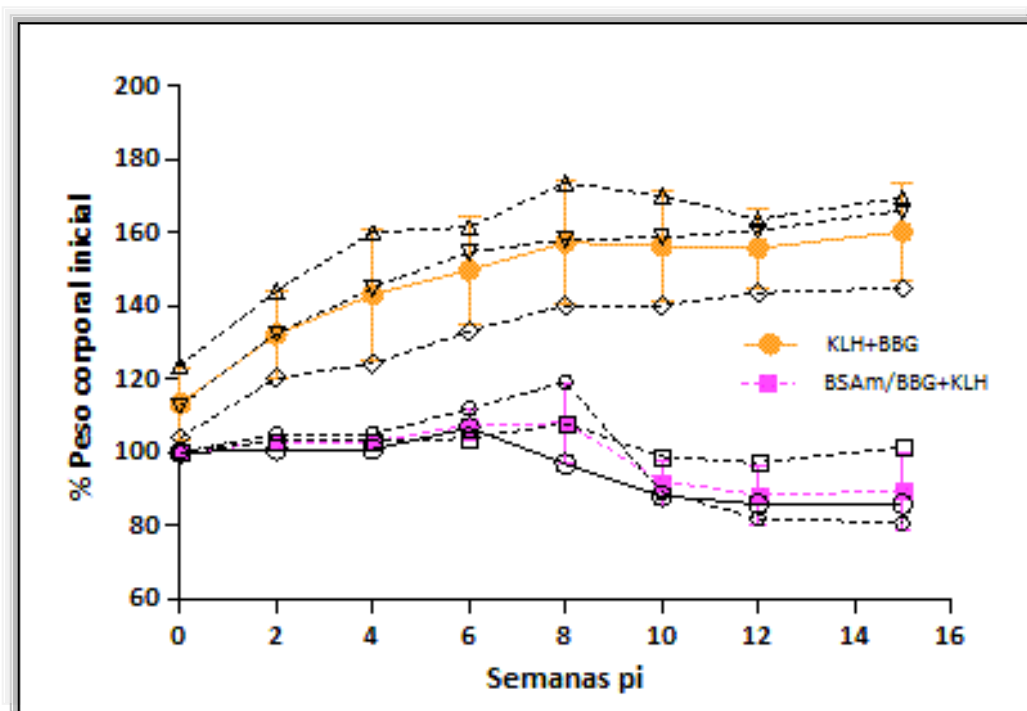


Figura 31. Pesos de los animales de los Grupos KLH+BBG y BSAm/BBG+KLH

Variación del peso de los animales a lo largo de las semanas luego de haber sido inmunizados con BBG y KLH por separado: Grupo KLH+BBG (símbolo circular naranja n=3) o con BSAm y BBG más KLH en otro punto: Grupos: BSAm/BBG+KLH (símbolo cuadrado rosa n=3). En líneas punteadas se grafican los datos individuales para cada grupo. En línea completa se grafica el promedio y su respectiva desviación estándar.

De forma similar, al estudiar la reactividad de los sueros mediante TLC-I, se observa una respuesta exclusiva de isotipo IgM en el que sólo se ve incrementada la abundancia de los anticuerpos anti-gangliósidos ya presentes en el suero pre-inmune (Figura 32). El resultado obtenido fue similar a lo que se observa cuando se inmuniza sólo con BBG (Figuras 17 y 32), lo que confirma la necesidad de una proteína *carrier* para potenciar la respuesta inmune.

En contraste con los animales KLH+BBG, en el 100% de los animales inmunizados con la mezcla BSAm/BBG+KLH se observó una reducción del peso luego de distintos tiempos post-inmunización (Figura 31). La aparición de los signos clínicos en este grupo mostró características similares a las observadas en el grupo KLH/BBG, como heterogeneidad en el momento de aparición de los síntomas e intensidad de los mismos (Tablas 2 y 4).

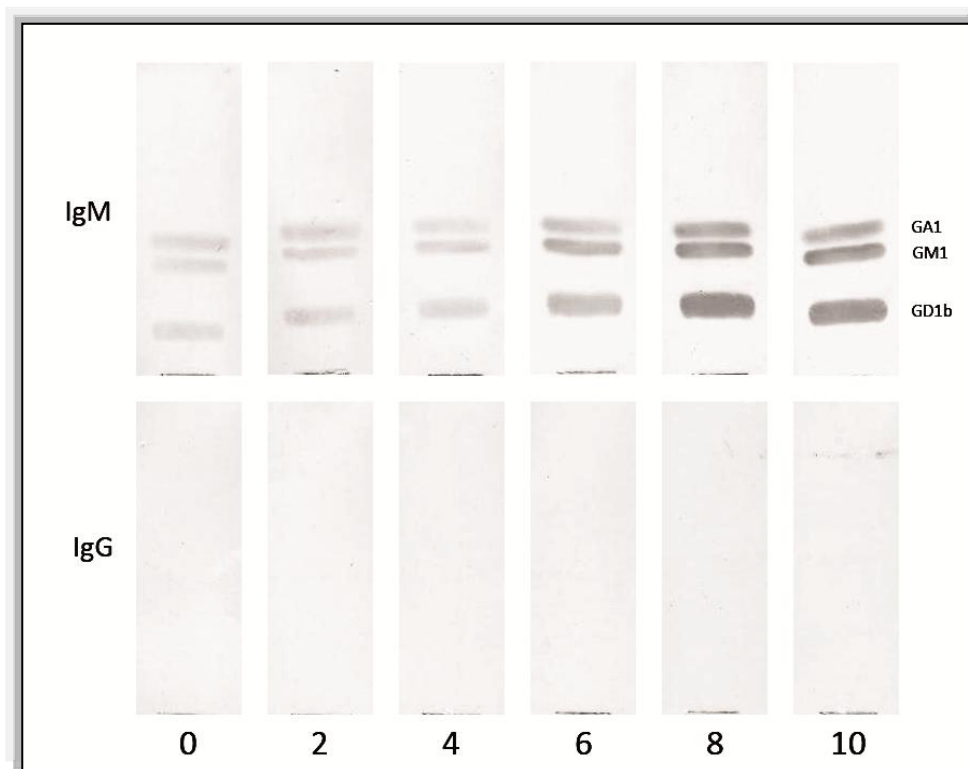


Figura 32. Reactividad de anticuerpos anti-gangliósidos en el Grupo KLH+BBG

Caso representativo de las reactividades de los anticuerpos anti- gangliósidos (GA1, GM1, GD1b) para los isotipos IgM e IgG a distintas semanas post-inmunización determinados mediante TLC-I. Se utilizaron sueros de animales inmunizados por separado con una mezcla de BBG por un lado y KLH por el otro (Grupo BBG+KLH). Para las semanas 0 y 2 se utilizó una dilución 1 en 20 y para las siguientes semanas una dilución 1 en 500.

Se determinaron los títulos de anticuerpos anti-GM1 de isotipo IgM e IgG a distintos tiempos únicamente para el grupo BSAm/BBG+KLH ya que para el grupo KLH+BBG la sensibilidad de la técnica no permitió realizar la determinación.

Grupo BSAm/BBG+KLH	Severidad (grados 1-3)	Aparición (semanas)
S40	2	5
S41	1	11
S42	1	8

Tabla 4. Severidad clínica y semana de aparición en el grupo BSAm/BBG+KLH

Se detallan para el grupo BSAm/BBG+KLH el promedio de la semana en la que se observó el comienzo en la reducción del peso corporal (aparición) y el grado de severidad clínica.

Si bien los valores máximos de título para IgM e IgG también se observaron alrededor de la semana 4, al igual que en el grupo KLH/BBG (Figura 14), los títulos encontrados fueron en promedio menores. En la Figura 33 se grafican los títulos a lo largo de las semanas para un caso representativo.

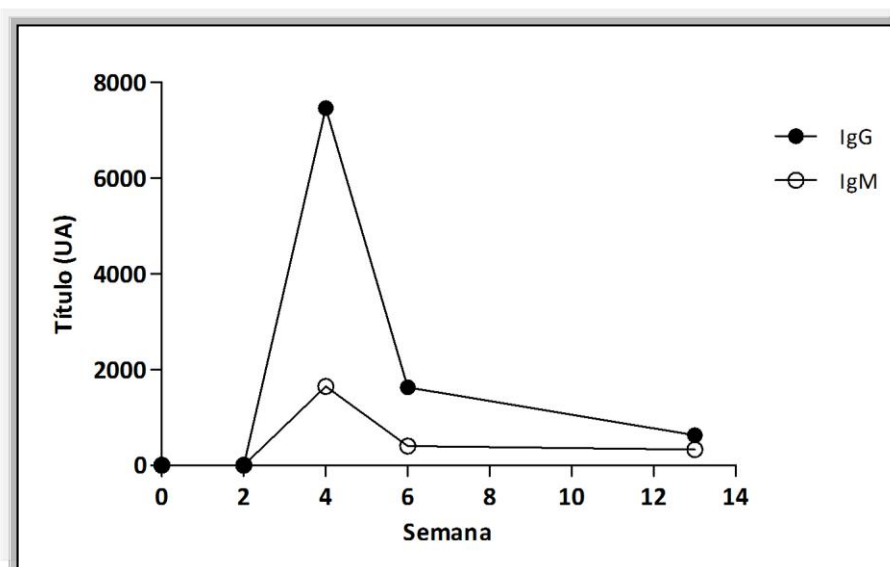


Figura 33. Título de anticuerpos anti-GM1 IgM e IgG en el Grupo BSAm/BBG+KLH

Caso representativo de la variación del título de anticuerpos anti-GM1 en el suero de un animal luego de haber sido inmunizado con BSAm y BBG por un lado y KLH por el otro (BSAm/BBG+KLH). El marcador blanco indica la variación del isotipo IgM mientras que el marcador negro indica la variación en el isotipo IgG.

Finalmente, se evaluó la reactividad de los sueros del grupo BSA_m/BBG+KLH mediante TLC-I. En dicho ensayo, nuevamente, se observaron resultados similares a aquellos encontrados al estudiar los sueros del grupo KLH/BBG. En primer lugar, se observa un incremento de los anticuerpos anti-gangliósidos de isotipo IgM y en segundo lugar, aparecen a partir de la semana 4 post-inmunización los anticuerpos de isotipo IgG anti-GM1, GD1b y GA1 (Figura 34). Dicha aparición e incremento de anticuerpos anti-gangliósidos se mantiene a lo largo de varias semanas post-inmunización.

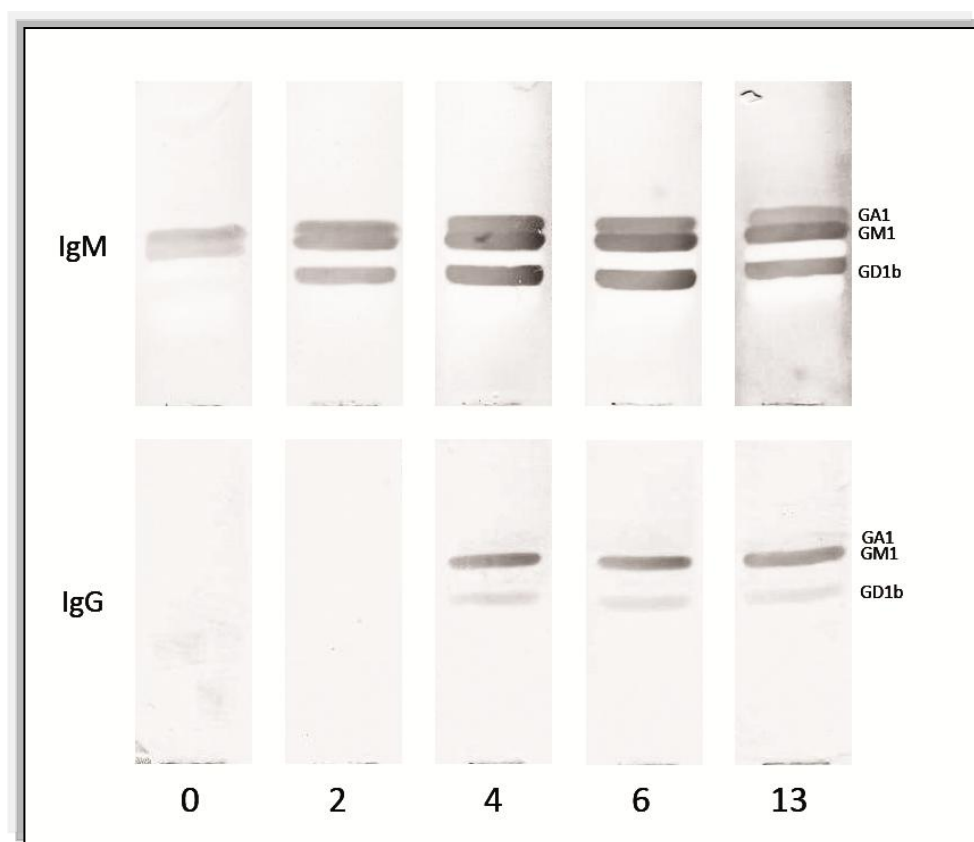


Figura 34. Reactividad de anticuerpos anti-gangliósidos en el Grupo BSA_m/BBG+KLH
Caso representativo de las reactividades de los anticuerpos anti- gangliósidos (GA1, GM1 y GD1b) para los isotipos IgM e IgG a distintas semanas post-inmunización determinados mediante TLC-I. Se utilizaron sueros de animales inmunizados separadamente con una mezcla de BBG y BSA_m, y por otro lado con KLH (Grupo BSA_m/BBG+KLH). Para las semanas 0 y 2 se utilizó una dilución 1 en 20 y para las siguientes semanas una dilución 1 en 500.

7. Anticuerpos anti- gangliósidos y neuropatía

7.a. Concordancia anticuerpos anti-gangliósidos y signos clínicos

Al evaluar los perfiles de reactividad de anticuerpos anti-gangliósidos en animales que desarrollan la neuropatía, se observó que el tiempo de aparición de anticuerpos anti-gangliósidos IgG estuvo relacionado al momento en que comenzaron a observarse síntomas de la enfermedad. Esto puede evidenciarse mediante la evaluación de dos casos extremos (Figura 35).

