

La moesina es una posible molécula diana en el síndrome de Guillain-Barré asociado al citomegalovirus



Setsu Sawai, MD, PhD
Mamoru Satoh, PhD
Masahiro Mori, MD,
PhD
Sonoko Misawa, MD,
PhD
Kazuyuki Sogawa, PhD
Takahiro Kazami, PhD
Masumi Ishibashi
Minako Beppu, MD
Kazumoto Shibuya, MD,
PhD
Takayuki Ishige
Yukari Sekiguchi, MD,
PhD
Kenta Noda, PhD
Kenichi Sato, PhD
Kazuyuki Matsushita,
MD, PhD
Yoshio Kodera, PhD
Fumio Nomura, MD,
PhD
Satoshi Kuwabara, MD,
PhD

Dirección para correspondencia al
Dr. Sawai:
ssawai@faculty.chiba-u.jp

RESUMEN

Objetivo: Algunos estudios histoquímicos previos en la forma desmielinizante del síndrome de Guillain Barré (SGB), polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda (AIDP) han mostrado la deposición de complemento en la superficie de las células de Schwann y, por lo tanto, habría epítomos desconocidos presentes en la superficie externa de estas células.

Métodos: Utilizamos un enfoque de base proteómica para buscar las moléculas diana de la AIDP en las proteínas extraídas de las células del schwannoma. Se obtuvo suero de 40 pacientes con SGB, 31 controles con enfermedad inflamatoria y 46 controles normales.

Resultados: Encontramos que aquellos pacientes con AIDP post-infección por citomegalovirus (CMV) tenían anticuerpos en suero contra la proteína de anclaje organizadora de membrana (moesina, *membrane-organizing extension spike protein*), que se expresa en los procesos de los nodos de Ranvier en célula de Schwann y es crucial para la mielinización. De los 40 pacientes con SGB, 6 habían tenido una infección reciente por CMV y 5 de ellos (83%) tenían niveles altos de inmunoglobulina G sérica contra la moesina. No se encontraron anticuerpos anti-moesina en ninguno de los controles con enfermedad, incluidos 5 con infección por CMV, pero sin neuropatía, y sólo en 2 (4%) de los 46 controles normales. La inmunocitoquímica mostró que la moesina se teñía en los extremos distales de las células del schwannoma al ponerlas en contacto con el suero de los pacientes con AIDP asociada a CMV, pero no con el suero de los controles.

Conclusión: La moesina es una posible molécula blanco de los auto-anticuerpos patógenos en pacientes con AIDP asociada al CMV.

Clasificación de la evidencia: Este estudio aporta evidencia Clase II de que los niveles en suero de los anticuerpos anti-moesina distinguen de forma precisa la AIDP asociada a CMV de la AIDP no asociada a CMV (sensibilidad 83%, especificidad 93%). **Neurology**® 2014;83:113-117.

GLOSARIO

AIDP = *acute inflammatory demyelinating polyneuropathy* (polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda); **AMAN** = *acute motor axonal neuropathy* (neuropatía motora axonal aguda); **CMV** = citomegalovirus; **EM** = esclerosis múltiple; **E-2D** = electroforesis bidimensional; **Ig** = inmunoglobulina; **SGB** = síndrome de Guillain-Barré

El síndrome de Guillain-Barré (SGB) se clasifica en 2 categorías principales: polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda (AIDP, *acute inflammatory demyelinating polyneuropathy*, una forma desmielinizante clásica) y neuropatía motora axonal aguda (AMAN, *acute motor axonal neuropathy*, una variante axonal), sobre la base de criterios electrofisiológicos.¹ Mientras que se ha establecido que los epítomos de la AMAN son los gangliósidos GM1 y GD1a expresados en el axolema motor,² las moléculas blanco de la AIDP siguen siendo desconocidas.

Autopsias de pacientes con etapas tempranas de AIDP revelaron el marcador de activación de complemento C3d y el neoantígeno C5b-9 del complejo terminal del complemento a lo largo de la superficie externa de las células de Schwann, en asociación con degeneración vesicular de la capa más externa de la mielina. Estas observaciones sugieren que la AIDP puede ser consecuencia de la activación de complemento por la unión de auto-anticuerpos con epítomos de la superficie externa de la célula de Schwann.³

Para identificar el antígeno blanco en la AIDP, utilizamos un enfoque de base proteómica para buscar las moléculas de superficie expresadas en la línea YST-1 de células del schwannoma, que reaccionaron a los anticuerpos del suero de la AIDP.

