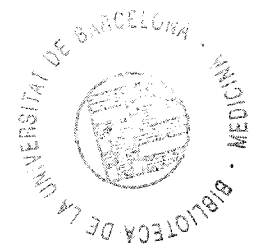


**ESPECTRO DE ENFERMEDADES NEUROLOGICAS
ASOCIADAS A ANTICUERPOS ANTI-GLUTAMATO
DECARBOXILASA (GAD)**

Albert Saiz Hinarejos





Casanova, 143
08036 Barcelona
Espanya
Tel. (93) 323 76 68
Fax (93) 451 95 54

FRANCESC GRAUS RIBAS, Profesor Asociado de Medicina de la
Universidad de Barcelona,

y

EDUARDO TOLOSA SARRO, Profesor Titular de Medicina de la
Universidad de Barcelona y Jefe del Servicio de Neurología del Hospital Clínic
i Provincial de Barcelona,

CERTIFICAMOS que la memoria titulada "**ESPECTRO DE ENFERMEDADES
NEUROLOGICAS ASOCIADAS A ANTICUERPOS ANTI-GLUTAMATO
DECARBOXILASA (GAD)**", presentada por Albert Saiz Hinarejos, ha estado
realizada bajo nuestra dirección y consideramos que reúne las condiciones
necesarias para ser defendida delante del Tribunal correspondiente para optar
al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Dr. Francesc Graus Ribas

Dr. Eduardo Tolosa Sarró

BARCELONA, abril de mil novecientos noventa y ocho

**ESPECTRO DE ENFERMEDADES NEUROLOGICAS ASOCIADAS A ANTICUERPOS ANTI-
GLUTAMATO DECARBOXILASA (GAD)**

**A mis padres, a Laia
y en especial a Gloria**

Agradecimientos

Los trabajos que forman parte de esta memoria no habrían sido posibles sin la valiosa colaboración de numerosas personas que tanto de una manera personal como profesional han influido en su realización. Entre ellas quiero mostrar mi agradecimiento especial a:

Dr. Francesc Graus, director de esta tesis, maestro y amigo, por su capacidad científica, su constante ayuda, estímulo y dedicación que ha hecho posible la realización de este trabajo, pero sobretodo por su calidad humana que ha resultado decisiva en mi formación profesional y personal.

Dr. Eduardo Tolosa, co-director de esta tesis y Jefe de Servicio de Neurología del Hospital Clínic, por sus comentarios científicos siempre tan constructivos, y por las facilidades otorgadas para llevar a cabo este ilusionante proyecto.

A Merce Bonastre, Anna Jimenez, Eva Sánchez, y Rosa Pagés, por su inestimable ayuda técnica y por encima de todo por su amistad.

Dra. Concepció Marin, y Dra. Roser Casamitjana, por su colaboración científica, orientación y apoyo.

Finalmente, a todos los compañeros del Servicio de Neurología del Hospital Clínic que con su estímulo me han alentado a llevar a cabo este trabajo.

PUBLICACIONES

Esta memoria se basa en los siguientes artículos:

1. A. Saiz, J. Arpa, A. Sagasta, R. Casamitjana, JJ. Zarranz, E. Tolosa, F. Graus. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in three patients with cerebellar ataxia, late-onset insulin-dependent diabetes mellitus, and polyendocrine autoimmunity. *Neurology* 1997;49:1026-1030.
2. A. Saiz, M. Arias, A. Fernandez-Barreiro, A. Mínguez, R. Casamitjana, E. Tolosa, F. Graus. Utilidad diagnóstica de los anticuerpos anti-glutamato decarboxilasa (GAD) en el síndrome de la persona-rígida (Stiff-man syndrome). *Medicina Clínica* 1998;110:378-381.
3. Albert Saiz, Francesc Graus, Francesc Valldeoriola, Josep Valls-Solé, Eduardo Tolosa. Stiff-leg syndrome: a focal form of stiff-man syndrome. *Annals of Neurology* 1998;43:400-403.
4. Albert Saiz. Síndrome de la persona-rígida (stiff-man syndrome): un espectro clínico y patológico más amplio de lo esperado. (Manuscrito en preparación).
5. A. Saiz, J. Dalmau, M. Husta Butler, Q. Chen, JY. Delattre, P. De Camilli, F. Graus. Anti-amphiphysin I antibodies in patients with paraneoplastic neurologic disorders associated with small-cell lung carcinoma. (Remitido para su publicación en *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*).

**ESPECTRO DE ENFERMEDADES NEUROLOGICAS ASOCIADAS A ANTICUERPOS ANTI-
GLUTAMATO DECARBOXILASA (GAD)**

INDICE GENERAL

I	PARTE TEORICA.....	8
	1. Introducción.....	9
	2. Propiedades bioquímicas y función de la glutamato decarboxilasa (GAD).....	10
	3. Autoinmunidad GAD en la diabetes mellitus insulino-dependiente.....	12
	4. Síndrome de la persona-rígida (Stiff-man syndrome).....	14
	4.1. Características clínicas.....	15
	4.2. Carcterísticas neurofisiológicas.....	19
	4.3 Anatomía patológica.....	21
	4.4 Tratamiento.....	22
	4.5 Etiopatogenia.....	24
	4.5.1. Hipótesis autoinmune del síndrome de la persona-rígida.....	25
	4.5.2. Características comunes entre el síndrome de la persona-rígida y la diabetes mellitus insulino-dependiente.....	27
	4.5.3. Significado de la autoinmunidad GAD en el síndrome de la persona-rígida.....	30
	4.5.4. Los anticuerpos anti-amfifisina y el síndrome de la persona-rígida paraneoplásico.....	32
II.	HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	35
	1. Hipótesis de trabajo.....	36
	2. Objetivos.....	37
III.	TRABAJOS.....	39
	TRABAJO 1: Ataxia cerebelosa y anticuerpos anti-GAD, una segunda enfermedad neurológica asociada a la autoinmunidad GAD.....	40
	TRABAJO 2: Valor diagnóstico de los anticuerpos anti-GAD en el síndrome de la persona-rígida.	41
	TRABAJO 3: El síndrome de la pierna-rígida, una forma focal del síndrome de la persona-rígida.	42

**ESPECTRO DE ENFERMEDADES NEUROLOGICAS ASOCIADAS A ANTICUERPOS ANTI-
GLUTAMATO DECARBOXILASA (GAD)**

TRABAJO 4: El síndrome de la persona-rígida, un espectro clínico y patológico más amplio de lo esperado.....	43
TRABAJO 5: Anticuerpos anti-anfifisina en pacientes con trastornos neurológicos paraneoplásicos diferentes del síndrome de la persona-rígida.....	44
IV. DISCUSION GENERAL.....	45
V. CONCLUSIONES.....	52
VI. BIBLIOGRAFIA.....	54

**ESPECTRO DE ENFERMEDADES NEUROLOGICAS ASOCIADAS A ANTICUERPOS ANTI-
GLUTAMATO DECARBOXILASA (GAD)**

I. PARTE TEORICA

1. INTRODUCCION

El GAD (glutamato decarboxilasa) es la enzima que cataliza la síntesis del neurotransmisor inhibitorio ácido gamma-aminobutírico (GABA) a partir del glutamato. El GAD se expresa selectivamente en los botones sinápticos de las neuronas GABA-érgicas. Fuera del sistema nervioso se encuentra en altas concentraciones en las células beta de los islotes pancreáticos, sin que existan diferencias entre el GAD de las células pancreáticas o del sistema nervioso.¹

La respuesta inmune contra el GAD se ha relacionado con la patogenia de dos enfermedades humanas, el síndrome de la persona-rígida (Stiff-Person syndrome)^{2,3} y la diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID).^{4,5}

Alrededor del 80% de los pacientes con DMID recientemente diagnosticada presentan autoanticuerpos anti-GAD (Ac-GAD) y éstos pueden ser detectados años antes del inicio de la clínica. Constituyendo los Ac-GAD un marcador serológico precoz y altamente predictivo de futuro desarrollo de DMID en sujetos no diabéticos.⁶

El síndrome de la persona-rígida (SPR) es un raro trastorno del sistema nervioso central caracterizado por rigidez muscular progresiva asociado a espasmos dolorosos. Los Ac-GAD son detectados aproximadamente en el 60% de los pacientes con SPR. La autoinmunidad anti-GAD en estos pacientes está estrechamente asociada a la presencia de otras manifestaciones endocrinas, principalmente DMID, y a otros anticuerpos organo-específicos, lo que sugiere una patogénesis mediada inmunológicamente. En los

pacientes con SPR, a diferencia de los diabéticos, el título de Ac-GAD es muy superior y reconocen epítomos específicos y diferentes.⁵

El papel patogénico directo de los Ac-GAD en el SPR es controvertido por ser el GAD un antígeno citoplasmático no expuesto al medio extracelular. La respuesta autoinmune anti-GAD puede ser un epifenómeno relacionado con la destrucción celular y la exposición de este antígeno, pero su ausencia, en general, en otras enfermedades degenerativas lo hace improbable.⁵

No obstante, se ha descrito la presencia de Ac anti-GAD en pacientes aislados con enfermedades "degenerativas" cerebelosas,^{3,7,8} mioclonias palatinas,⁹ y "parkinsonismo".⁸ Excepto en dos de estos pacientes,^{7,9} los anticuerpos fueron detectados en grupos controles utilizados para evaluar la frecuencia de estos anticuerpos en el SPR, y su perfil clínico e inmunológico es desconocido.