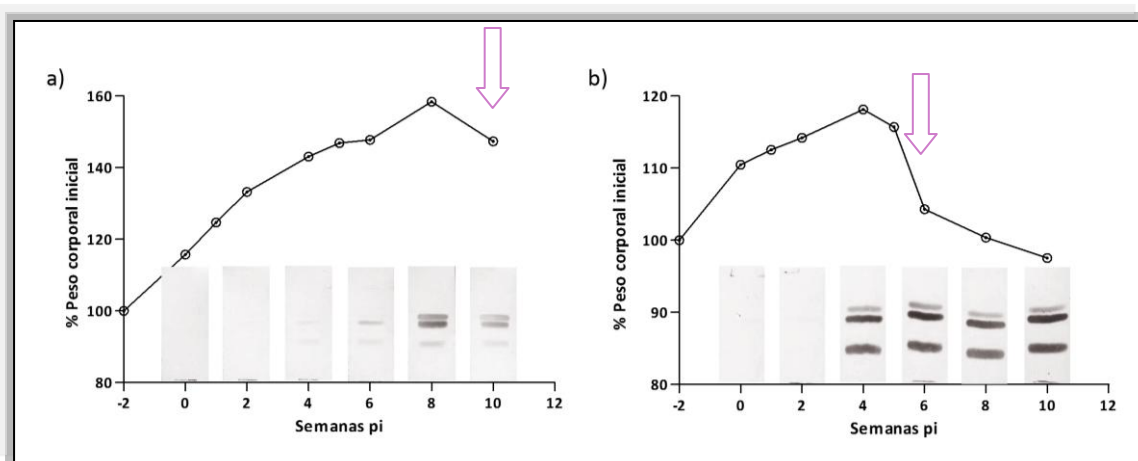


Figura 35. Perfil de peso y reactividad anti-gangliósidos en el Grupo KLH/BBG

Variación del peso de animales inmunizados con KLH/BBG y sus correspondientes reactividades de anticuerpos anti-gangliósidos determinadas mediante TLC-I a lo largo de las semanas post-inmunización. Para las semanas 0 y 2 se utilizó una dilución 1 en 20 y para las siguientes semanas una dilución 1 en 500. Se señala con una flecha el momento en que se observaron los primeros temblores. Se muestran dos situaciones **a)** Un conejo que enfermó de forma tardía (alrededor de la semana 10) y **b)** Un conejo que enfermó tempranamente (alrededor de la semana 5).

En primer lugar, tomamos el caso de un animal que comenzó a mostrar signos de enfermedad de forma tardía (alrededor de la semana 10 post-inmunización) (Figura 35.a) y, en segundo lugar, un animal que exhibió signos clínicos de forma temprana, alrededor de la semana 5 post-inmunización (Figura 35.b). Al evaluar los sueros de ambos animales, se observó un incremento de los

anticuerpos de isotipo IgG anti-gangliósidos en el momento en que se detectan los primeros signos clínicos de enfermedad para ambos casos (Figura 35).

7.b. Anticuerpos IgM anti-GA1 de alta afinidad en suero pre-inmune

Como se detalló anteriormente, en el suero de conejos pre-inmunes se observa la presencia de anticuerpos anti-gangliósidos de isotipo IgM (Figura 12). De forma similar, en suero de humanos sanos se ha detectado la presencia de anticuerpos anti-GM1 de isotipo IgM de baja afinidad. Se han identificado dos poblaciones de acuerdo a su reactividad cruzada con GA1 y GD1b (GM1/GA1/GD1b o GM1/GA1) (Mizutamari *et al.* 1994; Lopez *et al.* 2001).

En pacientes se distinguen no sólo las poblaciones de anticuerpos presentes en individuos sanos, sino también distintas poblaciones que pueden ser definidas de acuerdo a su afinidad/especificidad. La galactosa terminal es un requerimiento estructural para la unión, tanto de los anticuerpos de los individuos sanos como el de los pacientes (Lopez *et al.* 2001). Como se detalló en la introducción, la hipótesis de la deriva del sitio de unión propone que los anticuerpos asociados a neuropatías se originan por mutaciones al azar que afectan el sitio de unión. Aquellas mutaciones que producen cambios en la región de unión de la molécula tienen como consecuencia un cambio de especificidad. Este proceso de “expansión del sitio de unión” genera la variabilidad en las poblaciones de anticuerpos. Por otro lado, aquellas mutaciones que incrementen el número de puntos de unión con el antígeno producirán un aumento de afinidad.

En base a lo expuesto, aquellos individuos que posean poblaciones de anticuerpos de mayor afinidad hipotéticamente podrían desarrollar la neuropatía más rápidamente que aquellos que posean anticuerpos de la misma especificidad pero menor afinidad.

Al evaluar los animales del grupo KLH/BBG, pudo observarse que el momento en el que se detectan los primeros signos clínicos es ampliamente variable (Figura 35). Por lo que fue posible distinguir entre un grupo de animales que enfermó de forma temprana y otro que lo hizo tardíamente. El 70% de los animales enfermó entre las semanas 4 y 7 post-inmunización (Grupo temprano). Mientras que el resto de los conejos (30%) enfermó a luego de la semana 7 post-inmunización (Grupo tardío).

En ambos grupos se estudió el porcentaje de anticuerpos IgM anti-GA1 de alta afinidad en el suero pre-inmune mediante el lavado con un agente caotrópico, (KSCN 1M) utilizando TLC-I.

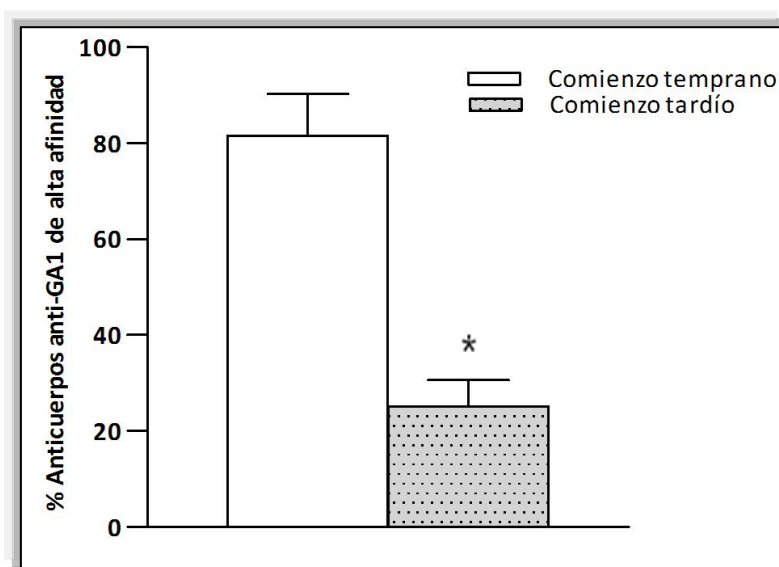


Figura 36. Anticuerpos de alta afinidad en suero pre-inmune

Porcentaje de anticuerpos anti-GA1 de alta afinidad (resistentes al lavado con KSCN 1M) presentes en suero pre-inmune de distintos animales. Mediante barra blanca se grafica el grupo de animales que enfermó de forma temprana (antes de la semana 7 post-inmunización) y la barra gris representa el grupo que enfermó de forma tardía (después de la semana 7 post-inmunización). Se indica en las barras la respectiva desviación estándar para cada grupo. * $p=0.005$

Al cuantificarse el porcentaje de anticuerpos resistentes al lavado con KSCN efectivamente se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. En aquel que presentaba un comienzo temprano de los signos

clínicos se encontró una elevada proporción de anticuerpos de alta afinidad en suero pre-inmune (80%). En contraste, en el grupo que presentó un comienzo tardío se detectó una baja proporción de anticuerpos de alta afinidad en suero pre-inmune (25%) (Figura 36).

Las poblaciones de anticuerpos que reconocen GM1 y GD1b fueron completamente eliminadas mediante el lavado con KSCN y se consideran de baja afinidad.

DISCUSIÓN

“La mente es igual a un paracaídas, solo funciona si se abre” Albert Einstein

DISCUSIÓN

1. Primera parte

1.a. Modelo experimental

El desarrollo de un modelo experimental animal es una de las mejores herramientas para el estudio de enfermedades humanas. Hasta hace poco, no se contaba con un modelo animal reproducible de SGB. En la década de los 70 se reportaron los primeros indicios de una neuropatía motora inducida por la inmunización con GM1 (Nagai *et al.* 1976). En la década de los 90 se observó que la inmunización de conejos con GM1 generaba una neuropatía subclínica con alteraciones electrofisiológicas leves y anticuerpos IgG anti-GM1 (Thomas *et al.* 1991). En nuestro laboratorio, a principios de 2000 tampoco fue posible reproducir el modelo de Nagai, aunque los animales generaron una repuesta de anticuerpos IgG anti-GM1 con cambio de isotipo, maduración de la afinidad y diversidad de especificidad fina (Lopez *et al.* 2002b). No fue hasta 2001 que se logró establecer un modelo en conejos clínicamente similar al subtipo AMAN (Yuki *et al.* 2001). Este modelo empleó un protocolo de inmunización levemente diferente al descrito por Nagai al utilizar KLH como *carrier*.

En el presente trabajo, se reprodujo y caracterizó este modelo experimental inmunizando conejos con KLH y BBG. Como resultado se observa que el 100% de los animales desarrolla una neuropatía paralizante, exhibiendo un grado variable de severidad clínica (Tabla 2). Al evaluar el suero de estos animales se detectó, por TLC-I, la presencia de anticuerpos anti-gangliósidos capaces de reconocer GA1, GM1 y GD1b pero no GD1a y GT1b (Figura 15). Además, mediante ELISA, se observó un título elevado de anticuerpos anti-GM1 de ambos isotipos (Figura 14).

Las primeras dificultades surgidas al intentar establecer un modelo experimental, se deben en parte a que los gangliósidos son pobremente inmunogénicos. Estas moléculas no sólo son auto-antígenos, los cuales son inmunológicamente tolerados en un mayor o menor grado (Bowes *et al.* 2002; Mackay y Rose 2013), sino que además tradicionalmente se consideran antígenos T-independientes. Es decir que no serían reconocidos por los linfocitos T, quienes por lo tanto no podría colaborar en la maduración de la respuesta inmune (Freimer *et al.* 1993).

A pesar de la naturaleza auto-antigénica de los gangliósidos, en el suero pre-inmune de conejos (y humanos) se detectan anticuerpos de isotipo IgM anti-gangliósidos (Figura 12). Estos anticuerpos son de baja afinidad y reconocen el epítoto Gal(β 1-3)GalNAc, y por lo tanto son capaces de reconocer a GM1, GA1 y GD1b (Mizutamari *et al.* 1994; Lopez *et al.* 2002b). Sin embargo no poseen capacidad de fijar complemento mediado por GM1 (Mizutamari *et al.* 1998). Estos anticuerpos IgM anti-GM1 se denominan NOAbs y se generan luego del nacimiento como consecuencia de la respuesta inmune a bacterias específicas aun no identificadas que colonizan el tracto gastrointestinal (Alaniz *et al.* 2004).

En el presente trabajo observamos que la inmunización con una mezcla de gangliósidos y AFC incrementa la abundancia de anticuerpos IgM, pero no se produce el cambio de clase hacia IgG (Figura 17). Además, los títulos de anticuerpos anti-GM1 generados son tan bajos que incluso no pueden ser medidos mediante ELISA. Los conejos inmunizados siguiendo este protocolo no muestran ninguna reducción del peso (Figura 16) ni la presencia de signos clínicos de neuropatía. Si bien los linfocitos productores de NOAbs anti-GM1 son capaces de ser estimulados por BBG, esta estimulación no es suficiente como para producir una neuropatía.

Se han evaluado diferentes enfoques para aumentar la inmunogenicidad de los gangliósidos (Estevez *et al.* 1999), dentro de los cuales se incluye el uso de proteínas *carrier* capaces de unirse mediante enlaces no covalentes. Como no se aplica ninguna modificación química, la estructura antigénica completa del gangliósido se mantiene sin cambios, aumentando la probabilidad de éxito de la inmunización (Tomasi *et al.* 1980; Livingston 1995). La presencia de la proteína *carrier* estimula la respuesta de células B anti-gangliósidos, incluyendo el proceso de cambio de clase dependiente de células T y la maduración de la afinidad (Livingston 1995). En la actualidad, una de las proteínas *carrier* más utilizadas es BSA, la cual posee en su estructura bolsillos hidrofóbicos en donde los gangliósidos podrían insertar sus colas de ceramida exponiendo la porción hidrofílica (Tomasi *et al.* 1980).

Efectivamente, al utilizar como inmunógeno una emulsión de gangliósidos y BSA como *carrier* (BSA/BBG) se estimula la generación de una respuesta más elaborada. La misma se caracterizó no sólo por el incremento de los anticuerpos anti-gangliósidos de isotipo IgM, sino también por la aparición de anticuerpos de isotipo IgG correspondientes a las mismas especificidades (Figura 20). Además, los títulos de anticuerpos anti-GM1 de ambos isotipos pudieron ser determinados mediante ELISA, aunque son relativamente bajos comparados con los títulos de los animales del grupo KLH/BBG (Figuras 19 y 14).

Al evaluar los pesos de los animales de este grupo, se observó una reducción que en promedio fue del 13% (Figura 18), aunque no fue posible asociarla a una neuropatía. Es decir que ninguno de los animales del grupo experimentó temblores, debilidad muscular o parálisis en sus miembros y no fue posible asignarles un grado de severidad clínica.

Estos resultados nos indican que, aunque la presencia de BSA como proteína *carrier* de los gangliósidos genera una respuesta de anticuerpos de isotipo IgG, esta no es suficiente como para desencadenar la neuropatía.

Trabajos previos en los que se intentó desarrollar la enfermedad en conejos mediante inmunización con BSA_m y BBG obtuvieron resultados similares (Lopez *et al.* 2002b). En estos conejos se observó que los anticuerpos producidos mediante este protocolo de inmunización son de baja afinidad, en comparación con aquellos encontrados en pacientes.

Si bien hasta el presente se ha descrito una gran cantidad de asociaciones entre anticuerpos anti-gangliósidos y síndromes neurológicos, el papel de estos anticuerpos en pacientes aun sigue siendo controversial. Es decir, los anticuerpos podrían surgir como una consecuencia del daño neurológico o por el contrario constituir la causa de la patología. Se ha propuesto que, para demostrar el origen autoinmune de una enfermedad deben existir evidencias directas, indirectas y circunstanciales. Como evidencias directas se considera la transferencia pasiva de la enfermedad con anticuerpos del paciente o el efecto citotóxico de los mismos sobre las células blanco del ataque auto-inmune. Entre las evidencias indirectas se considera la reproducción de la enfermedad mediante inmunización con el antígeno. Finalmente, como evidencia circunstancial se evalúa la respuesta favorable del paciente a una terapia inmuno-moduladora (Rose y Bona 1993). Si bien los resultados encontrados en la bibliografía presentan una amplia divergencia, podemos hacer mención a algunas evidencias encontradas.