De los Departments of Molecular Diagnosis (S.S., M.S., K. Sogawa, T.K., M.I., M.B., T.I., K.N., K. Sato, K.M., F.N.) and Neurology (M.M., S.M., M.B., K. Shibuya, Y.S., S.K.), Graduate School of Medicine, Chiba University; y Department of Physics (Y.K.), School of Science, Kitasato University, Kanagawa, Japan.

Ir a Neurology.org para declaraciones de intereses completas. La información sobre fondos y aquellas declaraciones relevantes para los autores, si existiesen, se encuentran al final del artículo.

MÉTODOS Sujetos. Reclutamos pacientes con SGB que visitaron el *Chiba University Hospital* desde 1998 a 2011. Se recolectaron muestras de suero de 40 pacientes con SGB, que cumplían criterios clínicos de SGB,⁴ durante las 3 primeras semanas desde el inicio, antes del tratamiento. De acuerdo con los criterios electrodiagnósticos,¹ los pacientes fueron clasificados como AIDP (n = 20) o AMAN (n = 9) o sin clasificación (n = 11). Cinco pacientes con citomegalovirus (CMV), pero sin neuropatía, 16 con polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica y 10 con esclerosis múltiple (EM) sirvieron como controles enfermos. También fueron incluidos 46 sujetos sanos.

Se midieron los anticuerpos séricos contra el antígeno CMV, inmunoglobulina (Ig) G y M, con el uso de ELISA (Denka Seiken Co., Ltd., Tokyo, Japan). Siguiendo las instrucciones del fabricante, el suero era positivo si su densidad óptica era mayor a 4 DE por encima del valor promedio para las 190 muestras de controles normales. Los pacientes con valores elevados de anticuerpos IgM eran diagnosticados como infección por CMV y 6 pacientes con AIDP tenían infección por CMV. Los 6 pacientes con AIDP asociada a CMV tenían pérdida sensitiva prominente, y 5 de ellos tenían parálisis facial. Dos de las seis muestras con AIDP asociada a CMV fueron positivas (más de la media + 2 DE de los 9 controles normales) para anticuerpos IgM GM2 con el uso del kit ELISA (MyBioSource, San Diego, CA).

Aprobaciones estándar de protocolo, registros y consentimiento de pacientes. Todos los sujetos dieron su consentimiento informado y los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética del *Chiba University School of Medicine*.

Identificación de la proteína luego de electroforesis bidimensional en agarosa e inmunotransferencia. Fueron aplicadas las proteínas extraídas de las células YST-1, insolubles, con 4% 4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazineetanesulfónico y solubles con urea 7 M, tiourea 2 M, 2% (w/v) CHAPS y 0.1 M DTT. Se realizó electroforesis bidimensional (E-2D) en agarosa como fue descrito previamente.⁵ Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno, y se realizó inmunotransferencia con muestras de suero diluidas (1:500) y anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con peroxidasa de rábano picante (1:10,000; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Las bandas teñidas con reactivo de detección de Western Blot (ECL Plus; GE Healthcare, Waukesha, WI) fueron detectadas utilizando un sistema de imagen para quimioluminiscencia LPR-400EX (Taitec, Tokyo, Japan). Los sectores inmunorreactivos fueron pareados con sectores de proteínas totales teñidos con Coomassie Brilliant Blue.

Las proteínas fueron identificadas utilizando una digestión triptica en gel seguida por LTQ-XL (Thermo Scientific, San Jose, CA) de acuerdo con métodos previamente descritos.⁶ Se utilizó el motor de búsqueda Mascot (versión 2.2.6; Matrix Science, London, UK) para identificar proteínas del espectro de péptidos EM y EM/EM. Los datos de la masa de los péptidos fueron pareados buscando en la base de datos humana UniProtKB (SwissProt 2011x, August 2011, 7,645 entradas).