El objetivo principal de este proyecto es evaluar la frecuencia de Ac-GAD en enfermedades neurológicas en las que existe una disfunción GABA-érgica conocida. Su evaluación permitirá dar respuesta a si la autoinmunidad anti-GAD es un epifenómeno, y si existe algún otro subgrupo de pacientes con características inmunológicas similar al del SPR, pero con presentación clínica diferente. La caracterización del perfil clínico e inmunológico de este subgrupo de pacientes es el segundo objetivo propuesto en este estudio.

2. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y FUNCIÓN DEL GAD

El GAD, enzima que cataliza la síntesis del GABA a partir del ácido glutámico, se expresa selectivamente en los botones sinápticos de las neuronas GABA-érgicas. Fuera del sistema nervioso su distribución es mucho más restrictiva localizándose en las células epiteliales de las trompas de falopio, en los espermatozoides, y en altas concentraciones en las células beta de los islotes pancreáticos. La función del GAD en las neuronas es obvio, pero su papel en otros tejidos es más desconocido. La presencia de GAD y GABA en los islotes beta, y de receptores GABA_A en las células alfa, sugiere que el GABA está involucrado en las señales paracrinas entre estas células endocrinas.

Se conocen dos isoformas del GAD de acuerdo con su masa molecular, el GAD65 y el GAD67. Ambas formas contienen un cofactor necesario para la actividad enzimática, el piridoxal-5-fosfato. La secuencia molecular del GAD65 y del GAD67 ha sido determinada en diferentes especies revelando una considerable conservación en su evolución. En el hombre, el GAD65 y el GAD67 son producto de dos genes diferentes. El GAD67 es una proteína que contiene 594 residuos de aminoácidos y es codificada en el cromosoma 2, mientras que en el GAD65 son 585 los residuos aminoácidos y se codifica en el cromosoma 10. Entre ambos existe una homología en el 65% de la secuencia de aminoácidos, difiriendo sustancialmente en su región amino-terminal. Las dos isoformas son sintetizadas en el citoplasma como moléculas solubles. Mientras que el GAD67 permanece soluble, la mayoría del GAD65 sufre un cambio postranslacional y es anclado en la membrana de las vesículas sinápticas de las neuronas GABA-érgicas o

de las pequeñas microvesículas tipo sinápticas de las células beta.¹ Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que ambas formas están concentradas en los botones sinápticos, si bien difieren en su distribución intracelular. Así el GAD67 se distribuye por toda la neurona, mientras que el GAD65 primariamente se concentra en los axones terminales.¹⁰ Técnicas cuantitativas han mostrado a su vez que es el GAD65 la forma predominante en las células beta de los islotes pancreáticos humanos.¹¹

3. AUTOINMUNIDAD GAD EN LA DIABETES MELLITUS INSULINO-DEPENDIENTE

La DMID es el resultado de una destrucción autoinmune de las células beta de los islotes pancreáticos productores de insulina. Este es un proceso autoinmune crónico, que tiene lugar durante años en una fase presintomática, apareciendo las manifestaciones clínicas tras la destrucción de la mayoría de las células beta. Una serie de características identifican la patogénesis autoinmune de la DMID. Estas incluyen el marcador patológico de la DMID, un infiltrado inflamatorio de los islotes pancreáticos ocasionando la lesión conocida como "insulitis". Este infiltrado inflamatorio consiste de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, más un número variable de linfocitos B, macrófagos y células killer. La enfermedad conlleva una susceptibilidad genética asociada al antígeno leucocitario humano (HLA) del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Una mayor frecuencia de asociación a otras enfermedades autoinmunes endocrinas como tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, Addison, anemia perniciosa y vitiligo.¹² Alrededor del 80% de los pacientes con DMID recientemente diagnosticada presentan

Ac-GAD, y éstos son detectados años antes del inicio de la clínica en un 70-80% de los sujetos con alto riesgo de desarrollarla. Diferentes estudios han puesto de manifiesto que los Ac anti-GAD constituyen un marcador serológico precoz y de alto valor predictivo de futuro desarrollo de DMID en sujetos no diabéticos.⁶ Estudios poblacionales han confirmado la alta proporción de positividad de los anticuerpos en la etapa preclínica, con una sensibilidad como análisis predictivo de desarrollo de DMID del 82% y una especificidad del 100%.¹³ Se sabe que la respuesta celular-T contra el GAD, en ratones diabéticos no obesos (NOD), es el primer evento en la inducción de la autoinmunidad contra las células beta que llevará a su destrucción y a la aparición de la diabetes.¹⁴ En el ser humano, los estudios de proliferación de células T en sangre periférica en respuesta al GAD también ponen en evidencia el papel patogénico de este antígeno en el desarrollo de la DMID. Así la proporción de sujetos con respuesta proliferativa positiva es significativamente mayor en parientes de primer grado con alto riesgo de desarrollarla, aquellos que presentan anticuerpos anti-islole (ICA +), que en sujetos de bajo riesgo (controles y parientes ICA -).¹⁵ Por otra parte, se ha encontrado una relación inversa entre la respuesta inmune humoral y la respuesta celular anti-GAD en sujetos de alto riesgo. Así, altas concentraciones de Ac-GAD se asocian a una baja respuesta proliferativa y concentraciones bajas a una alta respuesta, sugiriendo que una vez sensibilizada la célula frente al GAD, la desviación de la respuesta inmune hacia la autorreactividad celular T es la que conducirá al desarrollo de la DMID. Idea que corrobora que la destrucción de la célula beta está mediada por células T, y en

consonancia con que una alta concentración de Ac-GAD se asocia a una lenta progresión hacia el desarrollo de la enfermedad clínica.¹⁶

4. SÍNDROME DE LA PERSONA RÍGIDA (STIFF-MAN SYNDROME)

El término síndrome de hombre rígido (stiff-man syndrome) fue introducido por primera vez por Moersch y Woltman en 1956¹⁷ al describir las características clínicas de 14 pacientes examinados en la Mayo Clinic durante el periodo comprendido entre 1924 y 1956. Desde la descripción original, numerosos casos han sido publicados en la bibliografía recibiendo también la denominación de síndrome de la persona rígida (SPR).¹⁸ El SPR es un trastorno poco frecuente del sistema nervioso central caracterizado por rigidez muscular progresiva, de predominio axial, con espasmos dolorosos espontáneos o precipitados por estímulos sensitivos, y la presencia de una actividad continua de unidades motoras en el electromiograma.^{17,19} La patogenia precisa de este síndrome es desconocida, si bien en la actualidad se piensa que tiene una base autoinmune.⁵ Fisiopatológicamente, se cree que es el resultado del desequilibrio entre las vías excitatorias catecolaminérgicas y las inhibitorias GABA-érgicas que controlan la actividad de las neuronas motoras alfa de la médula espinal.²⁰ El tratamiento mediante agonistas de la neurotransmisión GABA-érgica es efectivo en la mejoría de la sintomatología, sin que afecte, no obstante, al curso de la enfermedad.²¹

4.1 Características clínicas

Los síntomas suelen tener su inicio entre la cuarta y quinta décadas de la vida, si bien se han descrito casos anecdóticos de pacientes jóvenes.²² Varones y mujeres se ven

afectados por igual, aunque la frecuencia en función del sexo varía entre las diferentes series.^{19,21}

En 1967, Gordon et al¹⁹ propusieron unos criterios diagnósticos, que posteriormente fueron modificados por Lorish et al²¹ en 1989 y son los criterios actualmente aceptados (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios diagnósticos del síndrome de persona-rígida

Clinicos

1. Inicio gradual de rigidez y envaramiento de la musculatura axial
2. Lenta progresión de los síntomas para afectar a la musculatura proximal
3. Deformidad persistente de la columna (> Postura hiperlordótica de la columna lumbar)
4. Espasmos musculares episódicos desencadenados por movimientos bruscos, sacudidas, ruidos, y trastornos emocionales
5. Funciones cognitivas normales
6. Exploración motora y sensitiva normal

Neurofisiológicos

7. Actividad continua de unidades motoras en el EMG
8. Actividad EMG abolida por la administración intravenosa de diazepam, o respuesta positiva al tratamiento oral con diazepam