Con relación a la evidencia directa, Santoro *et al* en 1992 demostraron que la inyección intraneural del suero de un paciente con la enfermedad de la motoneurona (que presentaba altos títulos de anticuerpos IgM anti-GM1) en nervio ciático de rata produce el bloqueo en la conducción nerviosa motora. Además, dicho bloqueo no se produce si el suero es previamente pasado por una columna de afinidad con GM1, lo que sugiere que los anticuerpos anti-GM1 son los responsables de las alteraciones de la conducción nerviosa (Santoro *et al.* 1992). Además, una neuropatía mixta (desmielinizante-axonal) suave puede

ser inducida en ratones con un hibridoma secretor de anticuerpos anti-GD1a y GT1b (Sheikh *et al.* 2004). Con respecto a las evidencias circunstanciales, se sabe que la velocidad de recuperación de pacientes con SGB puede ser acelerada mediante administración de inmunoglobulinas intravenosas (IVIg) en altas dosis, plasmaféresis y en algunos casos administración de corticoides (Misawa 2015).

Finalmente, como evidencia indirecta, ha sido posible generar una neuropatía periférica en animales mediante inmunización con glicolípidos o LOS. El modelo de SGB axonal pudo generarse por inmunización de conejos con LOS de *C. jejuni* portadores de estructuras similares a GM1 (Yuki *et al.* 2004; Caporale *et al.* 2006), con GM1 o con LPS de *C. jejuni* de pacientes con la enfermedad (Yuki *et al.* 2001; Yuki *et al.* 2004; Susuki *et al.* 2007). Por otro lado, la inmunización con gangliósidos particulares es capaz de inducir distintos subtipos del SGB en conejos. La inmunización con GD1b induce una neuropatía similar a AMSAN, en la cual se encuentran frecuentemente anticuerpos anti este gangliósido (Kusunoki *et al.* 1996). En cambio la inmunización con GM1 produce una neuropatía aguda periférica histológicamente similar a AMAN (Yuki *et al.* 2001; Susuki *et al.* 2003; Moyano *et al.* 2008).

En el presente trabajo no sólo se logró reproducir la neuropatía en animales sino que además se observó una clara asociación entre la aparición de los anticuerpos IgG anti-gangliósidos y la aparición de los primeros signos de la neuropatía en los animales (Figura 35). Dicha asociación también se observó al confrontar el perfil de títulos anti-GM1 de isotipo IgG. A pesar de que cada animal enfermó a distintas semanas post-inmunización, en la mayoría de los casos el título máximo de anticuerpos precede al momento en que se comienzan a observar signos clínicos.

1.b. Función de KLH

A diferencia de los grupos inmunizados con BBG o BSA_m/BBG, el grupo de animales inmunizados con KLH/BBG desarrolló la neuropatía. Se evidencia entonces, que el factor clave es la presencia y/o naturaleza de la proteína *carrier* en el sistema (Tabla 5). Si bien se podría considerar a KLH simplemente como una proteína *carrier* con un poder inmunogénico mayor al de BSA_m, al evaluar los resultados detallados a continuación se consideraron otras opciones.

Luego de inmunizar conejos con una emulsión que sólo contenía KLH y AFC, los animales no mostraron reducción del peso corporal (Figura 21) ni tampoco signos de neuropatía a lo largo del experimento. Llamativamente, al evaluar los anticuerpos anti-gangliósidos en suero se detectó un incremento de aquellos de isotipo IgM (principalmente anti-GA1) y la aparición de anticuerpos anti-GA1 de isotipo IgG (Figura 22). Si bien mediante TLC-I se observan reactividades de anticuerpos anti-gangliósidos de ambos isotipos (Figura 22), no fue posible determinar mediante ELISA el título de los sueros anti-GM1.

Los glicoconjugados (glicoproteínas y glicolípidos) pueden compartir estructuras glucídicas. El hallazgo de que la inmunización con una proteína desencadena una respuesta inmune capaz de reconocer gangliósidos sugiere que KLH posee una estructura que estaría presente también en el gangliósido GA1 (Figura 37).

1.c. KLH

KLH es una proteína de gran peso molecular que se obtiene de la linfa de un molusco marino (*Megathura crenulata*). Alrededor de 40 años atrás se observó que esta proteína poseía notables propiedades inmuno-estimulantes. La misma estimula tanto la respuesta inmune humoral como celular, y

curiosamente, en personas no inmunizadas con KLH se encuentran anticuerpos IgM e IgG con avidéz por la misma (Hersh y Dyre 1974; Burke *et al.* 1977).

Está conformada por dos isoformas oligoméricas independientes denominadas *KLH1* (390 kDa) y *KLH2* (360 kDa), las cuales están constituidas a su vez por 8 subunidades distintas denominadas unidades funcionales (FUs: *abcdefgh*). A nivel de la estructura cuaternaria, *KLH1* forma didecámeros cilíndricos, mientras que *KLH2* existe como una mezcla de didecámeros y decámeros múltiples tubulares, lo que conduce a masas moleculares de aproximadamente ocho millones de Daltons para cada didecámero. La proporción de ambas isoformas depende de muchos factores, algunos estudios han demostrado, por ejemplo, que los animales cautivos en acuarios de agua salada lentamente pierden la mayor parte o todo su *KLH1* (Harris y Markl 1999).

Por otro lado, los carbohidratos tienen una importancia primordial en la antigenicidad de la molécula (Harris y Markl 1999; Oyelaran y Gildersleeve 2010). El contenido total de carbohidratos en KLH constituye alrededor del 4% de la masa molecular de la misma (Vliegenthart *et al.* 1990). La fracción glucídica es considerada la principal responsable de la respuesta inmunológica generada contra KLH (Oyelaran y Gildersleeve 2010). Sin embargo, la estructura cuaternaria de la molécula nativa también es indispensable al crear un andamio sobre el cual múltiples epítopes de carbohidratos quedan disponibles para el sistema inmune. Una separación estérica óptima de residuos de azúcar podría potenciar la fuerte estimulación de la respuesta observada tanto *in vivo* como *in vitro* (Harris y Markl 1999).

En el presente trabajo observamos que, efectivamente, la mayor parte de la respuesta de anticuerpos (aproximadamente el 75%) está dirigida a epítopes de hidratos de carbono (Figura 24). Resultados similares se observan al evaluar, mediante ELISA, sueros de seres humanos inmunizados con KLH. El tipo de respuesta humoral varía de acuerdo al individuo, algunos la centran en un

pequeño subconjunto de los hidratos de carbono, mientras que otros individuos la generan hacia una multitud de epítopes de carbohidratos, asemejándose a un efecto inmuno-estimulador general (Oyelaran y Gildersleeve 2010).

La presencia de N- y O-glicanos en KLH ha sido evaluada en la bibliografía mediante el uso de lectinas y MALDI-TOF-MS. Se ha descrito que en la subunidad *KLH1*, solo una FU no posee carbohidratos mientras que el resto posee N-glicanos. En el caso de la subunidad *KLH2*, todas las FUs poseen N-glicanos a excepción de la FU2c. En esta subunidad se ha detectado el determinante Gal(β 1-3)GalNAc, típico de O-glicanos (Wirguin *et al.* 1995; Harris y Markl 1999; Kurokawa *et al.* 2002). Este determinante conformado por dos azúcares se encuentra presente también en la porción glucídica terminal de algunos gangliósidos (GM1, GA1, GD1b), y su presencia en KLH fue confirmada en el presente trabajo mediante el uso de PNA en ELISA (Figura 25). Su existencia indica que esta estructura podría ser responsable de la generación de una población de anticuerpos que también reconozca gangliósidos (Figura 37).

La proteína KLH ha sido extensamente utilizada en el tratamiento de carcinomas. Su poder inmunoterapéutico se atribuye a la estimulación de una respuesta combinada tanto específica como no específica. *In vivo* esta proteína induce una respuesta caracterizada por la producción de un anticuerpo protector que reconoce al antígeno T (también conocido como determinante Gal(β 1-3)GalNAc) y la respuesta de células T citotóxicas. En nuestro modelo experimental, KLH podría comportarse de forma similar, estimulando una respuesta del sistema inmune específica anti-gangliósidos.

La inmunización con KLH genera rápidamente elevados títulos de anticuerpos de ambos isotipos con valores de alrededor de 1000 UA para IgM y 300000 UA para IgG (Figura 23). Este rápido incremento de los títulos anti-KLH ha sido relacionado con la pre-existencia de una población de células B de

memoria, resultado de la estimulación previa por la reacción cruzada de un epítoto proteico o glucídico desconocido (Burke *et al.* 1977).

La presencia de anticuerpos anti-KLH de isotipo IgM en el suero de conejos pre-inmunes también se detecta mediante ELISA (Figura 23). La existencia de estos anticuerpos se asemeja a la presencia de anticuerpos anti-gangliósidos en el suero de seres humanos sanos y conejos pre-inmunes. En el suero pre-inmune, los anticuerpos anti-gangliósidos y parte de los anticuerpos anti-KLH, presentes reconocen el determinante Gal(β 1-3)GalNAc. Para ambos anticuerpos ha sido propuesto un mismo origen basado en la estimulación de la respuesta inmune por parte de bacterias entéricas aun no identificadas (Burke *et al.* 1977; Alaniz *et al.* 2004). En base a estas similitudes, cabe la posibilidad de que ambas poblaciones de anticuerpos sean, al menos en parte, una misma población con reactividad cruzada por KLH o GA1.

La inmunización con KLH es capaz de estimular a los linfocitos productores de anticuerpos anti-GA1 (Figura 22) y la totalidad de los anticuerpos producidos poseen reactividad cruzada con KLH (Figura 28.I). Un efecto similar se observa al estudiar el efecto inmunoterapéutico de KLH en el tratamiento de carcinomas y la generación de anticuerpos anti-antígeno T (Wirguin *et al.* 1995).

Al evaluar los anticuerpos anti-gangliósidos presentes en los conejos enfermos (KLH/BBG) y en aquellos inmunizados solo con KLH, se observa un porcentaje de reactividad cruzada diferente. Mientras que en este último grupo el porcentaje es del 100%, en animales inmunizados con KLH/BBG el porcentaje de reactividad cruzada es de alrededor de 60% en promedio (Figura 28.II y Figura 29).

Por otro lado, el porcentaje de reactividad cruzada varía en cada animal evaluado (Grupo KLH/BBG), sin embargo, en todos los casos comienza siendo elevado y luego disminuye a medida que aumenta el tiempo post-inmunización

(Figura 30). En otras palabras, 4 semanas luego de la inmunización, un alto porcentaje de los anticuerpos anti-gangliósidos son capaces de reconocer KLH, es decir que reconocen estructuras compartidas por ambas moléculas. Sin embargo con el paso del tiempo, en la semana 8 luego de la inmunización, un bajo porcentaje de los anticuerpos conserva esta característica. Es decir, los anticuerpos anti-gangliósidos reconocen estructuras que están presentes en los gangliósidos pero no en KLH, como podrían ser los ácidos siálicos, cuya ausencia en KLH ha sido comprobada (Wirguin *et al.* 1995).

Si consideramos que las mutaciones acumuladas durante la hipermutación somática modifican la especificidad de los anticuerpos, ambas poblaciones (anticuerpos anti-KLH y anti-gangliósidos) podrían ser producidos por los mismos linfocitos. Nuestra interpretación de los resultados propone que al momento de la inmunización, los anticuerpos reconocen los azúcares terminales compartidos entre KLH y GA1 (Gal(β 1-3)GalNAc). Sin embargo, a medida que los linfocitos B sufren hipermutación somática, las regiones determinantes de la complementariedad podrían sufrir mutaciones que introduzcan cambios en la región de la molécula reconocida. Esto produciría en consecuencia un cambio de especificidad. En este punto existen tres posibilidades:

I) Los anticuerpos podrían comenzar a reconocer estructuras características de los gangliósidos que no se encuentran presentes en KLH.

II) La región de unión de los anticuerpos podría comenzar a reconocer estructuras características de KLH que no se encuentran presentes en gangliósidos.

III) Los anticuerpos podrían seguir reconociendo estructuras compartidas por KLH y gangliósidos.

En el momento en que las estructuras reconocidas son lo suficientemente diferentes (es decir las situaciones I y II), los anticuerpos

podrían llegar a perder la reactividad cruzada y su especificidad fina ahora estaría dirigida sólo hacia gangliósidos o sólo hacia KLH. En el caso número III, la reactividad cruzada se conservaría. Un fenómeno similar ha sido descrito al estudiar en detalle los cambios de especificidad sufridos en los anticuerpos presentes en pacientes con neuropatías. A este proceso se le ha denominado expansión del sitio de unión (Lopez *et al.* 2002a).

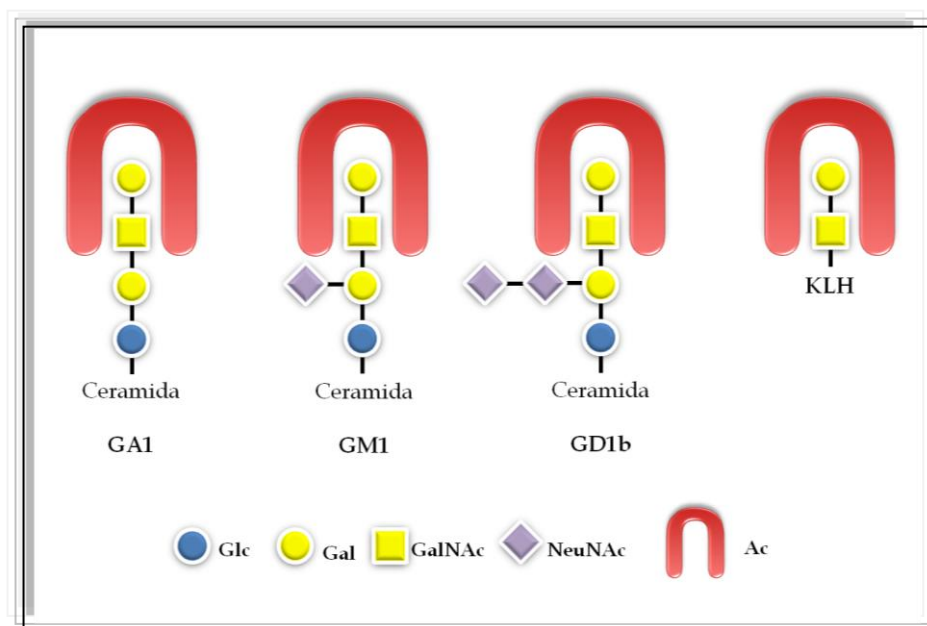


Figura 37. Representación esquemática de la reactividad cruzada de anticuerpos con gangliósidos-KLH

Se esquematiza la zona de interacción antígeno-anticuerpo (Rojo), de forma que es posible observar la reactividad cruzada gangliósidos-KLH. Referencias: **Glc**: Glucosa, **Gal**: Galactosa, **GalNAc**: N-acetil-galactosamina, **NeuNAc**: Ácido siálico. **Ac**: Sitio de unión del anticuerpo.