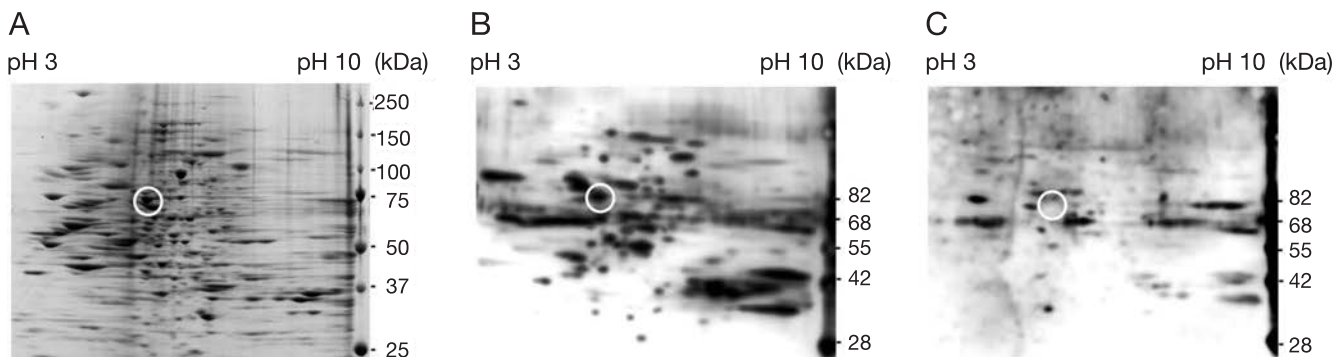
Validación del Western blot con el uso de proteína moesina humana recombinante. Se separó (100 ng por corrida) la moesina recombinante humana completa (OriGene, Rockville, MD) en geles de poliacrilamida al 7,5% y se transfirió a membranas de difluoruro de polivinilideno, y fueron inmunotransferidas con muestras de suero diluidas (1:500) y anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con peroxidasa de rábano picante (1:10,000; Jackson ImmunoResearch Laboratories). Se detectaron anticuerpos IgG anti-moesina con una adquisición de imágenes de quimioluminiscencia LPR-400EX (Taitec) luego de una incubación de 5 minutos con ECL Plus (GE Healthcare), y se realizaron mediciones densitométricas de las imágenes de bandas en Western blot utilizando un *software* de análisis de imágenes, LumiVision Imager (Taitec) en 5 minutos. El punto de corte fue la media + 2DE de los valores de los controles sanos.

Inmunocitoquímica. Las células YST-1 fueron marcadas con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-moesina humana (1:250; Abnova, Taipei, Taiwan) o suero del paciente (1:1000) en buffer fosfato salino. El anticuerpo anti-moesina fue visualizado con IgG de cabra anti-ratón conjugada Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) e IgG de suero humano con IgG de cabra anti-humano Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Inc.).

Nivel de evidencia. Nos propusimos determinar si hay evidencia Clase II de que el SGB asociado a CMV está asociado con anticuerpos IgG anti-moesina en suero en un estudio de centro único.