La enfermedad suele tener un inicio insidioso con aparición de la rigidez en la musculatura axial. El curso, lentamente progresivo, se caracteriza por la extensión de la rigidez desde el tronco a la musculatura proximal de las extremidades. La contractura persistente de la musculatura axial, especialmente de los músculos paraespinales,

toracolumbares y abdominales, ocasiona su rigidez y determina una característica hiperlordosis lumbar,²³ sin cuya presencia algunos autores cuestionan el diagnóstico.²⁴ Hiperlordosis que de forma característica persiste durante el reposo, lo que permite diferenciarla de la distonía de torsión axial. Precozmente aparecen en el curso de la enfermedad espasmos musculares, en general dolorosos, que se superponen a la rigidez. Los espasmos, que pueden llegar a provocar fracturas de huesos largos, pueden ser espontáneos o inducidos por movimientos bruscos, estímulos externos como ruidos inesperados o trastornos emocionales. El resto de la exploración neurológica, incluidos las funciones cognitivas, pares craneales, fuerza muscular, reflejos osteotendinosos, sensibilidad y coordinación, es normal.²³

Con frecuencia el primer diagnóstico de estos pacientes es el de trastorno psicógeno, debido fundamentalmente a la rareza y las fluctuaciones de las alteraciones del movimiento, la discrepancia entre los prominentes síntomas y la paucidad de signos neurológicos, la exacerbación de los síntomas con las emociones, y los paroxismos de pánico asociados típicamente a cruzar una calle o un pasillo sin ayuda. Situaciones éstas que pueden desencadenar los espasmos, provocar caídas, y motivar que sean diagnosticados de neurosis agarofóbica. Destaca así mismo que en muchos casos existen previamente eventos personales que se han invocado como posibles desencadenantes o coadyuvantes en su etiología como, fallecimiento de un pariente, despido laboral, infidelidad conyugal, separación, etc.²⁵

Por otro lado, se han descrito casos de SPR atípicos^{18,26} en cuanto a su presentación o evolución que dificulta el diagnóstico, ya difícil de por sí, y que resalta la importancia de definir exactamente el espectro clínico de esta enfermedad cuyo diagnóstico actual se establece por los criterios clínicos y electrofisiológicos antes citados. El término "*jerking stiff-man syndrome*" fue acuñado para describir la presencia de prominentes mioclonías espontáneas o desencadenadas por estímulos diversos, que afectan predominantemente a la musculatura axial y de las extremidades inferiores, asociado a la rigidez típica del SPR.²³

Otras manifestaciones descritas en algunos pacientes con SPR son la presencia de una disfunción autonómica aguda, con hipertermia, diaforesis, taquipnea, taquicardia, midriasis, e hipertensión arterial, que es causa de muerte súbita. Para algunos autores, estas crisis vegetativas están desencadenadas por los severos espasmos, mientras que para otros son secundarias a una disfunción hipotalámica asociada.²⁷⁻²⁹

En el diagnóstico diferencial (Tabla 2) una de las entidades que más suscita controversia es la *Encefalomiелitis progresiva con rigidez*, también llamada interneuronitis espinal, que suele presentarse con características clínicas similares al SPR.^{30,31} Probablemente la "neuronitis espinal mioclónica subaguda", descrita por Campbell y Garland,³² sea una forma relacionada con la encefalomiелitis progresiva, difiriendo en su curso más rápido. Las manifestaciones clínicas que nos permiten distinguirla del SPR son, el inicio subagudo con curso progresivo que en menos de 3 años lleva a la muerte del paciente, la afectación de pares craneales, signos medulares segmentarios, la

**ESPECTRO DE ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS ASOCIADAS A ANTICUERPOS ANTI-
GLUTAMATO DECARBOXILASA (GAD)**

afectación de vías largas, y la presencia de pleocitosis con hiperproteinorraquia en el líquido cefalorraquídeo (LCR). EL estudio postmortem pone de manifiesto la existencia de una extensa encefalomiелitis con infiltrado inflamatorio linfocitario perivascular, y pérdida neuronal en troncoencéfalo y médula, más marcada en la sustancia gris de la médula cervical.³¹

Tabla 2. Diferencias entre causas de espasmos, rigidez, y calambres

	Miotonía	Miopatía metabólica	SPR	EMPR	Sdre de Isaacs	Tétanos/calambre	Distonía
-Rigidez	No	No	Sí	Sí	Sí	No	No
-Distribución	Variable	Variable	Axial	Axial Distal	Distal	Variable	Variable
-Rigidez en reposo	No	No	Sí	Sí	Sí	No	No
-Calambres, espasmos							
Músculos afectados	Todos	Todos	Axial	Axial Distal	Distal	Distal	Variable
Sensibles a estímulos	Sí	No	Sí	Sí	Sí	No	No
Dolor	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No
-Contractura	No	Sí	No	No	No	No	No
-Pares craneales	Normal	Normal	Normal	Afecto	Afecto	Afecto	Normal
-Debilidad	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No	No
-ROTs	Normal	Normal	Normal	Puede afecto	Puede afecto	Normal	Normal
-Pérdida sensitiva	No	No	No	Sí	Sí	No	No
-LCR	Normal	Normal	Bandas Oligoc	Bandas Oligoc	Normal	Normal	Normal
-Anticuerpos	No	No	Ac-GAD	No/Ac-GAD	canales de K	No	No
-EMG							
Reposo	Silencio	Silencio	ACUM	ACUM	ACUM/ACF	Normal	Normal
Durante espasmos/calambres	Miotonía	Silencio	Normal	+/- Denerv	Mioquimi +/- Denerva	Normal	Normal

SPR= síndrome de persona-rígida; EMPR= encefalomiелitis progresiva con rigidez; ACUM= actividad continua de unidades motoras; ACF: actividad continua de fibras; LCR= líquido cefalorraquídeo; ROTs= reflejos