Asimismo, este cambio de especificidad de los anticuerpos anti-gangliósidos detectado en los animales KLH/BBG exhibió una clara asociación cronológica con el momento en que los animales comienzan a presentar signos de neuropatía (Tabla 3). Este resultado enfatiza la importancia de la especificidad de los anticuerpos asociados a neuropatías.

1.d. BSAm y KLH

La sumatoria de los antecedentes y resultados obtenidos mediante la inmunización con BBG o con KLH y BBG en emulsiones separadas (Grupo KLH+BBG) indica que los gangliósidos requieren la presencia de una proteína *carrier* en la emulsión para resultar inmunogénicos (Tabla 5). En ambos casos, la respuesta inmune es predominantemente de isotipo IgM y no se observa ningún signo clínico de enfermedad. Paralelamente, la inmunización con gangliósidos y BSAm genera anticuerpos IgG con títulos bajos, también incapaces de desencadenar una neuropatía. Este último resultado podría llevarnos a pensar que BSAm resulta poco eficiente como proteína *carrier*. Sin embargo, cuando al Grupo BSAm/BBG le sumamos una inmunización con KLH en otro punto (BSAm/BBG+KLH) la situación se revierte y todos los animales desarrollan una neuropatía similar al grupo BBG/KLH (Tabla 4 y 5). Este resultado indica que, aunque BSAm es una proteína *carrier* eficiente, su presencia no es suficiente para la generación de anticuerpos capaces de generar la neuropatía. Es decir que se requiere paralelamente un componente inmuno-estimulador específico. La proteína BSAm no posee carbohidratos y no une a la lectina PNA (Figura 27), por lo que no posee el efecto inmuno-estimulador específico de KLH. Estos resultados nos sugieren que, mediante la inmunización con BSAm/BBG se genera una respuesta inmune que, si bien presenta cambio de isotipo, la misma no es suficiente para dar lugar a la neuropatía. Probablemente esto se deba a que BSAm no permite el proceso de expansión del sitio de unión del anticuerpo y la modificación de la especificidad fina.

Por otro lado, la inmunización con KLH produce rápidamente títulos extremadamente elevados, del orden de 30000 UA luego de 2 semanas de inmunización y alcanza máximos de hasta 500000 UA para IgG (Figura 23). Sabiendo que el 75% de esa respuesta inmune está dirigida contra glicanos (Figura 24), podemos suponer que cierto porcentaje (algunas poblaciones) de

esos anticuerpos también tendrá la capacidad de reconocer gangliósidos. En otras palabras, KLH estimula la activación de linfocitos anti-gangliósidos y por lo tanto podría estimular mutaciones del sitio de unión de los anticuerpos. La inmunización conjunta con gangliósidos direcciona la expansión del sitio de unión de los anticuerpos modificando la especificidad fina de los mismos. Es importante destacar además que en nuestro modelo experimental la respuesta anti-KLH ocurre anticipadamente a la respuesta anti-gangliósidos (anticuerpos detectados a la semana 2 vs títulos detectados en la semana 4-6). Además, se ha observado que ratones inmunizados con *C. jejuni* son capaces de generar anticuerpos anti-GM1 sólo si previamente fueron sensibilizados con KLH (Wirguin *et al.* 1997). En base a lo observado, se sugiere que el papel fundamental de KLH como estimulador específico es requerido al comienzo de la respuesta inmune, sin necesidad de encontrarse en contacto con los gangliósidos de la emulsión.

Para que una proteína cumpla la función de *carrier* debe ser administrada en la misma emulsión que BBG. Sin embargo, para desempeñar el papel de inmuno-estimulador específico esta condición no sería necesaria. Esto se evidencia al observar que ningún animal del grupo BSAm/BBG enfermó, pero en contraste, todos los animales del grupo BSAm/BBG+KLH si lo hicieron. En conclusión, podemos afirmar que en base a los seis protocolos de inmunización descritos en la tabla 5, existen al menos dos elementos indispensables para la generación de anticuerpos capaces de desencadenar la neuropatía.

En primer lugar, es necesaria la presencia de una proteína *carrier*, la cual facilite la presentación de antígenos a las CPA produciendo la estimulación del sistema inmune. Además, los gangliósidos se adsorben rápidamente a las membranas por lo que, probablemente, la asociación con una proteína *carrier* prolongue el tiempo de circulación y por lo tanto aumente la interacción con el sistema inmune (Aureli *et al.* 2015).

Podemos asumir que, tanto KLH como BSAm desempeñan eficientemente la función de proteína *carrier*. Esta afirmación se basa en el hecho de que tanto los animales inmunizados con KLH/BBG (en los que KLH es el *carrier*) como los animales inmunizados con BSAm/BBG+KLH (en los que BSAm es el *carrier*) desarrollan la neuropatía (Tabla 5).

	Sitio 1	Sitio 2	IgG anti-GM1	Signos clínicos
1	KLH/BBG	-	+	+
2	BBG	-	-	-
3	BSAm/BBG	-	+/-	-
4	KLH	-	-	-
5	KLH	BBG	-	-
6	BSAm/BBG	KLH	+	+

Tabla 5. Resumen de tratamientos

Se resumen los experimentos realizados (enumerados del 1 al 6) indicando el/los inmunógenos utilizados en cada caso (sitio 1 y/o 2). Para expresar la intensidad del título de Ac anti-GM1 determinados mediante ELISA se utilizaron las siguientes referencias: - no detectado, +/- moderado, + abundante. Los signos clínicos de la neuropatía se expresan como presentes (+) o ausentes (-).

En segundo lugar, consideramos que la presencia de KLH es imprescindible, debido a que cumple de alguna forma un papel de inmunostimulador específico. Esto se evidencia al comparar los protocolos de inmunización 3 y 6 de la Tabla 5, en la que sólo los animales inmunizados con KLH desarrollan la enfermedad.

Además, este rol puede ser desempeñado de forma remota, es decir, no es necesario que KLH y los gangliósidos se encuentren en contacto en la misma emulsión, ya que los animales del grupo BSAm/BBG+KLH, en el cual KLH se administra separadamente desarrollan la neuropatía de forma similar a aquellos que componen el grupo KLH/BBG.

2. Segunda parte

2.a. Factor de susceptibilidad a la neuropatía en el modelo experimental

El SGB es considerado un trastorno post-infeccioso. Dos tercios de los pacientes reportan síntomas de una infección del tracto respiratorio o gastrointestinal antes del inicio de la neuropatía, siendo *C. jejuni* responsable de al menos un tercio de estas infecciones (Young *et al.* 2007; Yuki 2007b; van den Berg *et al.* 2014). El mimetismo molecular propone que la respuesta inmune producida contra LOS presentes en esta bacteria (portadores de la estructura similar GM1) genera una respuesta cruzada contra los gangliósidos de los nervios periféricos. Sin embargo, la infección con *C. jejuni* es una de las causas más frecuentes de diarrea aguda en el mundo (1000 casos por cada 100000) mientras que el SGB tiene una incidencia 1000 veces menor (sólo 1,11 de cada 100000) (Nachamkin *et al.* 1999). De cada 1000 casos de infecciones con *C. jejuni* sólo 1 desarrolla SGB. Algunas cepas claramente tienen un riesgo incrementado de inducir SGB comparado con otras cepas, sin embargo incluso el riesgo de desarrollar SGB luego de la infección con el serotipo más frecuentemente asociado a la neuropatía resulta de sólo 1 de cada 158 infecciones (Allos 1997). Por lo tanto, el mimetismo molecular es un factor necesario pero no suficiente para explicar el origen de los anticuerpos anti-gangliósidos en el SGB. Diversos autores señalan la existencia de un factor intrínseco en cada individuo que le brinda susceptibilidad o predisposición a desarrollar la neuropatía (Nachamkin *et al.* 1999; Yuki 2007b; Rinaldi 2013). Una amplia variedad de trabajos han intentado establecer, sin éxito, en qué se basa esta predisposición o también denominado “factor de susceptibilidad del huésped” (Ma *et al.* 1998; van Belkum *et al.* 2001; Geleijns *et al.* 2004).

Como se mencionó anteriormente, en el presente trabajo se observó que si bien los conejos son inmunizados en un mismo momento mediante el mismo

protocolo, cada animal enferma en distintos momentos entre la semana 4 y 11 post-inmunización (Tablas 3 y 4). Es decir, algunos enfermaron de forma temprana y otros de forma tardía. Además, el momento en que se observa la aparición de los signos clínicos coincide generalmente con el tiempo en que se incrementan/aparecen los anticuerpos anti-gangliósidos de isotipo IgG (Figura 35). Esta correlación por un lado subraya la importancia de los anticuerpos anti-gangliósidos en el comienzo/ desarrollo de la neuropatía. Por el otro lado, indica que existe una predisposición en cada individuo, la cual condiciona un comienzo temprano o tardío de la enfermedad ante un mismo estímulo (inmunógeno KLH/BBG).

2.b. Hipótesis de la deriva y factor de susceptibilidad

Como se detalló en la introducción, la hipótesis de la “deriva del sitio de unión” se basa en tres hechos, en primer lugar los clones de células B capaces de reconocer GM1 con alta afinidad no están presentes en los individuos sanos (Lopez *et al.* 2001). En segundo lugar, dentro del repertorio normal de anticuerpos IgM anti-bacterianos se encuentran algunas poblaciones de baja afinidad que tienen reactividad cruzada con GM1 (también denominados NOAbs) (Mizutamari *et al.* 1994; Alaniz *et al.* 2004). Finalmente, los anticuerpos considerados patogénicos tienen una afinidad incrementada por GM1, y muestran una variabilidad restringida en la especificidad fina (Lopez *et al.* 2001; Comín *et al.* 2006). Es decir, cada paciente presenta sólo una o dos poblaciones de anticuerpos que reconocen diferentes áreas del oligosacárido de GM1 (Lardone *et al.* 2016).

La hipótesis propone que los clones de células B presentes en los pacientes se originan a partir de células B normales mediante mutaciones al azar que modifican el sitio de unión de los anticuerpos anti-GM1 (Lopez *et al.*

2002a). A estos linfocitos (que reconocen GM1 con baja afinidad) se los denominó “linfocitos traicioneros” (esquemáticamente representado en la Figura 38). Se les asignó este nombre debido a que son linfocitos que, potencialmente, pueden producir auto-anticuerpos peligrosos luego de sufrir mutaciones en sus genes V (Nores *et al.* 2008). Este concepto se basa en la evidencia de que mutaciones puntuales en el sitio de unión de proteínas que unen carbohidratos pueden cambiar la afinidad o especificidad por su ligando glucídico, como se observa en la generación de grupo sanguíneo B (Kiefer *et al.* 2001), la especificidad alterada de una lectina (Cunningham *et al.* 2016) y el aumento de la afinidad del fragmento Fab de un anticuerpo anti-GA1 (Madi *et al.* 2012).

Sólo si las mutaciones sufridas por los NOAbs favorecen la interacción con GM1 propio o exógeno (determinante portado por *C. jejuni*), se produciría la expansión de los clones y, posiblemente, la maduración de la afinidad. Debido a la similitud con el fenómeno biológico de “deriva génica”, se propuso denominar a este proceso “deriva del sitio de unión”, el mismo se esquematiza en la Figura 38. Cómo sólo los individuos que posean linfocitos en los que hubiera ocurrido la “deriva” serán capaces de producir anticuerpos asociados a neuropatía, esta característica puede considerarse el “factor de susceptibilidad del huésped” (Nores *et al.* 2008).

Teniendo en cuenta que los anticuerpos asociados a neuropatías tendrían su origen en los NOAbs presentes en suero pre-inmune, y que algunos animales desarrollan la neuropatía de forma temprana o tardía, se decidió evaluar la afinidad de los anticuerpos de isotipo IgM anti-gangliósidos en el suero pre-inmune. Los anticuerpos que reconocen GM1, GD1b y parte de los que reconocen GA1 son de baja afinidad. Sin embargo, fue posible detectar anticuerpos IgM anti-GA1 de alta afinidad presente en todos los conejos, observándose que aquellos que enferman temprano poseen un mayor

porcentaje (80%) comparado con el grupo que enferma de forma tardía (25%) (Figura 36).

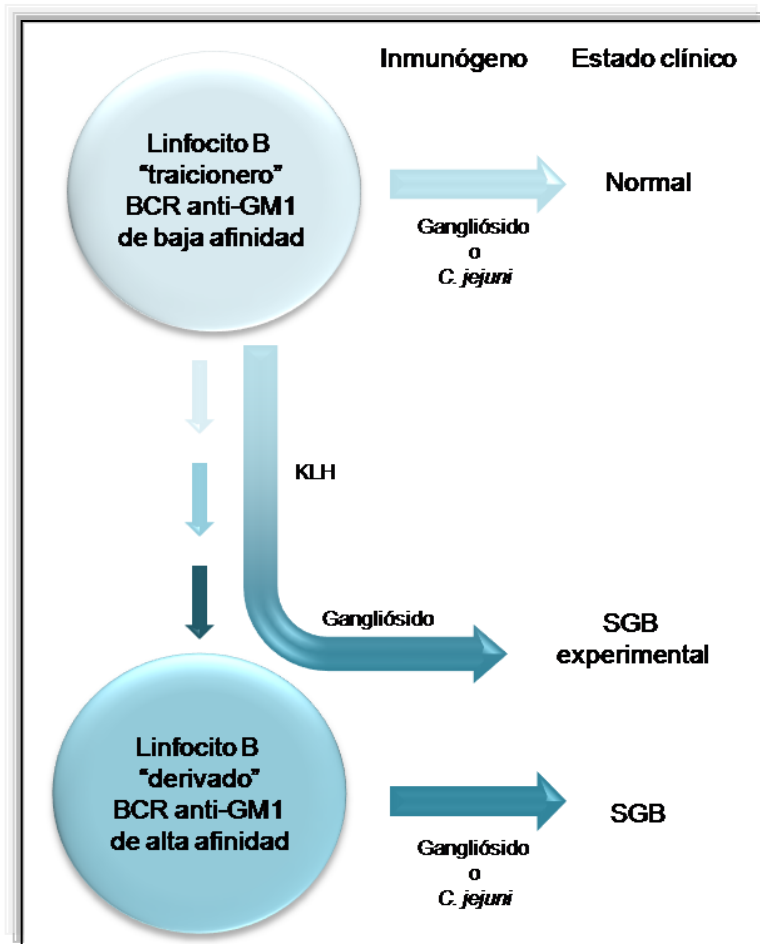


Figura 38. Esquema general del desencadenamiento de la neuropatía

Distintos inmunógenos pueden desencadenar o no una neuropatía en base a la presencia/ausencia del "linfocito derivado". Algunos inmunógenos como KLH/BBG estimulan la deriva de los linfocitos por lo que el 100% de los animales enferma. Algunos individuos poseen azarosamente este "linfocito derivado" por lo que son susceptibles de desarrollar la neuropatía al infectarse con *C. jejuni*. (Adaptado de Nores *et al*, 2008).