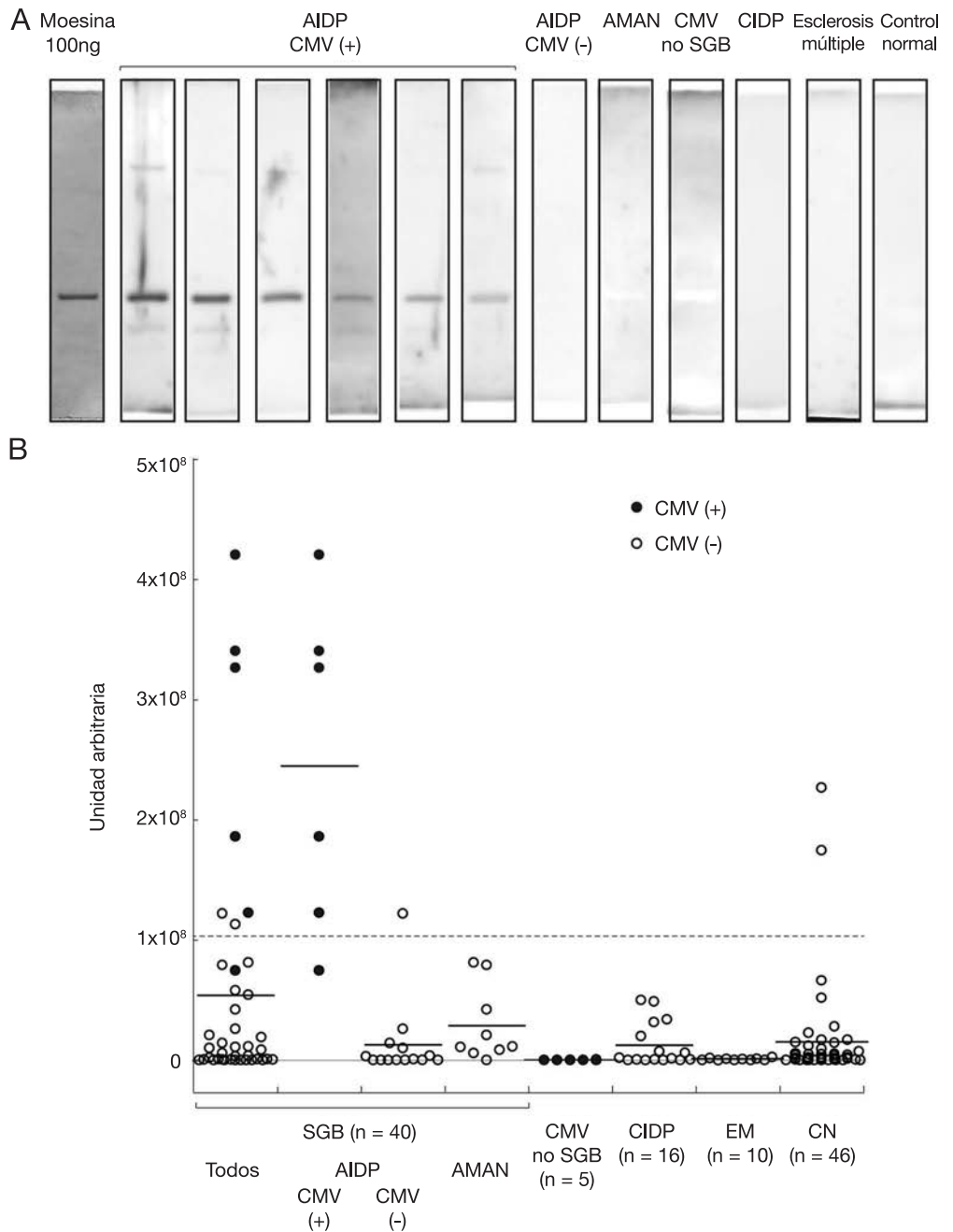
RESULTADOS En AIDP, el antecedente infeccioso más común es el CMV y, por lo tanto, utilizamos suero obtenido de un paciente con AIDP asociada a CMV para la detección con inmunoblot por E-2D. Se observaron 8 puntos inmunorreactivos en el Western blot con E-2D con el suero de un paciente con AIDP asociada a CMV, y se identificaron 6 proteínas: factor 3A de traslación inicia-

Figura 1 Identificación de sectores de la proteína inmunorreactivos al suero de un paciente con síndrome de Guillain-Barré asociado a citomegalovirus con el uso de electroforesis bidimensional y Western blot



(A) Corrida de proteínas separadas extraídas de células YST-1 en membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) teñida con Coomassie Brilliant Blue. (B, C) La membrana PVDF reaccionó con suero diluido 1:10,000 de un paciente con polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda asociada a citomegalovirus: B; y control normal: C. Los círculos indican la mancha vista en A y B, pero no en C, que fue identificada subsecuentemente mediante espectrometría de masas y análisis de la base de datos como moesina.