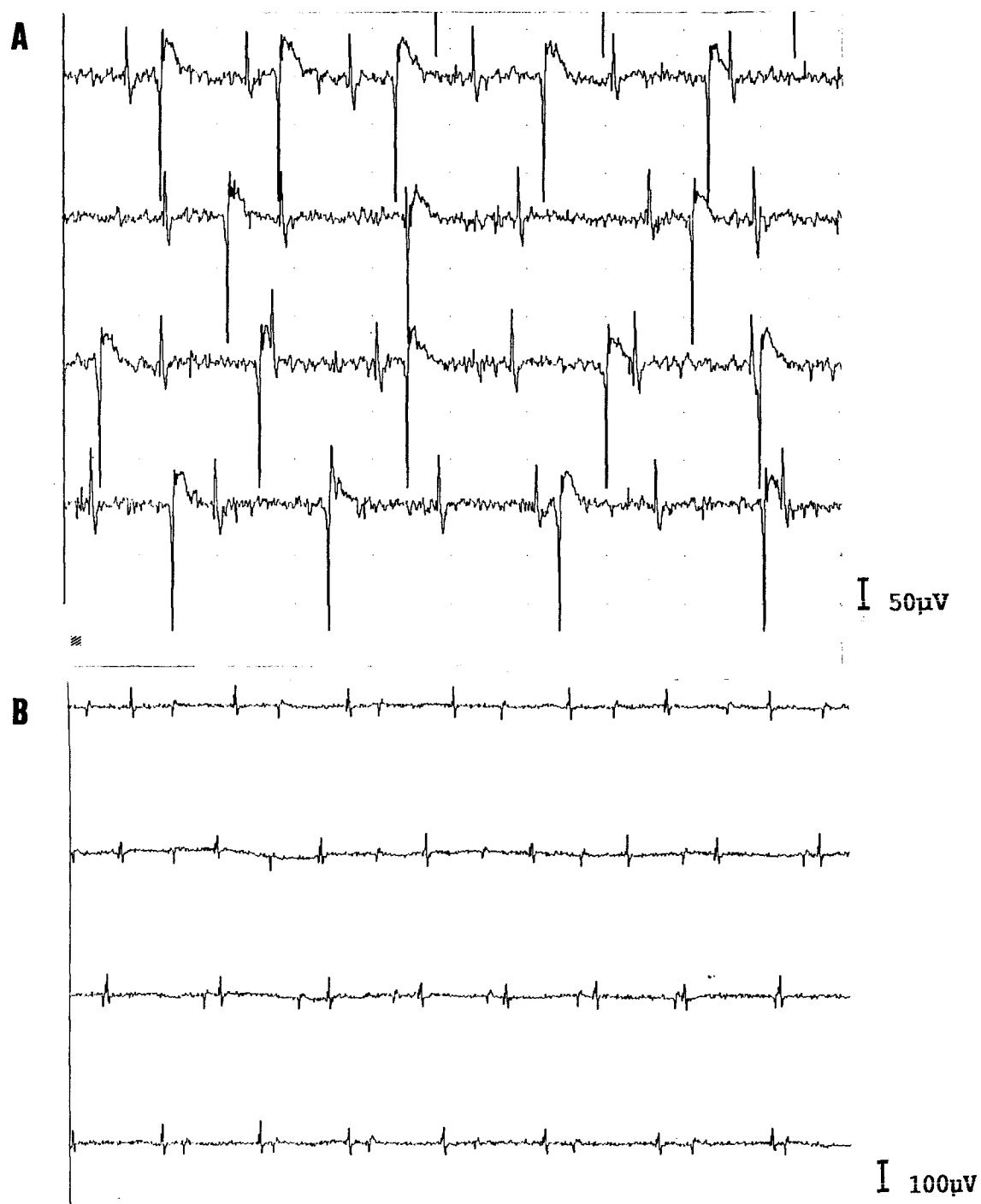
4.2 Características neurofisiológicas

La electromiografía demuestra de forma característica la presencia de una actividad continua de unidades motoras a pesar de conseguir la relajación. Este hallazgo constituye uno de los principales criterios diagnósticos del síndrome (Figura 1). La morfología de la unidad motora es de características normales, no existen signos de denervación, y la velocidad de conducción nerviosa periférica es normal. La actividad es más evidente en músculos paraespinales, principalmente toracolumbares y rectos abdominales, y se ven afectados tanto los grupos musculares agonistas como antagonistas, siendo la causante de la rigidez axial y de la postura hiperlordótica del tronco inferior. Esta actividad continua de unidades motoras desaparece durante el sueño, bloqueo de nervios periféricos o de raíces nerviosas espinales, anestesia espinal o general y mediante diazepam intravenoso, datos que sugieren un origen central y lo diferencian del origen periférico de la neuromiotonía.²³ Otros hallazgos descritos son una alteración de la inhibición presináptica fisiológica de la onda H del sóleo ante estímulos vibratorios, una excitabilidad anormal de los reflejos mediados por vías interneuronales espinales con respuestas exageradas y ausencia de habituación de los reflejos exteroceptivos o cutáneomusculares, y la presencia de mioclonías espasmódicas reflejas que según Meinck et al²⁹ podrían ser características del síndrome y marcador electrofisiológico del mismo.

ESPECTRO DE ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS ASOCIADAS A ANTICUERPOS ANTI-GLUTAMATO DECARBOXILASA (GAD)

El hallazgo característico en el "jerking stiff-man syndrome" es una exageración patológica de la respuesta de sobresalto capaz de desencadenar la sacudida mioclónica generalizada.²³

Figura 1. Actividad continua de unidades motoras de morfología normal. A. musculatura paravertebral dorsal. B. músculo tibial anterior.



4.3. Anatomía patológica

Los estudios necrópsicos del sistema nervioso central en pacientes con SPR no han mostrado alteraciones específicas y consistentes. No obstante, el número de pacientes autopsiados es escaso y en su mayoría con estudios histoquímicos incompletos.²³ Siete pacientes con SPR y estudio autopsico de la médula han sido descritos.^{27,28,33-36} La médula en seis de los pacientes mostraba una ligera palidez de la columna dorsal, pérdida de sustancia de Nissl en alguna célula del asta anterior con adelgazamiento del citoplasma, aumento del número de núcleos gliales,³⁴ ligera disminución de neuronas motoras en los núcleos laterales del asta central sin gliosis reactiva,³³ moderada reducción de células nerviosas de las columnas del asta anterior y lateral con gliosis reactiva,²⁸ pérdida y degeneración de células nerviosas con marcada gliosis en los núcleos motores mediales del asta anterior con degeneración simétrica de las columnas anteriores de forma bilateral,³⁵ gliosis perivascular y ocasional pérdida de células del asta anterior con cromatolisis en el segmto lumbar.²⁷ Uno de los pacientes²⁸ presentaba a su vez un infiltrado linfocitario perivascular disperso de predominio medular. El séptimo paciente con un cuadro característico de SPR, pero con anomalías en la motilidad ocular, asociado a Ac-GAD y enfermedades autoinmunes organo-específicas, también presentaba un ligero infiltrado linfocitario perivascular en la médula espinal, troncoencéfalo y ganglios basales, sin alteraciones histológicas en las neuronas intermediolaterales o del asta anterior.²⁷ Precisamente, son estos infiltrados inflamatorios perivascuales los marcadores patológicos de los cuadros de encefalomiелitis, y que son

los responsables en algún caso³⁶ de la identificación como encefalomiелitis con rigidez a pesar de que el cuadro clínico fuera característico de SPR. Probablemente, tal como propuso Kasperek y Zebrowski,³⁷ en algunos casos de SPR y encefalomiелitis con rigidez subyace el mismo proceso patológico.

4.4. Tratamiento

Howard en 1963³⁸ fue el primero que describió la importante mejoría de los espasmos de estos pacientes con la administración de diazepam a dosis de 60 mg/día. El clonazepam, el baclofeno, el ácido valproico y la tizanidina, son otros de los fármacos descritos con efecto beneficioso. En la práctica, la mayoría de sujetos responden a la combinación de diazepam y baclofeno a dosis elevadas. Estos se administran en pautas crecientes durante semanas para minimizar el principal efecto secundario que es la sedación. Los espasmos, tanto espontáneos con reflejos a los estímulos, son los que mejor responden llegando incluso a desaparecer, mientras que la respuesta frente a la rigidez axial, la postura anómala secundaria y la limitación de la movilidad, es mucho menor.²³

Una favorable respuesta frente al tratamiento inmunosupresor también ha sido utilizado como argumento que apoya la base autoinmune de esta enfermedad. Sin embargo, los resultados en relación con las diferentes pautas utilizadas son dispares: desde una importante mejoría clínica mediante la administración de prednisona,^{18,28,39} a la ausencia de respuesta.²⁸ También se han descrito resultados contradictorios con la plasmaféresis que van desde la remisión de la sintomatología,^{28,40,41} a la falta de respuesta, sin que ésta se modificara con la asociación de azatioprina y prednisona.^{28,42}

Falta de respuesta que se argumenta en la baja eficacia de la plasmaféresis para eliminar unos anticuerpos cuya síntesis primaria tiene lugar intratecalmente.⁴³ Karlson et al⁴⁴ han descrito una buena respuesta clínica a la administración de inmunoglobulinas intravenosas (IG). De los 3 pacientes descritos, dos eran considerados del grupo "autoinmune" y el tercero del grupo "idiopático". En todos ellos la respuesta era apreciable a partir de la segunda dosis y ésta perduraba durante los ciclos. Las IG son un fármaco ampliamente utilizado en enfermedades neurológicas autoinmunes. Se ha sugerido que su acción se debe a que afectan a la producción y acción de los autoanticuerpos en el compartimento intratecal y en el sistema nervioso central por medio de un mecanismo anticuerpo antiidiotípico.⁴⁴

La administración de baclofeno intratecal en infusión continua ha sido descrita como una terapia beneficiosa con resultados que van desde la mejoría parcial,²⁸ hasta la completa y permanente resolución de la sintomatología.⁴⁵ Es bien conocida la utilidad de la administración intratecal de baclofeno en trastornos espásticos y distónicos, mejorando la eficacia y disminuyendo los efectos secundarios de su administración oral. Esto se debe a que el baclofeno es una sustancia lipofílica que atraviesa con facilidad la barrera hematoencefálica. Con su administración a nivel espinal lumbar, se consigue una alta concentración local y una menor concentración a nivel troncoencefálico y cerebral. Fisiológicamente el baclofeno induce una disminución de los reflejos mono y polisinápticos, tal como se demuestra por la reducción del reflejo H y de la onda F. Si bien es difícil extraer conclusiones por el escaso número de pacientes en los que se ha

seguido terapia intratecal, parece que los mejores resultados se pueden obtener en aquellos pacientes a los que se les inicia el tratamiento de forma precoz una vez aparece la sintomatología clínica.⁴⁵

Finalmente se ha descrito una favorable respuesta a la administración de vigabatrina a dosis entre 2-3 g/día.⁴⁶ La vigabatrina es un inhibidor irreversible de la GABA transaminasa, la principal ruta metabólica del GABA, que conduce a un aumento de los niveles de GABA y de la neurotransmisión GABAérgica. De ahí el beneficio teórico de este fármaco, si bien son necesarios más casos para conocer la utilidad real de este tratamiento en pacientes con SPR.