Al menos en este modelo experimental, podemos considerar que aquellos animales a los que les insume menor tiempo en desarrollar la enfermedad son más susceptibles que aquellos que enferman de forma tardía. En consecuencia, el factor de susceptibilidad a desarrollar la neuropatía puede estar relacionado a la afinidad de los NOAbs presentes en el suero pre-inmune. Es decir, los linfocitos de algunos animales han comenzado el proceso de deriva (incremento al azar la afinidad de los anticuerpos por GA1) antes de haber sido inmunizados. Por tal motivo, teóricamente el tiempo requerido para que el

animal enferme se reduce con respecto a aquel en el que sus linfocitos no hubieran comenzado la deriva.

En contraste con la baja incidencia del SGB (el cual puede estar asociado a una baja frecuencia de deriva o a un mecanismo eficiente de regulación), la inmunización de conejos con KLH/BBG produce al desarrollo de la enfermedad en el 100% de los animales. Nuestra interpretación de los resultados se encuentra resumida en la Figura 38. La inmunización con gangliósidos en un animal que posee linfocitos sin derivar genera sólo anticuerpos de baja afinidad sin una neuropatía asociada. Por otro lado, la misma inmunización en un individuo que posea linfocitos derivados, desencadenará la producción de anticuerpos de alta afinidad y la enfermedad. Sin embargo, la respuesta producida por la inmunización con KLH/BBG es independiente del estado inicial de los linfocitos productores de anticuerpos anti-gangliósidos (“traicionero” o “derivado”) ya que la presencia de KLH como factor estimulante específico (discutido en el apartado anterior) promueve el proceso de deriva, requiriendo mayor o menor tiempo pero finalmente generando la neuropatía.

3. Conclusiones

A modo de conclusión, podemos afirmar que al menos en parte, la eficiencia de KLH como elemento inmuno-estimulador se encuentra asociada a la presencia del determinante Gal(β 1-3)GalNAc. El mismo es compartido por la proteína KLH y los gangliósidos GA1, GM1 y GD1b (Figura 37) y es de gran importancia en el origen de los anticuerpos asociados a neuropatías. Las siguientes observaciones sustentan esta afirmación:

- 1) Debido a que ninguno de los anticuerpos asociados a la neuropatía, ni aquellos presentes en suero pre-inmune reconocen GD1a o GT1b se

deduce que la galactosa terminal (“cubierta” por un ácido siálico) es importante para la unión de ambas poblaciones.

- 2) La inmunización solo con KLH estimula a los linfocitos que poseen la capacidad de producir anticuerpos anti-GA1 y generar el cambio de clase desde IgM a IgG.
- 3) En animales inmunizados con KLH/BBG que aún no exhiben la neuropatía, se observa una elevada proporción de anticuerpos anti-gangliósidos (GA1, GM1 y GD1b), los cuales son capaces de reconocer también a KLH. Sin embargo, poco antes de que aparezcan los signos clínicos, la proporción de anticuerpos anti-gangliósidos que posee esta propiedad disminuye.
- 4) En el suero pre-inmune de aquellos animales que enfermaron tempranamente se detectó un elevado porcentaje (80%) de anticuerpos anti-GA1 de alta afinidad.

La interpretación de estos resultados señala que la inmunización con KLH es capaz de activar a aquellos linfocitos que reconocen una estructura similar a GA1 (tratamiento 4 de la Tabla 5). El gangliósido GA1 no es un antígeno propio, por lo que no se encuentra bajo tolerancia inmunológica y el sistema inmune tiene permitido generar una respuesta elaborada. Algunos de estos linfocitos estimulados por KLH podrían mutar su BCR y mediante el proceso de deriva cambiar su especificidad (linfocito "derivado", Figura 38). Como consecuencia, los anticuerpos pasan a reconocer estructuras más complejas como GM1/GD1b. Estos linfocitos derivados ahora pueden ser estimulados por los gangliósidos presentes en el inmunógeno, desencadenando la respuesta inmune asociada a la neuropatía (tratamientos 1 y 6 de la Tabla 5). En ausencia de KLH, los gangliósidos sólo son capaces de estimular a los linfocitos que producen anticuerpos anti-gangliósidos de baja afinidad (tratamientos 2, 3 y 5 de la Tabla 5).

4. Direcciones futuras

1. El desarrollo y caracterización de un modelo experimental reproducible, como el que se detalla en el presente trabajo abre las puertas, no solo al estudio de los mecanismos implicados en el origen de la enfermedad, sino también a la evaluación de terapias inmunológicas. Una de las posibles estrategias se relaciona al estudio de los anticuerpos anti-idiotípicos. El perfil de recuperación de pacientes ha sido asociado con la presencia de dicho anticuerpos. El modelo experimental permitiría no sólo su estudio, sino también el uso de los mismos como una terapia específica para acelerar la recuperación de los pacientes.
2. Determinar la naturaleza del factor de susceptibilidad del huésped plantea, al menos teóricamente, la posibilidad de predecir antes de la inmunización qué animales enfermarán rápidamente. Asimismo sería importante determinar la presencia de estas poblaciones de anticuerpos anti-GA1 en humanos.

BIBLIOGRAFÍA

“Uno llega a ser grande, no por lo que escribe, sino por lo que lee” Jorge Luis Borges

BIBLIOGRAFÍA

- Acquotti D, Poppe L, Dabrowski J, Von der Lieth CW, Sonnino S, Tettamanti G. 1990. Three-dimensional structure of the oligosaccharide chain of GM1 ganglioside revealed by a distance-mapping procedure: a rotating and laboratory frame nuclear overhauser enhancement investigation of native glycolipid in dimethyl sulfoxide and in water-dodecylphosphocholine solutions. *Journal of the American Chemical Society* 112(21):7772-7778.
- Adelstein S, Pritchard-Briscoe H, Anderson T, Crosbie J, Gammon G, Loblay R, Basten A, Goodnow C. 1991. Induction of self-tolerance in T cells but not B cells of transgenic mice expressing little self antigen. *Science* 251(4998):1223-1225.
- Alaniz ME, Lardone RD, Yudowski SL, Farace MI, Nores GA. 2004. Normally Occurring Human Anti-GM(1) Immunoglobulin M Antibodies and the Immune Response to Bacteria. *Infection and Immunity* 72(4):2148-2151.
- Allos BM. 1997. Association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome. *Journal of Infectious Diseases* 176(Supplement 2):S125-S128.
- Ang CW, Dijkstra JR, de Klerk MA, Endtz HP, van Doorn PA, Jacobs BC, Jeurissen SHM, Wagenaar JA. 2010. Host Factors Determine Anti-GM1 Response Following Oral Challenge of Chickens with Guillain-Barré Syndrome Derived *Campylobacter jejuni* Strain GB11. *PLoS ONE* 5(3):e9820.
- Ang CW, van Doorn PA, Endtz HP, Merckies ISJ, Jacobs BC, de Klerk MA, van Koningsveld R, van der Meché FGA. 2000. A case of Guillain-Barré syndrome following a family outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis. *Journal of Neuroimmunology* 111(1-2):229-233.
- Apostolski S, Sadiq SA, Hays A, Corbo M, Suturkova-Milosevic L, Chaliff P, Stefansson K, Lebaron RG, Ruoslahti E, Hays AP, Latov N. 1994. Identification of Gal(β 1-3)GalNAc bearing glycoproteins at the nodes of ranvier in peripheral nerve. *Journal of Neuroscience Research* 38(2):134-141.
- Ariga T. 2014. Pathogenic role of ganglioside metabolism in neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroscience Research* 92(10):1227-1242.
- Asbury AK, Arnason BG, Adams RD. 1969. THE INFLAMMATORY LESION IN IDIOPATHIC POLYNEURITIS. *Medicine* 48(3):173.
- Aureli M, Mauri L, Ciampa MG, Prinetti A, Toffano G, Secchieri C, Sonnino S. 2015. GM1 ganglioside: past studies and future potential. *Molecular neurobiology*:1-19.
- Baba H, Daune G, Ilyas A, Pestronk A, Cornblath D, Chaudhry V, Griffin J, Quarles R. 1989. Anti-G M1 ganglioside antibodies with differing fine specificities in patients with multifocal motor neuropathy. *Journal of Neuroimmunology* 25(2):143-150.
- Bach J-F. 2005. Infections and autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity* 25, Supplement(0):74-80.

- Bader SR, Kothlow S, Trapp S, Schwarz SCN, Philipp H-C, Weigend S, Sharifi AR, Preisinger R, Schmahl W, Kaspers B, Matiasek K. 2010. Acute parietic syndrome in juvenile White Leghorn chickens resembles late stages of acute inflammatory demyelinating polyneuropathies in humans. *Journal of Neuroinflammation* 7:7-7.
- Barnaba V, Sinigaglia F. 1997. Molecular Mimicry and T Cell-mediated Autoimmune Disease. *The Journal of Experimental Medicine* 185(9):1529-1532.
- Bax M, Kuijf ML, Heikema AP, van Rijs W, Bruijns SCM, García-Vallejo JJ, Crocker PR, Jacobs BC, van Vliet SJ, van Kooyk Y. 2011. Campylobacter jejuni Lipooligosaccharides Modulate Dendritic Cell-Mediated T Cell Polarization in a Sialic Acid Linkage-Dependent Manner. *Infection and Immunity* 79(7):2681-2689.
- Bech E, Ørntoft TF, Andersen LP, Skinhøj P, Jakobsen J. 1997. IgM anti-GM1 antibodies in the Guillain-Barré syndrome: a serological predictor of the clinical course. *Journal of Neuroimmunology* 72(1):59-66.
- Bereswill S, Fischer A, Plickert R, Haag L-M, Otto B, Kühl AA, Dashti JI, Zautner AE, Muñoz M, Lodenkemper C, Groß U, Göbel UB, Heimesaat MM. 2011. Novel Murine Infection Models Provide Deep Insights into the “Ménage à Trois” of Campylobacter jejuni, Microbiota and Host Innate Immunity. *PLoS ONE* 6(6):e20953.
- Bourque PR, Chardon JW, Massie R. 2015. Autoimmune peripheral neuropathies. *Clinica Chimica Acta*(0).
- Bowes T, Wagner ER, Boffey J, Nicholl D, Cochrane L, Benboubetra M, Conner J, Furukawa K, Furukawa K, Willison HJ. 2002. Tolerance to Self Gangliosides Is the Major Factor Restricting the Antibody Response to Lipopolysaccharide Core Oligosaccharides in Campylobacter jejuni Strains Associated with Guillain-Barré Syndrome. *Infection and Immunity* 70(9):5008-5018.
- Brocca P, Bernardi A, Raimondi L, Sonnino S. 2000. Modeling ganglioside headgroups by conformational analysis and molecular dynamics. *Glycoconj J* 17(5):283-299.
- Buchwald B, Weishaupt A, Toyka KV, Dudel J. 1995. Immunoglobulin G from a patient with Miller-Fisher syndrome rapidly and reversibly depresses evoked quantal release at the neuromuscular junction of mice. *Neuroscience Letters* 201(2):163-166.
- Buchwald B, Weishaupt A, Toyka KV, Dudel J. 1998. Pre- and postsynaptic blockade of neuromuscular transmission by Miller-Fisher syndrome IgG at mouse motor nerve terminals. *European Journal of Neuroscience* 10(1):281-290.
- Buchwald B, Zhang G, Vogt-Eisele AK, Zhang W, Ahangari R, Griffin JW, Hatt H, Toyka KV, Sheikh KA. 2007. Anti-ganglioside antibodies alter presynaptic release and calcium influx. *Neurobiology of disease* 28(1):113-121.
- Burke GP, Smith KA, Rachel Stocking IG, Ferm M, McIntyre OR. 1977. Anti-keyhole limpet hemocyanin antibody in normal unsensitized individuals. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 59(4):309-313.
- Cao-Lormeau V-M, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, Dub T, Baudouin L, Teissier A, Larre P, Vial A-L, Decam C, Choumet V, Halstead SK, Willison HJ, Musset L, Manuguerra J-C, Despres P, Fournier E, Mallet H-P, Musso D, Fontanet A, Neil J,

- Ghawché F. 2016. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *The Lancet* 387(10027):1531-1539.
- Caporale CM, Capasso M, Luciani M, Prencipe V, Creati B, Gandolfi P, De Angelis MV, Di Muzio A, Caporale V, Uncini A. 2006. Experimental axonopathy induced by immunization with *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharide from a patient with Guillain-Barré syndrome. *Journal of Neuroimmunology* 174(1-2):12-20.
- Castañeda Fernández JA, del Corral García J. 2003. Neuropatías periféricas. *MEDISAN* 7(4):35-41.
- Cats EA, van der Pol W-L, Tio-Gillen AP, Diekstra FP, van den Berg LH, Jacobs BC. 2015. Clonality of anti-GM1 IgM antibodies in multifocal motor neuropathy and the Guillain-Barré syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 86(5):502-504.
- Cobb BA, Wang Q, Tzianabos AO, Kasper DL. 2004. Polysaccharide Processing and Presentation by the MHCII Pathway. *Cell* 117(5):677-687.
- Comín R, Yuki N, Lopez PHH, Nores GA. 2006. High affinity of anti-GM1 antibodies is associated with disease onset in experimental neuropathy. *Journal of Neuroscience Research* 84(5):1085-1090.
- Cunningham ME, McGonigal R, Meehan GR, Barrie JA, Yao D, Halstead SK, Willison HJ. 2016. Anti-ganglioside antibodies are removed from circulation in mice by neuronal endocytosis. *Brain* 139(6):1657-1665.
- Chiba A, Kusunoki S, Obata H, Machinami R, Kanazawa I. 1997. Ganglioside composition of the human cranial nerves, with special reference to pathophysiology of Miller Fisher syndrome. *Brain research* 745(1):32-36.
- Christiansen D, Vaughan HA, Miland J, Dodge N, Mouhtouris E, Smyth MJ, Godfrey DI, Sandrin MS. 2011. Antibody responses to glycolipid-borne carbohydrates require CD4+ T cells but not CD1 or NKT cells. *Immunol Cell Biol* 89(4):502-510.
- Dasgupta S, Li D, Yu R. 2004. Lack of Apparent Neurological Abnormalities in Rabbits Sensitized by Gangliosides. *Neurochem Res* 29(11):2147-2152.
- Donofrio PD. 2012. *Textbook of Peripheral Neuropathy*: Demos Medical Pub.
- Estevez F, Carr A, Solorzano L, Valiente O, Mesa C, Barroso O, Victoriano Sierra G, Fernandez LE. 1999. Enhancement of the immune response to poorly immunogenic gangliosides after incorporation into very small size proteoliposomes (VSSP). *Vaccine* 18(1-2):190-197.
- Fewou SN, Rupp A, Nickolay LE, Carrick K, Greenshields KN, Pediani J, Plomp JJ, Willison HJ. 2012. Anti-ganglioside antibody internalization attenuates motor nerve terminal injury in a mouse model of acute motor axonal neuropathy. *The Journal of Clinical Investigation* 122(3):1037-1051.
- Freddo L, Yu R, Latov N, Donofrio P, Hays A, Greenberg H, Albers J, Alessi A, Keren D. 1986. Gangliosides GM1 and GD1b are antigens for IgM M-protein in a patient with motor neuron disease. *Neurology* 36(4):454-458.