Figura 2 Nivel de anticuerpos anti-moesina en muestras de suero de pacientes con Síndrome de Guillain Barré, controles con enfermedades inflamatorias y controles sanos



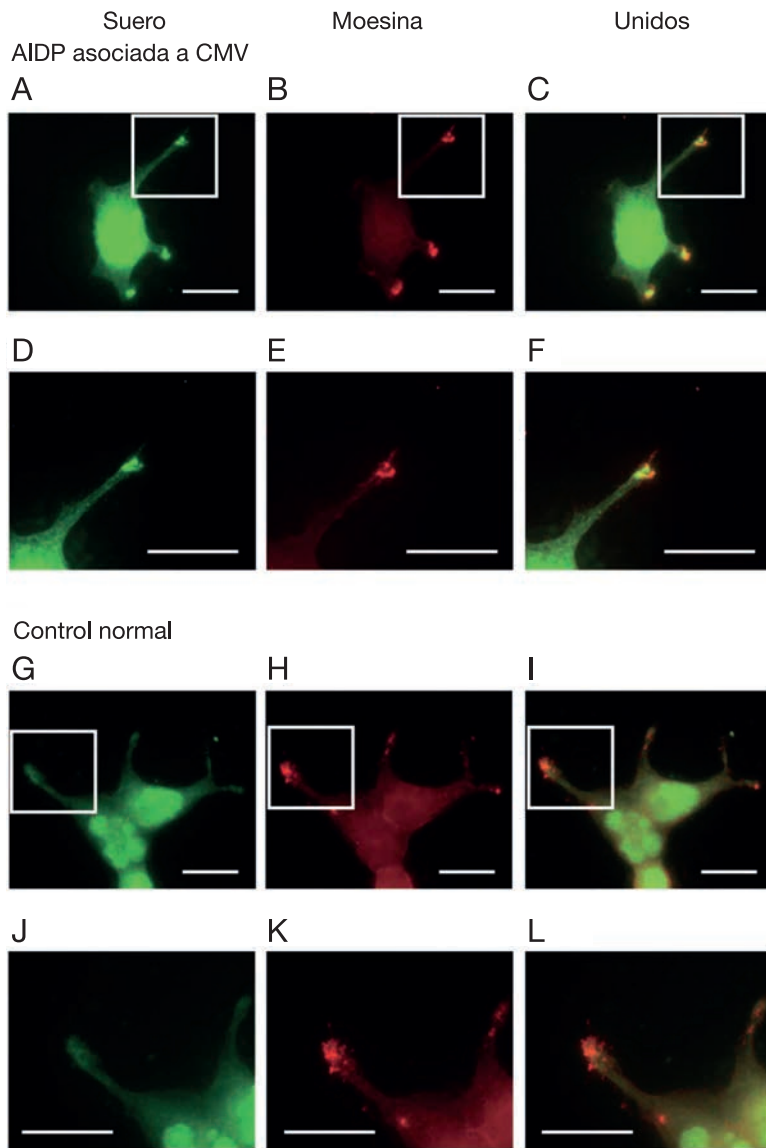
(A) Análisis de Western blot de las muestras de suero de pacientes con síndrome de Guillain-Barré (SGB) (polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda [AIDP] asociada a citomegalovirus [CMV], AIDP no asociada a CMV, y neuropatía motora axonal aguda [AMAN]), pacientes con infección por CMV sin SGB, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), esclerosis múltiple (EM) y controles normales (CN), marcadas con un anticuerpo anti-moesina. "Todos los SGB" incluyeron los pacientes sin clasificar mediante los criterios electrodiagnósticos. (B) La densitometría del Western blot reveló que el 83% (5 de 6) de las muestras de suero individuales de pacientes con AIDP asociada a CMV tenía niveles de auto-anticuerpo anti-moesina por encima del valor de corte (línea punteada). Las líneas sólidas indican los valores medios para cada grupo.

ción eucariótica (eIF3A), factor de empalme 3 subunidad 1, septina-11, α -enolasa, ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas A2 y B1, y proteína de anclaje organizadora de membrana (moesina). De las 6 candidatas, sólo la moesina es una proteína de membrana plasmática expresada por las células de Schwann (círculo blanco en la figura 1; número de acceso SwissProt: P26038; puntaje

MOWSE [candidato principal]: 2.136; cobertura de secuencia: 60%).