4.3 Etiopatogénesis

La etiología de este síndrome es desconocida y su patogénesis es todavía motivo de discusión. Desde el punto de vista fisiopatológico, se cree que las manifestaciones de esta enfermedad son el resultado del desequilibrio entre vías excitatorias catecolaminérgicas e inhibitorias GABAérgicas que controlan la actividad de las neuronas motoras alfa de la médula espinal, alterando los sistemas inhibitorios espinales o suprasegmentarios que operan por medio del GABA.²⁰

La favorable respuesta de estos pacientes al diazepam fue el primer indicio que apoyaba esta hipótesis.³⁸ Respuesta, que constituye uno de los criterios diagnósticos de este síndrome. El diazepam reduce el nivel de excitación de las neuronas espinales y troncoencefálicas catecolaminérgicas e incrementa la transmisión en las vías inhibitorias GABAérgicas, probablemente por activación de los receptores GABA.²² Fármacos que

potencian la transmisión GABAérgica como clonacepam, baclofeno y ácido valproico también se han mostrado eficaces en el tratamiento del SPR.²³ Otros estudios neurofarmacológicos han puesto en evidencia que fármacos que incrementan la actividad aminérgica dentro del sistema nervioso central (noradrenérgica o serotoninérgica), como la L-dopa o la clomipramina, incrementan la severidad de los espasmos, mientras que aquellos que la reducen como la clonidina y la tizanidina disminuyen los espasmos.²⁰

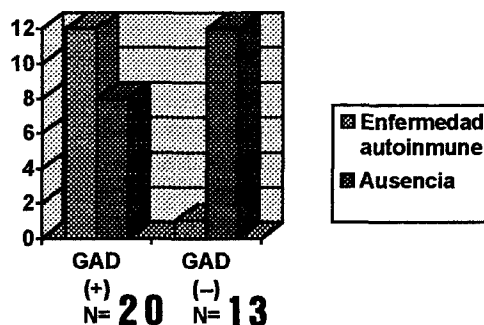
Por otra parte, hasta un 10% de los pacientes con SPR presentan epilepsia,^{3,33} situación en la que también se invoca una alteración en la inhibición sináptica GABAérgica, y cuyo tratamiento se basa fundamentalmente en fármacos que potencian la neurotransmisión GABAérgica.⁴⁷

4.3.1 Hipótesis autoinmune del síndrome de la persona-rígida

Una hipótesis autoinmune de la etiopatogenia de esta entidad ya fue propuesta en 1966 por Young,⁴⁸ y sugerida posteriormente por otros autores,^{2,49} al observar la frecuente coexistencia en estos pacientes de enfermedades autoinmunes, y principalmente DMID. Pero no fue hasta 1988 cuando Solimena et al² aportaron el primer argumento sólido de que la autoinmunidad sobre el sistema nervioso central pudiera estar implicada en la patogenia del SPR. En ese artículo describían a una paciente de 49 años con una historia de SPR de 10 años de evolución, DMID de inicio en la edad adulta y epilepsia, que presentaba, en su suero y en el LCR, autoanticuerpos contra las neuronas GABA-érgicas. Estos anticuerpos presentaban un patrón de distribución mediante

técnicas de inmunohistoquímica idéntico a la distribución celular y subcelular del GAD tanto en cerebro humano como de rata, y en islotes pancreáticos de rata. Por inmunoprecipitación e inmunoblot se confirmó que el autoantígeno reconocido por estos anticuerpos era el GAD. La paciente presentaba, así mismo, anticuerpos tiroideos, anemia perniciosa con anticuerpos anti-célula parietal, y un patrón oligoclonal de IgG en el LCR. Estos mismos autores estudiaron a 32 nuevos pacientes que cumplían criterios clínicos de SPR.³ Se detectaron Ac-GAD en 19 casos (60%). Todos los pacientes eran ICA positivos, y la mayoría presentaban anticuerpos anti-célula parietal. La mitad tenían anticuerpos antimicrosomales tiroideos y un tercio anticuerpos anti-tiroglobulina. Precisamente en este subgrupo de pacientes con Ac-GAD coexistía una o más enfermedades autoinmunes organo-específicas, siendo la DMID, en un 30%, la enfermedad más frecuentemente asociada, mientras que otro 40% presentan al menos otra enfermedad autoinmune, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, anemia perniciosa, vitíligo, insuficiencia adrenal, etc. En cambio de los pacientes con Ac-GAD negativos por inmunohistoquímica (40%), sólo un 6% de ellos presentaban esta asociación clínica o serológica de autoinmunidad organo-específica (Figura 2).

Figura 2. Coexistencia de enfermedades autoinmunes organo-específicas en pacientes con SPR en función de la presencia de Ac-GAD.⁵



La presencia de Ac-GAD, la asociación de enfermedades autoinmunes organo-específicas, el que muchos de estos pacientes presentaran unos niveles altos de IgG y/o bandas oligoclonales en el LCR, apoyaba una base autoinmune de la etiopatogenia de este síndrome.⁵

4.5.2. Características comunes entre el síndrome de la persona-rígida y la diabetes mellitus insulino-dependiente

La frecuente asociación entre el SPR y la DMID permitió establecer que los anticuerpos dirigidos contra un antígeno del islote beta pancreático de 64 kD, conocidos por estar presentes en el 80% de los DMID en el momento de su debut y que son detectados años antes del inicio de la clínica eran Ac-GAD. Así los autoanticuerpos de los pacientes con DMID y de los pacientes con SPR eran capaces de inmunoprecipitar el GAD65 a partir de extractos de páncreas y de cerebro en condiciones no denaturalizantes.⁴ No obstante existían diferencias entre ambas enfermedades. En el SPR el título de Ac anti-GAD era muy superior al de los DMID (entre 10 y 200 veces).^{4,50-}

**ESPECTRO DE ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS ASOCIADAS A ANTICUERPOS ANTI-
GLUTAMATO DECARBOXILASA (GAD)**

⁵² Además, sólo de forma ocasional el suero de los pacientes con DMID era positivo mediante inmunohistoquímica, y era capaz de reconocer al GAD en el inmunoblot. La existencia de una denaturalización de la proteína mediante esta última técnica sugería la existencia de un reconocimiento de epítomos diferentes entre ambas entidades.^{4,5} Hoy en día se sabe que los autoanticuerpos de los pacientes con SPR reconocen a una combinación de epítomos lineales y conformacionales del GAD, mientras que los Ac-GAD de los sujetos con IDDM están predominantemente dirigidos contra epítomos conformacionales.⁵⁰⁻⁵² Si bien la naturaleza autoinmune de la DMID está bien establecida, muchos de los criterios necesarios para concluir con certeza que el SPR tiene un origen autoinmune permanecen sin establecerse (Tabla 3).

Tabla 3. Características diferenciales entre el SPR y la DMID

Enfermedad	<u>SPR</u>	<u>DMID</u>
Frecuencia	Rara (1 caso por 10 ⁶)	Frecuente (1 caso por 300)
Edad inicio	Adulto	Joven/adolescencia
HLA	?	HLA DR3,4 ; DQ0302
Asociación a otras enf. autoinmunes	Sí	Sí
Clínica	Rigidez, espasmos	Hiperglicemia, poliuria
Tratamiento	Benzodiazepinas	Insulina
Ac-GAD	Título alto, epítomos conformacionales y lineales	Título bajo, epítomos conformacionales
Patogénesis	Autoinmune?	Autoinmune

En el SPR, además, se desconoce si los síntomas se deben a la destrucción, o si se derivan de un trastorno funcional de las neuronas GABA-érgicas. No obstante, la identificación de una respuesta humoral inmune contra el GAD en la mayoría de sujetos con SPR y DMID hace poco probable que este autoantígeno represente un epifenómeno que no esté relacionado con los mecanismos patogénicos subyacentes de ambas entidades. El que no todos los pacientes con SPR y Ac-GAD desarrollen DMID, y que sólo una pequeña proporción de pacientes con DMID desarrollen el síndrome a pesar de tener los anticuerpos durante muchos años, sugiere que debe de existir otros factores que favorezcan el desarrollo hacia una de las dos entidades.⁵ Se ha postulado que en la DMID existe una respuesta anti-GAD de las células Th1, productoras de interleukina-2 e interferón-gamma, que da lugar a una respuesta citotóxica de los linfocitos T contra las células beta pancreáticas capaces de producir su destrucción. Mientras que un título elevado de Ac-GAD, lo que sucede en el SPR, puede indicar una fuerte respuesta Th2 contra el GAD, con la producción de interleukina 4 y 10, capaces de inducir la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B, y de disminuir la respuesta citotóxica contra las células beta. Tal modelo es consistente con la observación de que existe una relación inversa entre la inmunidad humoral (tipo Th2) y la celular (tipo Th1) frente al GAD en sujetos con riesgo para desarrollar DMID¹⁶. Una explicación alternativa es que la desviación hacia una u otra entidad dependa del diferente reconocimiento de epítomos.^{50,51}