- Freimer ML, McIntosh K, Adams RA, Alving CR, Drachman DB. 1993. Gangliosides Elicit a T-Cell Independent Antibody Response. *Journal of Autoimmunity* 6(3):281-289.
- Galili U, Macher B, Buehler J, Shohet S. 1985. Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha (1---3)-linked galactose residues. *The Journal of Experimental Medicine* 162(2):573-582.
- Gallardo E, Rojas-García R, Belvís R, Serrano-Munuera C, Ortiz E, Ortiz N, Grau J, Illa I. 2001. Antiganglioside antibodies: when, which and for what. *Neurología* 16(7):293-297.
- Geleijns K, Jacobs BC, Van Rijs W, Tio-Gillen AP, Laman JD, van Doorn PA. 2004. Functional polymorphisms in LPS receptors CD14 and TLR4 are not associated with disease susceptibility or *Campylobacter jejuni* infection in Guillain–Barré patients. *Journal of Neuroimmunology* 150(1–2):132-138.
- Geleijns K, Roos A, Houwing-Duistermaat JJ, van Rijs W, Tio-Gillen AP, Laman JD, van Doorn PA, Jacobs BC. 2006. Mannose-Binding Lectin Contributes to the Severity of Guillain-Barré Syndrome. *The Journal of Immunology* 177(6):4211-4217.
- Gilbert M, Karwaski M-F, Bernatchez S, Young NM, Taboada E, Michniewicz J, Cunningham A-M, Wakarchuk WW. 2002. The Genetic Bases for the Variation in the Lipooligosaccharide of the Mucosal Pathogen, *Campylobacter jejuni* : BIOSYNTHESIS OF SIALYLATED GANGLIOSIDE MIMICS IN THE CORE OLIGOSACCHARIDE. *Journal of Biological Chemistry* 277(1):327-337.
- Gong Y, Tagawa Y, Lunn M, Laroy W, Heffer-Lauc M, Li C, Griffin J, Schnaar RL, Sheikh KA. 2002. Localization of major gangliosides in the PNS: implications for immune neuropathies. *Brain* 125(11):2491-2506.
- Goodfellow JA, Bowes T, Sheikh K, Odaka M, Halstead SK, Humphreys PD, Wagner ER, Yuki N, Furukawa K, Furukawa K, Plomp JJ, Willison HJ. 2005. Overexpression of GD1a Ganglioside Sensitizes Motor Nerve Terminals to Anti-GD1a Antibody-Mediated Injury in a Model of Acute Motor Axonal Neuropathy. *The Journal of Neuroscience* 25(7):1620-1628.
- Goodnow CC. 2007. Multistep Pathogenesis of Autoimmune Disease. *Cell* 130(1):25-35.
- Goodnow CC, Sprent J, de St Groth BF, Vinuesa CG. 2005. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435(7042):590-597.
- Govoni V, Granieri E, Manconi M, Capone J, Casetta I. 2003. Is there a decrease in Guillain–Barré syndrome incidence after bovine ganglioside withdrawal in Italy? A population-based study in the Local Health District of Ferrara, Italy. *Journal of the Neurological Sciences* 216(1):99-103.
- Greenshields KN, Halstead SK, Zitman FMP, Rinaldi S, Brennan KM, O’Leary C, Chamberlain LH, Easton A, Roxburgh J, Pediani J, Furukawa K, Furukawa K, Goodyear CS, Plomp JJ, Willison HJ. 2009. The neuropathic potential of anti-GM1 autoantibodies is regulated by the local glycolipid environment in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 119(3):595-610.

- Griffin JW, Li CY, Ho TW, Tian M, Gao CY, Xue P, Mishu B, Cornblath DR, Macko C, McKhann GM, Asbury AK. 1996. Pathology of the motor-sensory axonal Guillain-Barré syndrome. *Annals of Neurology* 39(1):17-28.
- Guijo CG, Garcia-Merino A, Rubio G, Guerrero A, Martinez AC, Arpa J. 1992. IgG anti-ganglioside antibodies and their subclass distribution in two patients with acute and chronic motor neuropathy. *Journal of Neuroimmunology* 37(1):141-148.
- Guillain G, Barre J, Strohl A. 1916. Sur un syndrome deradiculonévrite avec hyperalbuminose du liquide céphalo-rachidien sans réaction cellulaire'. *Bull Soc Med H6p(Paris)* 40:1462-1470.
- Hafer-Macko C, Hsieh S-T, Ho TW, Sheikh K, Cornblath DR, Li CY, McKhann GM, Asbury AK, Griffin JW. 1996a. Acute motor axonal neuropathy: An antibody-mediated attack on axolemma. *Annals of Neurology* 40(4):635-644.
- Hafer-Macko CE, Sheikh KA, Li CY, Ho TW, Cornblath DR, McKhann GM, Asbury AK, Griffin JW. 1996b. Immune attack on the schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Annals of Neurology* 39(5):625-635.
- Hahn A. 1996. Experimental allergic neuritis (EAN) as a model for the immune-mediated demyelinating neuropathies. *Revue neurologique* 152(5):328-332.
- Hakomori S-i. 2002. The glycosynapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(1):225-232.
- Halstead SK, O'Hanlon GM, Humphreys PD, Morrison DB, Morgan BP, Todd AJ, Plomp JJ, Willison HJ. 2004. Anti-disialoside antibodies kill perisynaptic Schwann cells and damage motor nerve terminals via membrane attack complex in a murine model of neuropathy. 2109-2123 p.
- Halstead SK, Zitman FMP, Humphreys PD, Greenshields K, Verschuuren JJ, Jacobs BC, Rother RP, Plomp JJ, Willison HJ. 2008. Eculizumab prevents anti-ganglioside antibody-mediated neuropathy in a murine model. 1197-1208 p.
- Hannum LG, Ni D, Haberman AM, Weigertfi MG, Shlomchik MJ. 1996. A disease-related rheumatoid factor autoantibody is not tolerized in a normal mouse: implications for the origins of autoantibodies in autoimmune disease. *The Journal of Experimental Medicine* 184(4):1269-1278.
- Harris J, Markl J. 1999. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron* 30(6):597-623.
- Hartley SB, Goodnow CC. 1994. Censoring of self-reactive B cells with a range of receptor affinities in transgenic mice expressing heavy chains for a lysozyme-specific antibody. *International immunology* 6(9):1417-1425.
- Hersh EM, Dyre SE. 1974. Cells binding the antigen keyhole limpet haemocyanin in the peripheral blood and in the lymphocyte cultures of non-immune and immunized human subjects. *Clinical and Experimental Immunology* 17(2):299-309.

- Hirabayashi Y, Suzuki T, Suzuki Y, Taki T, Matsumoto M, Higashi H, Kato S. 1983. A New Method for Purification of Anti-Glycosphingolipid Antibody. Avian Anti-Hematoside (NeuGc) Antibody. *The Journal of Biochemistry* 94(1):327-330.
- Hiraga A, Mori M, Ogawara K, Hattori T, Kuwabara S. 2003. Differences in patterns of progression in demyelinating and axonal Guillain-Barré syndromes. *Neurology* 61(4):471-474.
- Ho T, Hsieh S-T, Nachamkin I, Willison H, Sheikh K, Kiehlbauch J, Flanigan K, McArthur J, Cornblath D, McKhann G. 1997a. Motor nerve terminal degeneration provides a potential mechanism for rapid recovery in acute motor axonal neuropathy after *Campylobacter* infection. *Neurology* 48(3):717-724.
- Ho T, Li C, Cornblath D, Gao C, Asbury A, Griffin J, McKhann G. 1997b. Patterns of recovery in the Guillain-Barré syndromes. *Neurology* 48(3):695-700.
- Ho T, McKhann G, Griffin J. 1998. Human autoimmune neuropathies. *Annual review of neuroscience* 21(1):187-226.
- Hughes RAC, Cornblath DR. 2005. Guillain-Barré syndrome. *The Lancet* 366(9497):1653-1666.
- Huizinga R, Easton AS, Donachie AM, Guthrie J, van Rijs W, Heikema A, Boon L, Samsom JN, Jacobs BC, Willison HJ, Goodyear CS. 2012. Sialylation of *Campylobacter jejuni* Lipo-Oligosaccharides: Impact on Phagocytosis and Cytokine Production in Mice. *PLoS ONE* 7(3):e34416.
- Ilyas AA, Quarles RH, Dalakas MC, Brady RO. 1985a. Polyneuropathy with monoclonal gammopathy: glycolipids are frequently antigens for IgM paraproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(19):6697-6700.
- Ilyas AA, Quarles RH, Dalakas MC, Fishman PH, Brady RO. 1985b. Monoclonal IgM in a patient with paraproteinemic polyneuropathy binds to gangliosides containing disialosyl groups. *Annals of Neurology* 18(6):655-659.
- Ilyas AA, Willison HJ, Quarles RH, Jungalwala FB, Cornblath DR, Trapp BD, Griffin DE, Griffin JW, McKhann GM. 1988. Serum antibodies to gangliosides in guillain-barré syndrome. *Annals of Neurology* 23(5):440-447.
- Illa I, Ortiz N, Gallard E, Juarez C, Grau JM, Dalakas MC. 1995. Acute axonal Guillain-Barré syndrome with IgG antibodies against motor axons following parenteral gangliosides. *Annals of Neurology* 38(2):218-224.
- IUPAC-IUB. 1998. Nomenclature of glycolipids. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) 257(2):293-298.
- Jiao H, Wang W, Wang H, Wu Y, Wang L. 2012. Tumor necrosis factor alpha 308 G/A polymorphism and Guillain-Barré syndrome risk. *Mol Biol Rep* 39(2):1537-1540.
- Kaida K-i, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. 2004. Ganglioside complexes as new target antigens in Guillain-Barré syndrome. *Annals of Neurology* 56(4):567-571.

- Kaida K, Kusunoki S. 2010. Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: Mini-review. *Journal of Neuroimmunology* 223(1-2):5-12.
- Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. 2007. Anti-ganglioside complex antibodies associated with severe disability in GBS. *Journal of Neuroimmunology* 182(1-2):212-218.
- Kaida K, Sonoo M, Ogawa G, Kamakura K, Ueda-Sada M, Arita M, Motoyoshi K, Kusunoki S. 2008. GM1/GalNAc-GD1a complex A target for pure motor Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 71(21):1683-1690.
- Kawashima I, Nakamura O, Tai T. 1992. Antibody responses to ganglio-series gangliosides in different strains of inbred mice. *Molecular immunology* 29(5):625-632.
- Khalili-Shirazi A, Gregson N, Hall M, Hughes R, Lanchbury J. 1997. T cell receptor V β gene usage in Guillain-Barré syndrome. *Journal of the Neurological Sciences* 145(2):169-176.
- Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, Hartung H-P. 2001. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Progress in Neurobiology* 64(2):109-127.
- Kieseier BC, Kiefer R, Gold R, Hemmer B, Willison HJ, Hartung H-P. 2004. Advances in understanding and treatment of immune-mediated disorders of the peripheral nervous system. *Muscle & Nerve* 30(2):131-156.
- Klinman NR. 1996. The "clonal selection hypothesis" and current concepts of B cell tolerance. *Immunity* 5(3):189-195.
- Koga M, Takahashi M, Masuda M, Hirata K, Yuki N. 2005. Campylobacter gene polymorphism as a determinant of clinical features of Guillain-Barre syndrome. *American Journal of Ophthalmology* 141(2):426.
- Koga M, Yuki N, Hirata K, Morimatsu M, Mori M, Kuwabara S. 2003. Anti-GM1 antibody IgG subclass A clinical recovery predictor in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 60(9):1514-1518.
- Kojima N, Hakomori S. 1989. Specific interaction between gangliotriaosylceramide (Gg3) and sialosylactosylceramide (GM3) as a basis for specific cellular recognition between lymphoma and melanoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 264(34):20159-20162.
- Köller H, Kieseier BC, Jander S, Hartung H-P. 2005. Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy. *New England Journal of Medicine* 352(13):1343-1356.
- Kuijff ML, Godschalk PCR, Gilbert M, Endtz HP, Tio-Gillen AP, Ang CW, van Doorn PA, Jacobs BC. 2007. Origin of ganglioside complex antibodies in Guillain-Barré syndrome. *Journal of Neuroimmunology* 188(1-2):69-73.
- Kuijff ML, Samsom JN, van Rijs W, Bax M, Huizinga R, Heikema AP, van Doorn PA, van Belkum A, van Kooyk Y, Burgers PC, Luider TM, Endtz HP, Nieuwenhuis EES, Jacobs BC. 2010. TLR4-Mediated Sensing of Campylobacter jejuni by Dendritic Cells Is Determined by Sialylation. *The Journal of Immunology* 185(1):748-755.