De los 40 pacientes con SGB estudiados, 7 demostraron una marca intensa de moesina (indicada por una banda de densidad de moesina en Western blot > 2 DE por encima de la media de los controles sanos), incluso 5 de los 6 pacientes con AIDP asociada a CMV (figura 2). Por lo tanto, la mayoría

Figura 3 Localización subcelular de la tinción por inmunofluorescencia de anti-moesina y suero de células YST-1 de schwannoma



(A-F) Patrón de inmunomarcación de células YST-1 incubadas con inmunoglobulina G sérica de pacientes con polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda (AIDP) asociada a citomegalovirus (CMV) o (G-L) de controles sanos. Los paneles D-F y J-L son imágenes agrandadas de áreas definidas por los cuadrados blancos en A-C y G-I, respectivamente. Sólo las muestras de suero de los pacientes con síndrome de Guillain-Barré asociado a CMV y anticuerpos monoclonales contra moesina tiñeron los extremos distales de las células YST-1. Línea: 20 μ m.

de los pacientes con AIDP asociada a CMV (5/6, 83%) tenía anticuerpos séricos anti-moesina. Por otro lado, ninguno de los 9 pacientes con AMAN, uno de los 11 pacientes con SGB sin clasificar, ninguno de los 5 pacientes con infección por CMV sin neuropatía, ninguno de los 16 pacientes con polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, ninguno de los 10 pacientes con EM y sólo 2 de los 46 pacientes control (4%), tenían muestras de suero reactivas a la moesina, lo que sugiere que la moesina es un autoantígeno específico que da lugar a una AIDP asociada a CMV. En 2 pacientes con AIDP asociada a CMV los estudios de seguimiento mostraron que los niveles de auto-anticuerpos

anti-moesina se redujeron significativamente luego de 3 meses y 12 meses, respectivamente (datos no mostrados).

Los análisis de inmunocitoquímica mostraron que los extremos distales de los procesos celulares YST-1 y sus láminas principales se teñían fuertemente con la muestra de suero de un paciente con AIDP asociada a CMV que expresaba auto-anticuerpo anti-moesina (figura 3, A-F), mientras que no se detectó inmunofluorescencia en los controles sanos (figura 3, G-L). Las evaluaciones inmunohistoquímicas que utilizan nervios ciáticos de ratón también demostraron que la IgG de pacientes con AIDP asociada a CMV anti-moesina positivos se une al antígeno en el nodo de Ranvier, que se localiza con la moesina.

DISCUSIÓN Mientras que ya se sabe que en AMAN las moléculas blanco son glucolípidos, los objetivos inmunológicos en la AIDP serían proteínas. Nuestros resultados muestran que la moesina es una posible molécula blanco en la AIDP luego de una infección por CMV. Mientras que los anticuerpos anti-moesina fueron encontrados frecuentemente en pacientes con AIDP asociada a CMV, el número de pacientes era pequeño y sólo se estudiaron pacientes japoneses. Estas fueron las limitaciones en este estudio y se necesita un estudio más grande que incluya pacientes no japoneses.

La moesina es un miembro de la familia de proteínas ERM (ezrina, radixina y moesina). Las células de Schwann expresan proteínas ERM en las microvellosidades y la fosfoactivación local da lugar a un crecimiento dinámico de comportamiento tipo cono y la formación del nodo en los extremos distales en los cultivos por explantes de nervios,⁷ esto sugiere fuertemente que la moesina tiene una función crítica en la mielinización. Del análisis inmunocitoquímico, los anticuerpos séricos IgG del SGB asociado a CMV eran inmunoreactivos con la moesina en los extremos distales de YST-1 (figura 3). El patrón de inmunomarcación también fue similar al reportado previamente en células de Schwann marcadas con muestras de suero de 24% de pacientes con SGB, aunque ni el patógeno ni el antígeno en los extremos distales fueron identificados.⁸

Los anticuerpos anti-moesina también fueron encontrados en algunos pacientes con anemia aplásica adquirida del tipo hemoglobinuria paroxística nocturna.⁹ Sin embargo, no hay una conexión aparente entre la anemia aplásica y el SGB; por lo tanto, es probable que los anticuerpos anti-moesina encontrados en pacientes con estas 2 enfermedades reconozcan epítomos distintos de la proteína moesina.

Para establecer el mimetismo molecular entre la moesina y las proteínas de CMV, se analizaron secuencias de aminoácidos con el programa BLAST, que compara 2 secuencias proteicas utilizando un algoritmo de alineación local. Uno de los resultados sugirió que 6 aminoácidos consecutivos (HRGMLR) coincidían entre la moesina y la proteína del CMV "Fosfoproteína 85". Esta candidata

fue una de las posibles moléculas diana y se requirió mayor análisis.