4.5.3. Significado de la autoinmunidad GAD en el síndrome de la persona-rígida

Un segundo estudio realizado por Grimaldi et al,⁶ dirigido a determinar la frecuencia de Ac-GAD en pacientes con SPR, confirmó los resultados anteriores sugiriendo la existencia de tres grupos etiopatogénicos (Tabla 4). Un grupo "autoinmune" mayoritario (60%) asociado a Ac-GAD y enfermedades autoinmunes organo-específicas, otro grupo "idiopático" en ausencia de autoinmunidad (40%), y finalmente un tercero "paraneoplásico" (<1%) descrito en pacientes fundamentalmente con cancer de mama, pero que también se ha descrito en un paciente con cáncer de colon y linfoma de Hodgkin, asociado a una proteína neuronal de 128 kD, conocida como anfifisina, que también se localiza en la sinapsis.⁵³

Tabla 4. Subgrupos del síndrome de la persona rígida

* Autoinmune (60%)	- Anticuerpos anti-GAD - Anticuerpos organo-específicos - Asociado a otras enfermedades autoinmunes
* Idiopático (40%)	- Anticuerpos anti-GAD (--)
* Paraneoplásico (<1%)	- Cáncer de mama, colon, y enfermedad de Hodgkin - Anticuerpos anti-anfifisina

Pero, ¿existen diferencias entre los pacientes con SPR "autoinmune" e "idiopático"? Al parecer, una revisión histórica de los casos descritos no ha demostrado diferencias clínicas entre ambas poblaciones de pacientes, lo que ha permitido sugerir a algunos autores la existencia de 2 grupos etiopatogénicos diferentes.⁸ No obstante, podría ocurrir lo mismo que en otras enfermedades neurológicas de origen inmunológico como la miastenia gravis (MG). Entre un 10 y un 20% de los pacientes con MG generalizada no presentan anticuerpos anti-receptor de acetilcolina, y hasta un 50% de las formas oculares son también seronegativos, sin que existan dudas sobre el mismo origen autoinmune.⁵⁴ Lo que podría explicar que alguno de los pacientes con SPR "idiopático" también respondan al mismo tratamiento inmunosupresor.⁵ Otros autores, en cambio, ponen en duda el correcto diagnóstico de SPR en los pacientes con anticuerpos negativos. Así, todos los pacientes diagnosticados mediante los criterios de Lorish et al en la Clínica Mayo, lugar donde se describió por primer vez esta entidad, en total 33, presentaban Ac-GAD.⁵¹ Una tercera posibilidad de la seronegatividad de alguno de estos pacientes podría tener su origen en un problema metodológico.²³ Diferentes técnicas inmunológicas, de detección de los Ac-GAD, han sido utilizadas desde el descubrimiento de estos anticuerpos: inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, inmunoblot, ELISA, radioinmunoensayo; con diferencias técnicas y fuentes diversas del antígeno en un mismo procedimiento, confiriéndoles una sensibilidad y especificidad variable. La inmunohistoquímica es una técnica altamente específica capaz de detectar títulos altos de anticuerpos.⁵⁵ Precisamente, ésta fue la técnica utilizada por Solimena et

al cuando describieron que el 60% de los pacientes con SPR presentaban Ac-GAD. No obstante, el estudio del LCR sólo se realizó en el 70% de los pacientes de esa serie. Otro punto de controversia, es que no todos los pacientes del estudio de Solimena et al³ eran capaces de reconocer al GAD mediante inmunoblot. Datos, en definitiva, que sugieren la existencia de problemas metodológicos, que añadido a la escasez de enfermedades neurológicas con disfunción GABA-érgica evaluadas no permiten dar respuesta a esos interrogantes.

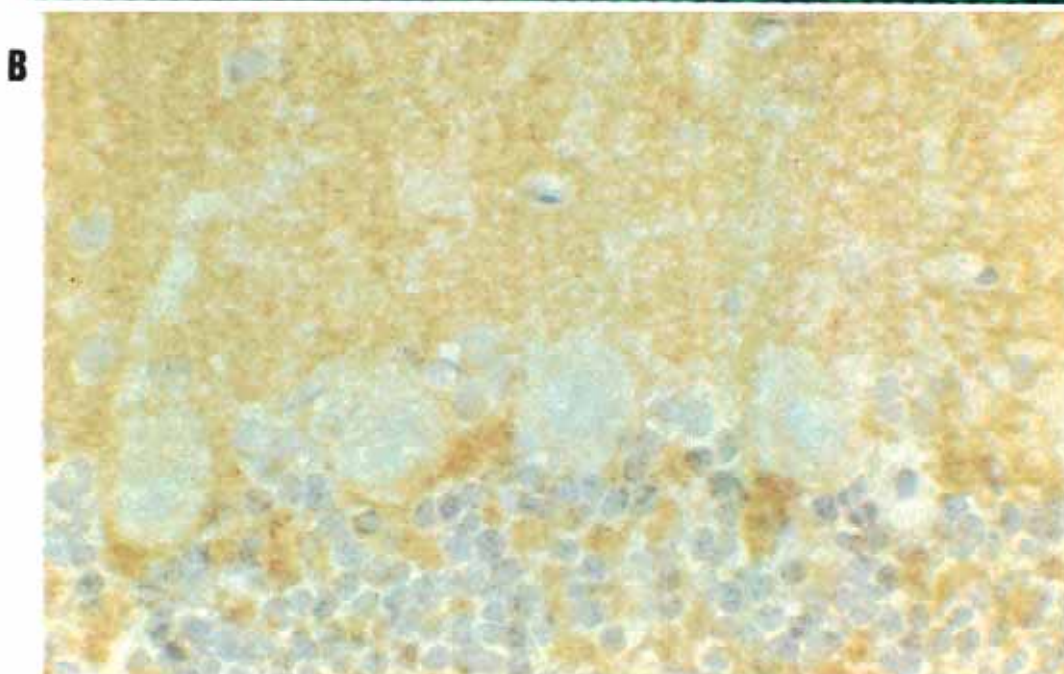
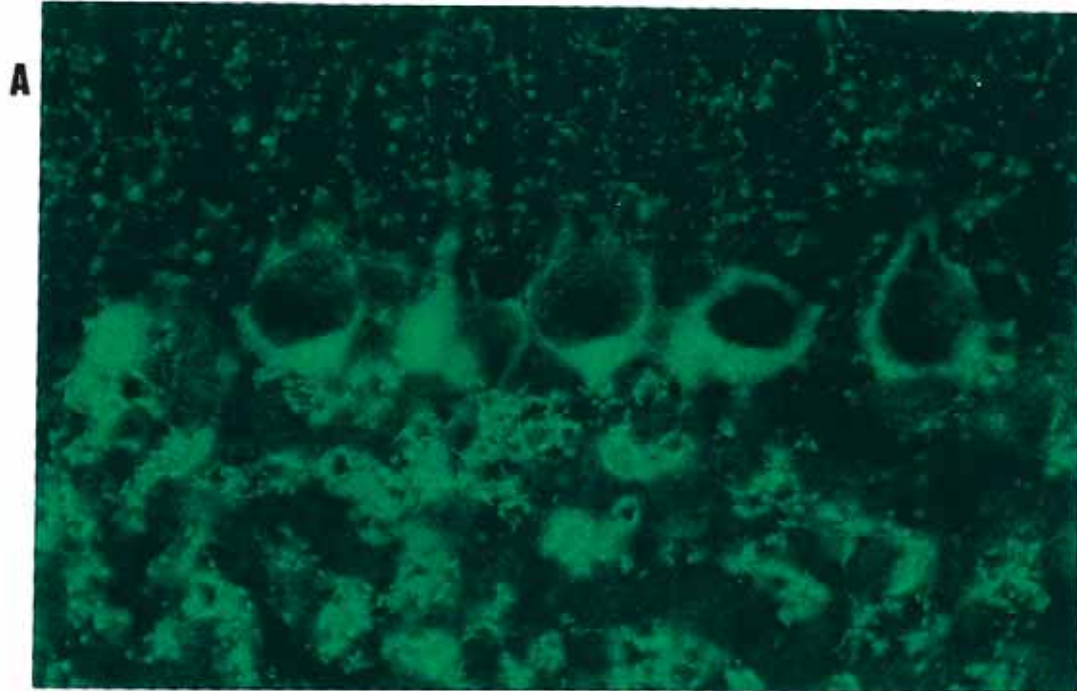
4.5.4. Los anticuerpos anti-anfifisina y el síndrome de la persona-rígida paraneoplásico