- Kuitwaard K, van Koningsveld R, Ruts L, Jacobs BC, van Doorn PA. 2009. Recurrent Guillain–Barré syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 80(1):56-59.
- Kurokawa T, Wuhler M, Lochnit G, Geyer H, Markl J, Geyer R. 2002. Hemocyanin from the keyhole limpet *Megathura crenulata* (KLH) carries a novel type of N-glycans with Gal(β 1–6)Man-motifs. *European Journal of Biochemistry* 269(22):5459-5473.
- Kusunoki S, Hitoshi S, Kaida K-i, Murayama S, Kanazawa I. 1999. Degeneration of rabbit sensory neurons induced by passive transfer of anti-GD1b antiserum. *Neuroscience Letters* 273(1):33-36.
- Kusunoki S, Shimizu J, Chiba A, Ugawa Y, Hitoshi S, Kanazawa I. 1996. Experimental sensory neuropathy induced by sensitization with ganglioside GD1b. *Annals of Neurology* 39(4):424-431.
- Kuwabara S, Bostock H, Ogawara K, Sung J-Y, Kanai K, Mori M, Hattori T, Burke D. 2003. The refractory period of transmission is impaired in axonal Guillain–Barré syndrome. *Muscle & Nerve* 28(6):683-689.
- Kuwabara S, Yuki N. 2013. Axonal Guillain–Barré syndrome: concepts and controversies. *The Lancet Neurology* 12(12):1180-1188.
- Lardone RD, Yuki N, Irazoqui FJ, Nores GA. 2016. Individual Restriction Of Fine Specificity Variability In Anti-GM1 IgG Antibodies Associated With Guillain-Barré Syndrome. *Scientific Reports* 6:19901.
- Lardone RD, Yuki N, Odaka M, Daniotti JL, Irazoqui FJ, Nores GA. 2010. Anti-GM1 IgG antibodies in Guillain–Barré syndrome: fine specificity is associated with disease severity. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 81(6):629-633.
- Le Bourhis L, Guerri L, Dusseaux M, Martin E, Soudais C, Lantz O. 2011. Mucosal-associated invariant T cells: unconventional development and function. *Trends in Immunology* 32(5):212-218.
- Ledeen RW, Wu G. 2002. Ganglioside function in calcium homeostasis and signaling. *Neurochem Res* 27(7-8):637-647.
- Li C, Xue P, Tian W, Liu R, Yang C. 1996. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in the chicken: an animal model of axonal Guillain–Barré syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 61(3):279-284.
- Livingston PO. 1995. Approaches to Augmenting the Immunogenicity of Melanoma Gangliosides: From Whole Melanoma Cells to Ganglioside-KLH Conjugate Vaccines. *Immunological Reviews* 145(1):147-166.
- Lopez PH, Lardone R, Irazoqui F, Maccioni M, Nores G. 2002a. The Origin of Anti-GM1 Antibodies in Neuropathies: The “Binding Site Drift” Hypothesis. *Neurochem Res* 27(7-8):687-695.
- Lopez PH, Zhang G, Zhang J, Lehmann HC, Griffin JW, Schnaar RL, Sheikh KA. 2010. Passive Transfer of IgG Anti-GM1 Antibodies Impairs Peripheral Nerve Repair. *The Journal of Neuroscience* 30(28):9533-9541.

- Lopez PHH, Irazoqui FJ, Nores GA. 2000. Normal human plasma contains antibodies that specifically block neuropathy-associated human anti-GM1 IgG-antibodies. *Journal of Neuroimmunology* 105(2):179-183.
- Lopez PHH, Lardone RD, Irazoqui FJ, Villa AM, Di Egidio M, Saizar RD, Sica REP, Nores GA. 2001. Variable patterns of anti-GM1 IgM-antibody populations defined by affinity and fine specificity in patients with motor syndromes: evidence for their random origin. *Journal of Neuroimmunology* 119(1):131-136.
- Lopez PHH, Villa AM, Sica REP, Nores GA. 2002b. High affinity as a disease determinant factor in anti-GM1 antibodies: comparative characterization of experimentally induced vs. disease-associated antibodies. *Journal of Neuroimmunology* 128(1-2):69-76.
- Lunn M, Johnson LAA, Fromholt SE, Itonori S, Huang J, Vyas AA, Hildreth JE, Griffin JW, Schnaar RL, Sheikh KA. 2000. High-Affinity Anti-Ganglioside IgG Antibodies Raised in Complex Ganglioside Knockout Mice. *Journal of neurochemistry* 75(1):404-412.
- Lutz HU. 2012. *Naturally Occurring Antibodies (NABs)*: Springer Science+Business Media.
- Lutz HU, Binder CJ, Kaveri S. 2009. Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease. *Trends in Immunology* 30(1):43-51.
- Ma J, Nishimura M, Mine H, Kuroki S, Nukina M, Ohta M, Saji H, Obayashi H, Saida T, Kawakami H, Uchiyama T. 1998. HLA and T-cell receptor gene polymorphisms in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 51(2):379-384.
- Mackay IR, Rose NR. 2013. *The Autoimmune Diseases*: Elsevier Science.
- Madi A, Bransburg-Zabary S, Kenett DY, Ben-Jacob E, Cohen IR. 2012. The Natural Autoantibody Repertoire in Newborns and Adults. In: Lutz HU, editor. *Naturally Occurring Antibodies (NABs)*. New York, NY: Springer New York. p 198-212.
- Marcus DM. 1969. The ABO and Lewis Blood-Group System. *New England Journal of Medicine* 280(18):994-1006.
- Matsumoto Y, Kobata T, Odaka M, Furukawa K, Hirata K, Yuki N. 2010. BAFF aids generation of IgG anti-ganglioside antibodies in response to *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide. *Journal of Neuroimmunology* 218(1-2):67-72.
- Mauri L, Casellato R, Ciampa MG, Uekusa Y, Kato K, Kaida K-i, Motoyama M, Kusunoki S, Sonnino S. 2012. Anti-GM1/GD1a complex antibodies in GBS sera specifically recognize the hybrid dimer GM1-GD1a. *Glycobiology* 22(3):352-360.
- McAarney T, Ogino M, Apostolski S, Latov N. 1995. Specificity and cross-reactivity of anti-galactocerebroside antibodies. *Immunological investigations* 24(4):595-606.
- McCarthy N, Giesecke J. 2001. Incidence of Guillain-Barré Syndrome following Infection with *Campylobacter jejuni*. *American Journal of Epidemiology* 153(6):610-614.
- McGonigal R, Rowan EG, Greenshields KN, Halstead SK, Humphreys PD, Rother RP, Furukawa K, Willison HJ. 2010. Anti-GD1a antibodies activate complement and calpain to injure distal motor nodes of Ranvier in mice. 1944-1960 p.

- McKhann GM, Cornblath DR, Griffin JW, Ho TW, Li CY, Jiang Z, Wu HS, Zhaori G, Liu Y, Jou LP, Liu TC, Gao CY, Mao JY, Blaser MJ, Mishu B, Asbury AK. 1993. Acute motor axonal neuropathy: A frequent cause of acute flaccid paralysis in China. *Annals of Neurology* 33(4):333-342.
- Misawa S. 2015. Novel Therapeutic Interventions in Guillain-Barre Syndrome: Review and Future Perspective. *Brain and nerve* 67(11):1421-1428.
- Miyoshi I, Fujii Y, Naiki M. 1982. Avian Antisera to Various Gangliosides: Detection by Enzyme Immunoassay. *The Journal of Biochemistry* 92(1):89-94.
- Mizutamari RK, Kremer LJ, Basile EA, Nores GA. 1998. Anti-GM1 ganglioside igm-antibodies present in human plasma: Affinity and biological activity changes in a patient with neuropathy. *Journal of Neuroscience Research* 51(2):237-242.
- Mizutamari RK, Wiegandt H, Nores GA. 1994. Characterization of anti-ganglioside antibodies present in normal human plasma. *Journal of Neuroimmunology* 50(2):215-220.
- Momoi T, Tokunaga T, Nagai Y. 1982. Specific interaction of peanut agglutinin with the glycolipid asialo GM1. *FEBS Letters* 141(1):6-10.
- Moyano AL, Comín R, Lardone RD, Alaniz ME, Theaux R, Irazoqui FJ, Nores GA. 2008. Validation of a rabbit model of neuropathy induced by immunization with gangliosides. *Journal of the Neurological Sciences* 272(1-2):110-114.
- Moyano AL, Comín R, Vilcaes AA, Funes SC, Roth GA, Irazoqui FJ, Nores GA. 2012. Novel antibodies reacting with two neighboring gangliosides are induced in rabbits immunized with bovine brain gangliosides. *Glycobiology* 22(12):1768-1774.
- Murphy KM. 2011. *Janeway's Immunobiology*: Taylor & Francis Group.
- Nachamkin I. 2002. Rabbit model of Guillain-Barré syndrome. *Annals of Neurology* 52(1):127-128.
- Nachamkin I, Ung H, Moran AP, Yoo D, Prendergast MM, Nicholson MA, Sheikh K, Ho T, Asbury AK, McKhann GM, Griffin JW. 1999. Ganglioside GM1 Mimicry in *Campylobacter* Strains from Sporadic Infections in the United States. *Journal of Infectious Diseases* 179(5):1183-1189.
- Nagai Y, Momoi T, Saito M, Mitsuzawa E, Ohtani S. 1976. Ganglioside syndrome, a new autoimmune neurologic disorder, experimentally induced with brain gangliosides. *Neuroscience Letters* 2(2):107-111.
- Nobile-Orazio E, Carpo M, Meucci N, Grassi MP, Capitani E, Sciacco M, Mangoni A, Scarlato G. 1992. Guillain-Barré syndrome associated with high titers of anti-GM1 antibodies. *Journal of the Neurological Sciences* 109(2):200-206.
- Nores GA, Dennis RD, Helling F, Wiegandt H. 1991. Human Heterophile Antibodies Recognizing Epitopes Present on Insect Glycolipids. *Journal of Biochemistry* 110(1):1-8.
- Nores GA, Lardone RD, Comín R, Alaniz ME, Moyano AL, Irazoqui FJ. 2008. Anti-GM1 antibodies as a model of the immune response to self-glycans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1780(3):538-545.

- Nores GA, Mizutamari RK, Kremer DM. 1994. Chromatographic tank designed to obtain highly reproducible high-performance thin-layer chromatograms of gangliosides and neutral glycosphingolipids. *Journal of Chromatography A* 686(1):155-157.
- Nyati K, Prasad K, Kharwar N, Soni P, Husain N, Agrawal V, Jain A. 2012. Immunopathology and Th1/Th2 immune response of *Campylobacter jejuni*-induced paralysis resembling Guillain-Barré syndrome in chicken. *Med Microbiol Immunol* 201(2):177-187.
- Nyati KK, Prasad KN, Rizwan A, Verma A, Paliwal VK. 2011. TH1 and th2 response to campylobacter jejuni antigen in guillain-barré syndrome. *Archives of Neurology* 68(4):445-452.
- O'Hanlon GM, Humphreys PD, Goldman RS, Halstead SK, Bullens RWM, Plomp JJ, Ushkaryov Y, Willison HJ. 2003. Calpain inhibitors protect against axonal degeneration in a model of anti-ganglioside antibody-mediated motor nerve terminal injury. 2497-2509 p.
- Ogawa-Goto K, Funamoto N, Ohta Y, Abe T, Nagashima K. 1992. Myelin gangliosides of human peripheral nervous system: an enrichment of GM1 in the motor nerve myelin isolated from cauda equina. *Journal of Neurochemistry* 59(5):1844-1849.
- Ogawara K, Kuwabara S, Mori M, Hattori T, Koga M, Yuki N. 2000. Axonal Guillain-Barré syndrome: Relation to anti-ganglioside antibodies and *Campylobacter jejuni* infection in Japan. *Annals of Neurology* 48(4):624-631.
- Olsson Y. 1968. Topographical differences in the vascular permeability of the peripheral nervous system. *Acta Neuropathol* 10(1):26-33.
- Oyelaran O, Gildersleeve JC. 2010. Evaluation of human antibody responses to keyhole limpet hemocyanin on a carbohydrate microarray. *PROTEOMICS – Clinical Applications* 4(3):285-294.
- Panda S, Ding JL. 2015. Natural Antibodies Bridge Innate and Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology* 194(1):13-20.
- Paterson G, Wilson G, Kennedy PG, Willison HJ. 1995. Analysis of anti-GM1 ganglioside IgM antibodies cloned from motor neuropathy patients demonstrates diverse V region gene usage with extensive somatic mutation. *The Journal of Immunology* 155(6):3049-3059.
- Pestronk A, Choksi R, Blume G, Lopate G. 1997. Multifocal motor neuropathy Serum IgM binding to a GM1 ganglioside-containing lipid mixture but not to GMI alone. *Neurology* 48(4):1104-1106.
- Phillips MS, Stewart S, Anderson JR. 1984. Neuropathological findings in Miller Fisher syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 47(5):492-495.
- Phongsisay V. 2016. The immunobiology of *Campylobacter jejuni*: Innate immunity and autoimmune diseases. *Immunobiology* 221(4):535-543.
- Prineas JW. 1981. Pathology of the Guillain-Barré syndrome. *Annals of Neurology* 9(S1):6-19.
- Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L, Gentile M, Comerma L, Chorny A, Shan M, Xu W, Magri G, Knowles DM, Tam W, Chiu A, Bussel JB, Serrano S, Lorente JA, Bellosillo B,