De otros auto-anticuerpos pueden surgir casos de AIDP asociados a otros patógenos. Por ejemplo, las proteínas nodales/paranodales, tales como la neurofascina, la contactina y la gliomedina, son candidatas adicionales para ser moléculas diana en pacientes con SGB. La gliomedina y la moesina se colocalizan en el nodo de Ranvier¹⁰ y, por lo tanto, los auto-anticuerpos contra ambas pueden desencadenar desmielinización en el mismo lugar o cerca, y presentar una AIDP. Necesitamos analizar la función molecular del auto-anticuerpo anti-moesina en la patogénesis de la AIDP en futuros estudios.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Dres. Sawai, Mori y Kuwabara diseñaron el estudio y realizaron un borrador del manuscrito. Dres. Misawa, Beppu y Sekiguchi contribuyeron con los datos clínicos y las muestras de suero. Dres. Sawai, Satoh, Sogawa y Mr. Ishige realizaron análisis proteómicos. Ms. Ishibashi, Dres. Noda y Sato midieron el auto-anticuerpo anti-moesina en las muestras de suero. Dres. Kazami y Shibuya realizaron la inmunohistoquímica. Dres. Matsushita, Kodera y Nomura supervisaron los experimentos.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen al Profesor Youji Nagashima por aportar la línea celular YST-1 derivada del schwannoma.

FONDOS PARA EL ESTUDIO

Apoyado por Grants-in-Aid para Scientific Research del Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (S.S., 23790976) y el Research Committee for Neuroimmunological Diseases of the Research on Measures for Intractable Diseases del Ministry of Health, Welfare and Labour of Japan (S.K.).

DECLARACIÓN DE INTERESES

S. Sawai, M. Satoh, M. Mori, S. Misawa, K. Sogawa, T. Kazami, M. Ishibashi, M. Beppu, K. Shibuya, T. Ishige, Y. Sekiguchi, K. Noda, K. Sato, K. Matsushita, Y. Kodera y F. Nomura no tienen nada que declarar relevante al manuscrito. S. Kuwabara sirve como miembro en el comité editorial del *Journal of the Neurological Sciences* y es un editor asociado del *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. Ir a Neurology.org para declaraciones completas.

Recibido el 10 de septiembre de 2013. Aceptado en su formato final el 7 de febrero de 2014.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ho TW, Mishu B, Li CY, et al. Guillain-Barré syndrome in northern China: relationship to *Campylobacter jejuni* infection and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 1995;118:597–605.
2. Yuki N, Kuwabara S. Axonal Guillain-Barré syndrome: carbohydrate mimicry and pathophysiology. *J Peripher Nerv Syst* 2007;12:238–249.
3. Hafer-Macko CE, Sheikh KA, Li CY, et al. Immune attack on the Schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 1996;39:625–635.
4. Asbury AK, Cornblath DR. Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1990;27(suppl):S21–S24.
5. Kawashima Y, Fukuno T, Satoh M, et al. A simple and highly reproducible method for discovering potential disease markers in low abundance serum proteins. *J Electrophor* 2009;53:13–18.
6. Satoh M, Haruta-Satoh E, Yamada M, Kado S, Nomura F. Overexpression of hydroxymethylglutaryl CoA synthase 2 and 2,4-dienoyl-CoA reductase in rat pancreas following chronic alcohol consumption. *Pancreas* 2013;42:475–482.
7. Gatto CL, Walker BJ, Lambert S. Local ERM activation and dynamic growth cones at Schwann cell tips implicated in efficient formation of nodes of Ranvier. *J Cell Biol* 2003;162:489–498.
8. Kwa MS, van Schaik IN, De Jonge RR, et al. Autoimmunoreactivity to Schwann cells in patients with inflammatory neuropathies. *Brain* 2003;126:361–375.
9. Takamatsu H, Feng X, Chuhjo T, et al. Specific antibodies to moesin, a membrane-cytoskeleton linker protein, are frequently detected in patients with acquired aplastic anemia. *Blood* 2007;109:2514–2520.
10. Eshed Y, Feinberg K, Poliak S, et al. Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier. *Neuron* 2005;47:215–229.