En un subgrupo de pacientes el síndrome de la persona-rígida se ha relacionado con la presencia de un cáncer, fundamentalmente cáncer de mama.^{8,53,56} En estos pacientes, el cuadro clínico no se asocia a Ac-GAD ni a la coexistencia de enfermedades autoinmunes organo-específicas, pero sí a un autoanticuerpo dirigido contra una proteína neuronal de 128 kDa que también se concentra en la sinapsis. Esta proteína ha sido identificada recientemente y se corresponde con la anfifisina (Figura 3), una proteína asociada a la vesícula sináptica.⁵⁶ En estos pacientes con SPR y cáncer de mama se ha visto que el autoepítipo dominante se localiza en la región C-terminal de la anfifisina.⁵⁷ Al igual que el GAD, la anfifisina se concentra en las terminaciones nerviosas, esta sublocalización celular hace poco probable que los anticuerpos anti-anfifisina, lo mismo que los Ac-GAD, sean directamente patogénicos por no ser accesibles al compartimento citoplasmático. Independientemente de su valor

patogénico, los anticuerpos anti-anfifisina son un marcador de la presencia de un cancer subyacente, y su presencia obliga a descartar un cancer de mama, tal como ha sucedido en tres de los cinco casos publicados.^{53,56} No obstante, recientemente se ha detectado la presencia de anticuerpos anti-anfifisina en tres pacientes con cancer de pulmón de células pequeñas y encefalomielitis paraneoplásica, y neuronopatía sensitiva (PEM/SN), un trastorno normalmente asociado a los anticuerpos anti-Hu. El suero de uno de esos pacientes presentaba así mismo anticuerpos anti-Hu, sin embargo ninguno de ellos desarrolló un SPR. Este estudio permitió sugerir a su autor que cualquier síndrome clínico específico puede estar asociado a diferentes anticuerpos antineuronales, y que pacientes con un autoanticuerpo determinado pueden presentar un cuadro clínico heterogéneo.⁵⁸ Una conclusión que pone en duda el valor reconocido de que estos anticuerpos son buenos marcadores de un síndrome paraneoplásico específicos y de un tipo de tumor subyacente.

*ESPECTRO DE ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS ASOCIADAS A ANTICUERPOS ANTI-
GLUTAMATO DECARBOXILASA (GAD)*

Figura 3. A. Doble inmunofluorescencia de una sección de cerebelo de rata en la que se puede observar el patrón característico del GAD. La inmunorreactividad puntiforme (en verde) se corresponde con los botones sinápticos. Se puede observar el acúmulo denso en la parte inferior de las células de Purkinje que se corresponde con los axones terminales de las células en cesta. B. Inmunohistoquímica de una sección de cerebelo de rata incubada con el suero de un paciente control con anticuerpos anti-anfifisina. Se puede observar la característica inmunorreactividad de la anfifisina con un punteado más denso y uniforme que el GAD por toda la capa molecular. Contrateñido con hematoxilina, X 400.



II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPOTESIS

El perfil clínico de la mayoría de pacientes con SPR y Ac-GAD es consistente con las características clásicas de autoinmunidad organo-específica: predominio femenino y edad media de la vida, coexistencia de diferentes enfermedades autoinmunes, y presencia de múltiples autoanticuerpos organo-específicos. No obstante, el papel patogénico del GAD en el SPR es controvertido por su localización intraneuronal no expuesto directamente al medio extracelular y por tanto inaccesible a los anticuerpos. Para que el sistema inmune pueda poner en marcha la cascada inmunológica, ésta debe producirse sobre antígenos de superficie de las neuronas GABA-érgicas. Se podría considerar que la respuesta autoinmune es un epifenómeno relacionado con la destrucción celular y la exposición de antígenos intracitoplasmáticos. En este caso, los Ac-GAD deberían estar presentes en otras enfermedades degenerativas o inflamatorias en las que existe destrucción celular. Algo que es poco probable pues sólo de forma ocasional se ha descrito la presencia de Ac-GAD en otras enfermedades neurológicas no relacionadas con el SPR.

Es posible que en el SPR, los Ac anti-GAD sean el principal autoanticuerpo en el contexto de una respuesta autoinmune dirigida contra antígenos múltiples, incluyendo proteínas expuestas en la superficie celular y éstos a su vez las dianas patogénicas de la

respuesta autoinmune. La demostración de que la autoinmunidad anti-GAD no es un epifenómeno relacionado con la destrucción neuronal apoyaría ésta hipótesis.

En estas condiciones no es descartable que un mismo autoanticuerpo o respuesta inmune mixta, celular y humoral, dirigida contra antígenos ampliamente distribuidos en el sistema nervioso, sea el causante de una presentación clínica diferente en función del subgrupo de neuronas afectadas. Esta heterogeneidad clínica se ha observado en otras enfermedades del sistema nervioso con base autoinmune reconocida, como en la miastenia grave, y en otros síndromes sugestivos de ser mediados inmunológicamente como los paraneoplásicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

1. Analizar la frecuencia de anticuerpos anti-GAD en enfermedades neurológicas con afectación GABA-érgica conocida.
2. Determinar el perfil clínico e inmunológico de las enfermedades neurológicas asociadas a la presencia de anticuerpos anti-GAD.

2.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la utilidad diagnóstica de los anticuerpos anti-GAD en el síndrome de la persona-rígida.
2. Analizar la frecuencia de anticuerpos anti-anfifisina en pacientes con trastornos neurológicos paraneoplásicos diferentes del síndrome de la persona-rígida.

IV. TRABAJOS

**ESPECTRO DE ENFERMEDADES NEUROLOGICAS ASOCIADAS A ANTICUERPOS ANTI-
GLUTAMATO DECARBOXILASA (GAD)**

**TRABAJO 1: Ataxia cerebelosa y anticuerpos anti-GAD, una segunda
enfermedad neurológica asociada a la autoinmunidad GAD**

Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in three patients with cerebellar ataxia, late-onset insulin-dependent diabetes mellitus, and polyendocrine autoimmunity

A. Saiz, MD; J. Arpa, MD; A. Sagasta, MD; R. Casamitjana, PhD; J.J. Zarranz, MD; E. Tolosa, MD; and F. Graus, MD

Article abstract—*Background:* Glutamic acid decarboxylase (GAD) is the main target of humoral autoimmunity in stiff-man syndrome (SMS) and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). GAD autoantibodies (GAD-Abs) are reported in a few patients with cerebellar ataxia, but their relevance is unclear. We describe three patients with cerebellar ataxia and GAD-Abs. *Methods:* GAD-Abs were assayed by radioimmunoassay (RIA) and immunohistochemistry and confirmed by immunoblot of recombinant human GAD65. The GAD-Ab levels of the three patients with cerebellar ataxia were compared with those of five with SMS, 49 with IDDM, 64 with cerebellar ataxia of probable degenerative origin without associated autoimmune features, 14 non-IDDM islet cell antibody-positive first-degree relatives of IDDM patients, and 91 normal subjects. *Results:* The three patients with ataxia and GAD-Abs were women (mean age, 63 years) with an isolated progressive cerebellar disorder, family history of IDDM, late-onset IDDM, and several positive serum organ-specific autoantibodies. Two patients had autoimmune thyroiditis, and one had pernicious anemia. CSF analysis demonstrated oligoclonal IgG bands and intrathecal synthesis of GAD-Abs. By RIA, GAD-Ab titers from the three patients were similar to those of SMS and significantly higher, without overlap, than the titers of IDDM patients. GAD-Abs were absent in the 64 patients with cerebellar ataxia and no evidence of autoimmune disorders. *Conclusions:* These findings suggest a link of GAD autoimmunity not only with SMS but also with cerebellar dysfunction. GAD-Abs should be sought in patients with cerebellar ataxia who have late-onset IDDM and other organ-specific autoimmune manifestations.

NEUROLOGY 1997;49:1026-1030

Glutamic acid decarboxylase (GAD), the enzyme that catalyzes the conversion of glutamate to GABA, has been identified as a dominant autoantigen in two diseases, stiff-man syndrome (SMS)^{1,2} and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM).^{3,4} GAD autoantibodies (GAD-Abs) are present in approximately 80% of newly diagnosed IDDM patients and can be detected many years before the clinical onset of the disease.³ SMS is a rare disorder of the CNS characterized by progressive muscle rigidity with superimposed painful spasms.⁵ Around 60% of patients with SMS harbor GAD-Abs in their serum and CSF. SMS patients with GAD-Abs usually present IDDM and other organ-specific autoimmune manifestations, suggesting that SMS may have an autoimmune-mediated pathogenesis.⁴ GAD-Abs from patients with SMS have higher titers and a different epitope specificity compared with those of patients with IDDM.^{3,6,7}

GAD-Abs are reported in a few patients with de-

generative diseases of the cerebellum,^{2,8-12} palatal myoclonus,¹³ and parkinsonism.^{10,12} However, all but two patients^{11,13} were included in a varied control group of degenerative diseases used to ascertain the specificity of GAD-Abs for SMS, and a clinical-immunologic correlation was not done.

We report GAD-Abs in three patients with cerebellar ataxia and late-onset IDDM, in the setting of organ-specific autoimmunity similar to that observed in most SMS patients with positive GAD-Abs.