- Lloreta J, Juanpere N, Alameda F, Baró T, de Heredia CD, Torán N, Català A, Torredadell M, Fortuny C, Cusi V, Carreras C, Diaz GA, Blander JM, Farber C-M, Silvestri G, Cunningham-Rundles C, Calvillo M, Dufour C, Notarangelo LD, Lougaris V, Plebani A, Casanova J-L, Ganal SC, Diefenbach A, Aróstegui JI, Juan M, Yagüe J, Mahlaoui N, Donadieu J, Chen K, Cerutti A. 2011. B-helper neutrophils stimulate immunoglobulin diversification and production in the marginal zone of the spleen. *Nature Immunology* 13(2):170-180.
- Rinaldi S. 2013. Update on Guillain-Barré syndrome. *Journal of the Peripheral Nervous System* 18(2):99-112.
- Rinaldi S, Brennan KM, Kalna G, Walgaard C, van Doorn P, Jacobs BC, Yu RK, Mansson J-E, Goodyear CS, Willison HJ. 2013. Antibodies to Heteromeric Glycolipid Complexes in Guillain-Barré Syndrome. *PLoS ONE* 8(12):e82337.
- Rinaldi S, Brennan KM, Willison HJ. 2012. Combinatorial glycoarray. *Carbohydrate Microarrays: Springer*. p 413-423.
- Roberts M, Vincent A, Newsom-Davis J, Willison H. 1994. Serum factor in Miller-Fisher variant of Guillain-Barré syndrome and neurotransmitter release. *The Lancet* 343(8895):454-455.
- Roitt I. 2008. *Inmunología. Fundamentos: Editorial Medica Panamericana Sa de*.
- Rose NR, Bona C. 1993. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunology Today* 14(9):426-430.
- Sadiq SA, Thomas FP, Kilidireas K, Protopsaltis S, Hays A, Lee KW, Romas SN, Kumar N, van den Berg LH, Santoro M, Lange DJ, Younger DS, Lovelace RE, Trojaborg W, Sherman WH, Miller JR, Minuk J, Fehr MA, Roelofs RI, Hollander D, Nichols FT, Mitsumoto H, Kelley JJ, Swift TRJ, Munsat TL, Latov N. 1990. The spectrum of neurologic disease associated with anti-GM1 antibodies. *Neurology* 40(7):1067-1072.
- Saida K, Sumner AJ, Saida T, Brown MJ, Silberberg DH. 1980. Antiserum-mediated demyelination: Relationship between remyelination and functional recovery. *Annals of Neurology* 8(1):12-24.
- Saida T, Saida K, Dorfman S, Silberberg D, Sumner A, Manning M, Lisak R, Brown M. 1979. Experimental allergic neuritis induced by sensitization with galactocerebroside. *Science* 204(4397):1103-1106.
- Sandhoff K, Harzer K. 2013. Gangliosides and Gangliosidoses: Principles of Molecular and Metabolic Pathogenesis. *The Journal of Neuroscience* 33(25):10195-10208.
- Santoro M, Uncini A, Corbo M, Staugaitis SM, Thomas FP, Hays AP, Latov N. 1992. Experimental conduction block induced by serum from a patient with anti-GM1 antibodies. *Annals of Neurology* 31(4):385-390.
- Sfriso P, Ghirardello A, Botsios C, Tonon M, Zen M, Bassi N, Bassetto F, Doria A. 2010. Infections and autoimmunity: the multifaceted relationship. *Journal of Leukocyte Biology* 87(3):385-395.

- Sheikh K, Nachamkin I, Ho T, Willison H, Veitch J, Ung H, Nicholson M, Li C, Wu H, Shen B. 1998. *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides in Guillain-Barré syndrome Molecular mimicry and host susceptibility. *Neurology* 51(2):371-378.
- Sheikh KA, Zhang G, Gong Y, Schnaar RL, Griffin JW. 2004. An anti-ganglioside antibody-secreting hybridoma induces neuropathy in mice. *Annals of Neurology* 56(2):228-239.
- Soliven B. 2014. Animal Models of Autoimmune Neuropathy. *ILAR Journal* 54(3):282-290.
- Sonnino S, Chiricozzi E, Ciampa MG, Mauri L, Prinetti A, Toffano G, Aureli M. 2016. Serum Antibodies to Glycans in Peripheral Neuropathies. *Molecular neurobiology*:1-4.
- Springer G. 1971. Blood-Group and Forssman Antigenic Determinants Shared between Microbes and Mammalian Cells (Part 3 of 3).
- Susuki K, Nishimoto Y, Yamada M, Baba M, Ueda S, Hirata K, Yuki N. 2003. Acute motor axonal neuropathy rabbit model: Immune attack on nerve root axons. *Annals of Neurology* 54(3):383-388.
- Susuki K, Rasband MN, Tohyama K, Koibuchi K, Okamoto S, Funakoshi K, Hirata K, Baba H, Yuki N. 2007. Anti-GM1 Antibodies Cause Complement-Mediated Disruption of Sodium Channel Clusters in Peripheral Motor Nerve Fibers. *The Journal of Neuroscience* 27(15):3956-3967.
- Susuki K, Yuki N, Schafer DP, Hirata K, Zhang G, Funakoshi K, Rasband MN. 2012. Dysfunction of nodes of Ranvier: A mechanism for anti-ganglioside antibody-mediated neuropathies. *Experimental Neurology* 233(1):534-542.
- Svennerholm L. 1980. Ganglioside designation. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 125(11).
- Svennerholm L. 1993. Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids. *Progress in brain research* 101:XI-XIV.
- Tam CC, O'Brien SJ, Petersen I, Islam A, Hayward A, Rodrigues LC. 2007. Guillain-Barré Syndrome and Preceding Infection with *Campylobacter*, Influenza and Epstein-Barr Virus in the General Practice Research Database. *PLoS ONE* 2(4):e344.
- Tettamanti G. 2003. Ganglioside/glycosphingolipid turnover: New concepts. *Glycoconj J* 20(5):301-317.
- Thomas FP, Trojaborg W, Nagy C, Santoro M, Sadiq SA, Latov N, Hays AP. 1991. Experimental autoimmune neuropathy with anti-GM1 antibodies and immunoglobulin deposits at the nodes of Ranvier. *Acta Neuropathol* 82(5):378-383.
- Tomasi M, Roda LG, Ausiello C, D'Agnolo G, Venerando B, Ghidoni R, Sonnino S, Tettamanti G. 1980. Interaction of GM1 Ganglioside with Bovine Serum Albumin Formation and Isolation of Multiple Complexes. *European Journal of Biochemistry* 111(2):315-324.
- Townson K, Boffey J, Nicholl D, Veitch J, Bundle D, Zhang P, Samain E, Antoine T, Bernardi A, Arosio D. 2007. Solid phase immunoabsorption for therapeutic and analytical studies on neuropathy-associated anti-GM1 antibodies. *Glycobiology* 17(3):294-303.

- Toyka KV, Zielasek J, Stoll G. 2002. Myelin-derived glycolipids and animal models of Guillain-Barré Syndrome. *Annals of Neurology* 51(4):532-532.
- Ueda A, Shima S, Miyashita T, Ito S, Ueda M, Kusunoki S, Asakura K, Mutoh T. 2010. Anti-GM1 antibodies affect the integrity of lipid rafts. *Molecular and Cellular Neuroscience* 45(4):355-362.
- Uncini A, Susuki K, Yuki N. 2013. Nodoparaneuropathy: Beyond the demyelinating and axonal classification in anti-ganglioside antibody-mediated neuropathies. *Clinical Neurophysiology* 124(10):1928-1934.
- Urushitani M, Ueda F, Kameyama M. 1995. Miller Fisher-Guillain-Barré overlap syndrome with enhancing lesions in the spinocerebellar tracts. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 58(2):241-243.
- Usuki S, Taguchi K, Cawthraw SA, Shibata K, Ariga T, Newell DG, Yu RK. 2006. Human and chicken antibodies to gangliosides following infection by *Campylobacter jejuni*. *Experimental Neurology* 200(1):50-55.
- van Belkum A, van den Braak N, Godschalk P, Ang W, Jacobs B, Gilbert M, Wakarchuk W, Verbrugh H, Endtz H. 2001. A *Campylobacter jejuni* gene associated with immune-mediated neuropathy. *Nat Med* 7(7):752-753.
- van den Berg B, Walgaard C, Drenthen J, Fokke C, Jacobs BC, van Doorn PA. 2014. Guillain-Barré syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Nat Rev Neurol* 10(8):469-482.
- Van Sorge N, van der Pol W-L, Jansen M, Van Den Berg L. 2004. Pathogenicity of anti-ganglioside antibodies in the Guillain-Barré syndrome. *Autoimmunity reviews* 3(2):61-68.
- Ventura A, Not T, Tommasini A, Marzari R, Sblattero D. 2004. Autoantibodies as predictors of disease. *The Lancet* 364(9443):1403-1404.
- Vliegenthart J, van Kuik J, Kamerling J. Carbohydrate analysis of hemocyanins; 1990. Leuven University Press. p 157-163.
- Vyas NK. 1991. Atomic features of protein-carbohydrate interactions. *Current Opinion in Structural Biology* 1(5):732-740.
- Weng N-p, Ritter E, Yucel E, Zhang D, Ritter G, Marcus DM. 1994. Specificity and structure of murine monoclonal antibodies against GM1 ganglioside. *Journal of Neuroimmunology* 55(1):61-68.
- Weng NP, Yu-Lee LY, Sanz I, Patten BM, Marcus DM. 1992. Structure and specificities of anti-ganglioside autoantibodies associated with motor neuropathies. *The Journal of Immunology* 149(7):2518-2529.
- Willison HJ. 2005. The immunobiology of Guillain-Barré syndromes. *Journal of the Peripheral Nervous System* 10(2):94-112.
- Willison HJ, Goodyear CS. 2013. Glycolipid antigens and autoantibodies in autoimmune neuropathies. *Trends in Immunology* 34(9):453-459.

- Willison HJ, Veitch J. 1994. Immunoglobulin subclass distribution and binding characteristics of anti-GQ1b antibodies in Miller fisher syndrome. *Journal of Neuroimmunology* 50(2):159-165.
- Willison HJ, Yuki N. 2002. Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. 2591-2625 p.
- Winer JB. 2014. An Update in Guillain-Barré Syndrome. *Autoimmune Diseases* 2014:793024.
- Wirguin I, Briani C, Suturkova-Milosevic L, Fisher T, Della-Latta P, Chalif P, Latov N. 1997. Induction of anti-GM1 ganglioside antibodies by *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides. *Journal of Neuroimmunology* 78(1-2):138-142.
- Wirguin I, Suturkova-Milosević L, Briani C, Latov N. 1995. Keyhole limpet hemocyanin contains Gal(beta 1-3)-GalNAc determinants that are cross-reactive with the T antigen. *Cancer Immunol Immunother* 40(5):307-310.
- Woodward MP, Young Jr WW, Bloodgood RA. 1985. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *Journal of Immunological Methods* 78(1):143-153.
- Wu L-y, Zhou Y, Qin C, Hu B-l. 2012. The effect of TNF-alpha, FcγR and CD1 polymorphisms on Guillain-Barré syndrome risk: Evidences from a Meta-Analysis. *Journal of Neuroimmunology* 243(1-2):18-24.
- Young KT, Davis LM, DiRita VJ. 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Micro* 5(9):665-679.
- Yuki N. 2007a. *Campylobacter* sialyltransferase gene polymorphism directs clinical features of Guillain-Barré syndrome. *Journal of Neurochemistry* 103:150-158.
- Yuki N. 2007b. Ganglioside mimicry and peripheral nerve disease. *Muscle & Nerve* 35(6):691-711.
- Yuki N. 2009. Fisher syndrome and Bickerstaff brainstem encephalitis (Fisher-Bickerstaff syndrome). *Journal of Neuroimmunology* 215(1-2):1-9.
- Yuki N. 2012. Guillain-Barré syndrome and anti-ganglioside antibodies: a clinician-scientist's journey. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences* 88(7):299-326.
- Yuki N, Hartung H-P. 2012. Guillain-Barré Syndrome. *New England Journal of Medicine* 366(24):2294-2304.
- Yuki N, Ho TW, Tagawa Y, Koga M, Li CY, Hirata K, Griffin JW. 1999. Autoantibodies to GM1b and GalNAc-GD1a: relationship to *Campylobacter jejuni* infection and acute motor axonal neuropathy in China. *Journal of the Neurological Sciences* 164(2):134-138.
- Yuki N, Ichihashi Y, Taki T. 1995. Subclass of IgG antibody to GM1 epitope-bearing lipopolysaccharide of *Campylobacter jejuni* in patients with Guillain-Barré syndrome. *Journal of Neuroimmunology* 60(1):161-164.
- Yuki N, Susuki K, Koga M, Nishimoto Y, Odaka M, Hirata K, Taguchi K, Miyatake T, Furukawa K, Kobata T, Yamada M. 2004. Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1

and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain–Barré syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(31):11404-11409.

Yuki N, Yamada M, Koga M, Odaka M, Susuki K, Tagawa Y, Ueda S, Kasama T, Ohnishi A, Hayashi S, Takahashi H, Kamijo M, Hirata K. 2001. Animal model of axonal Guillain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Annals of Neurology* 49(6):712-720.

Zhang G, Lehmann HC, Manoharan S, Hashmi M, Shim S, Ming G-L, Schnaar RL, Lopez PH, Bogdanova N, Sheikh KA. 2011. Anti-Ganglioside Antibody-Mediated Activation of RhoA Induces Inhibition of Neurite Outgrowth. *The Journal of Neuroscience* 31(5):1664-1675.

Zitman FMP, Greenshields KN, Kuijf ML, Ueda M, Kaida K-i, Broos LAM, Tio-Gillen AP, Jacobs BC, Kusunoki S, Willison HJ, Plomp JJ. 2011. Neuropathophysiological potential of Guillain–Barré syndrome anti-ganglioside-complex antibodies at mouse motor nerve terminals. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 2(3):59-67.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Publicaciones

“Gangliosides induced experimental Guillain-Barre syndrome: The role of KLH on disease triggering”. Funes S.C., Chiari M.E., Comín R., Irazoqui F.J., Nores G.A. Submitted to BBA Molecular Basis of diseases.

“Rabbit model of neuropathy induced by a single immunization with gangliosides”. Moyano A. L., Funes S.C., Comín R., Chiari M.E., Irazoqui F.J. and Nores G. A. Manuscript in preparation

“Novel antibodies reacting with two neighboring gangliosides are induced in rabbits immunized with bovine brain gangliosides”. Moyano A.L., Comín R., Vilcaes A.A., Funes S.C., Roth G.A., Irazoqui F.J., Nores G.A.. Glycobiology 2012 Jul; (22): 1768-1775.

Presentación a congresos

“Characterization of anti-gangliosides antibodies present in an experimental model of neuropathy”. Funes S.C., Chiari M.E. and Nores G.A. GlycoAr (First Argentinian Symposium of Glycobiology); Buenos Aires. 2014

“Antibodies reacting with neighboring gangliosides”. Moyano A. L., Funes S.C. and Nores G. A. GlycoAr (First Argentinian Symposium of Glycobiology); Buenos Aires. 2014

“Caracterización de la respuesta inmune humoral en un modelo experimental de Síndrome de Guillain Barré”. Funes S.C., Chiari M.E., Nores G.A. XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI); Los Cocos 2013

“Study of autoantibodies against GM1 in a rabbit model of neuropathy”. Funes S.C., Chiari M.E., Nores G.A XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB); Mendoza. Abstract en Biocell Vol 36 (Suppl.) 2012