Case reports. *Patient 1.* A 76-year-old woman was admitted in December 1994 with a 15-month history of progressive gait disturbance and dysarthria. She was diagnosed with diabetes mellitus 10 years earlier that has required insulin for the past 5 years. The family history was unremarkable, except that her mother had IDDM. The general examination disclosed cheilitis and depapillated tongue. On neurologic examination, there was marked dysarthria, impairment of smooth-pursuit eye movements,

From the Neurology Service (Drs. Saiz, Tolosa, and Graus), Department of Medicine, and Laboratory of Hormonal (Dr. Casamitjana), Hospital Clinic i Provincial, University of Barcelona, Barcelona; Neurology Services (Dr. Arpa), Hospital La Paz, Madrid; and Hospital de Cruces (Drs. Sagasta and Zarranz), Barakaldo, Spain.

Supported in part by grant FIS 95/0233 (F.G.). Dr. Saiz is a recipient of a postresidency grant from the Hospital Clinic.

Received February 3, 1997. Accepted in final form May 5, 1997.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Francesc Graus, Neurology Services, Hospital Clinic i Provincial, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

limb dysmetria, intention tremor, and severe ataxia of stance and gait. The rest of the neurologic examination was normal.

Magnetic resonance imaging showed diffuse cerebellar atrophy without involvement of the brainstem. Needle EMG and nerve conduction velocity studies were normal. Pernicious anemia was diagnosed based on a low serum vitamin B₁₂ of 137 pg/mL (normal, 200 to 1,000 pg/mL) with a positive Schilling test and gastric atrophy demonstrated by gastroscopy and biopsy. There was an elevated level of thyroid-stimulating hormone (34.26 μ IU/mL) with normal level of serum thyroid hormones, suggestive of subclinical hypothyroidism. Echography of the thyroid showed a multinodular goiter. The following organ-specific autoantibodies were detected: pancreatic islet-cell, intrinsic factor, thyroglobulin, and thyroid microsomal antibodies. Adrenal antibodies were negative. The CSF analysis was normal except for an IgG index of 1.5 (upper normal value, 0.7) and oligoclonal IgG bands, not present in the serum, evaluated by isoelectric focusing and immunoblot of IgG.

The patient was treated with cyanocobalamin and L-thyroxin without improvement of the cerebellar syndrome. In the last 18 months she presented two generalized seizures that required treatment with phenytoin.

Patient 2. A 60-year-old woman noticed gait instability over 2 weeks in December 1995 that gradually worsened in the ensuing 3 months. Graves' disease was diagnosed at age 48 years, and diabetes mellitus, which required insulin treatment 1 month after diagnosis, was diagnosed 5 years later. Her family history was remarkable for late-onset IDDM in two sisters; one also has vitiligo. General examination was normal except for goiter. The neurologic examination disclosed dysarthria, bilateral horizontal nystagmus, limb dysmetria, intention tremor, and severe truncal ataxia. Neurologic examination was otherwise normal.

MRI showed mild atrophy of the cerebellum. EMG and the level of thyroid hormones were normal. The following organ-specific autoantibodies were detected: pancreatic islet-cell, thyroid microsomal, and gastric parietal cell antibodies. Thyroglobulin and adrenal antibodies were negative. The CSF examination was normal except for the presence of oligoclonal IgG bands, absent in the serum, evaluated by isoelectric focusing and immunoblot of IgG. HLA typing was as follows: DRB1*03,07,B3,B4,DQB1*02. The cerebellar disorder remained unchanged in September 1996.

Patient 3. A 52-year-old woman was evaluated in February 1990 because of progressive unsteadiness of gait, vertigo, and oscillopsia related to postural head changes during the last year. Her medical history was significant for diabetes mellitus diagnosed at age 45 years that required insulin treatment at 6 months after diagnosis as well as psoriasis at age 38 years. There was a family history of late-onset IDDM (father and two paternal uncles). General examination was normal except for psoriasis. The neurologic examination disclosed only downbeat vertical nystagmus and ataxic gait. MRI showed type I Arnold-Chiari malformation. Over the ensuing 2 years, she noticed progressive dysarthria and her gait ataxia. Clinical progression was believed to be related to the Arnold-Chiari malformation, and the patient underwent posterior suboccipital decompression in June 1992. After surgery, her dysarthria and downbeat nystagmus improved but not her

gait. Over the ensuing 3 years she developed clumsiness of the right hand and increasing unsteadiness. Neurologic examination in September 1996 revealed mild dysarthria, upward vertical nystagmus, limb dysmetria more marked on the right, and severe ataxic gait that prevented her from walking alone more than a few meters. MRI demonstrated resolution of cerebellar tonsillar descent and mild atrophy of the vermis. Routine laboratory analysis, including thyroid hormones, were normal. The following organ-specific autoantibodies were detected: pancreatic islet-cell, gastric parietal cell, and thyroid microsomal antibodies, whereas adrenal and thyroglobulin antibodies were negative. The CSF analysis was normal except for oligoclonal IgG bands, not present in the serum, evaluated by isoelectric focusing and immunoblot of IgG. HLA typing was as follows: DRB1*01,12,B3,DQB1*0301,0501.

Methods. *Sera.* Serum and CSF samples were obtained from the three patients. Patient 3 had serum samples from 1990 and 1996. We compared the levels of GAD-Abs of these three patients with those of (1) five patients (median age, 61 years; range, 54 to 75 years) with the diagnosis of SMS, according to accepted criteria⁵; (2) 49 patients with IDDM, 34 with newly diagnosed IDDM (median age, 29 years; range, 11 to 78 years) and nine with thyroid antibodies; and (3) 64 patients with late-onset cerebellar ataxia of probable degenerative origin, 10 of whom had familial olivoponto-cerebellar atrophy (median age, 61 years; range, 29 to 81 years) (median duration of disease, 3 years; range, 1 to 20 years) (five of the 64 patients had type II diabetes mellitus but none had IDDM or clinical features of polyendocrine autoimmunity or other autoimmune disorders); (4) 14 non-IDDM islet-cell antibody-positive first-degree relatives of IDDM patients (median age, 18 years; range, 10 to 50 years); and (5) 91 healthy blood donors (median age, 26 years; range, 19 to 73 years) with no family history of IDDM.

Anti-glutamic acid decarboxylase autoantibodies. The presence of GAD-Abs was assessed in all serum samples by radioimmunoassay and immunohistochemistry, and the positive samples were confirmed by immunoblot.

Radioimmunoassay. GAD-Abs were measured with a commercial kit (CIS Biointernational, Gif-sur-Yvette France) following the manufacturer's instructions.¹⁴ Briefly, 20 μ L of standards (SMS serum containing GAD-Abs at different dilutions expressed in arbitrary units, U/mL) and serum samples were incubated with 50 μ L of ¹²⁵I-labelled human recombinant GAD65 for 2 hours at room temperature. Then, 50 μ L of protein A-sepharose was added and the mixture incubated for 1 hour at room temperature. After centrifugation at 1,500g for 30 minutes at 4 °C, the precipitates were counted for ¹²⁵I with a gamma scintillation counter. The results were interpolated in the standard curve constructed using the dilutions of the positive control serum. For each serum, conditions were established in that appropriate dilutions of the serum produced results that were in the straight line portion of the standard curve. All samples were tested in duplicate. The inter- and intra-assay coefficient of variation was below 10%.

Immunohistochemistry. Wistar rats were anesthetized and perfused with saline followed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS). The cerebellum was further fixated with 4% paraformaldehyde for 4 hours

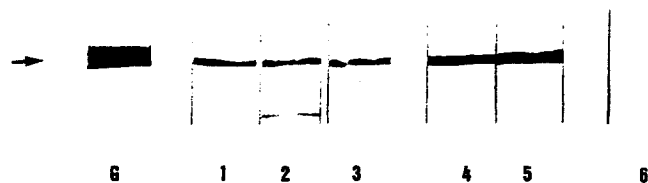


Figure 1. Immunoblots of GAD65 recombinant protein probed with the serum of patients with cerebellar ataxia and autoimmune features (lanes 1 to 3), SMS (lanes 4 and 5), and a normal subject (lane 6). The immunoreactive bands have the same electrophoretic mobility as that recognized by GAD-6 monoclonal antibody (lane G).

and cryoprotected with 20% sucrose in PBS overnight. Ten μ m frozen sections were air dried and, after inhibition of endogenous peroxidase with 0.3% hydrogen peroxide in PBS for 10 minutes, were sequentially incubated with 10% normal goat serum for 20 minutes, patient's serum (screening dilution 1:500) for 3 hours at 37 °C, biotinylated goat anti-human IgG for 30 minutes, and the avidin biotin immunoperoxidase complex (Vector Labs, Burlingame, CA) for 30 minutes. The reaction was developed with 0.05% diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) with 0.01% hydrogen peroxide in PBS with 0.5% Triton X-100. Dilution of antibodies was done in PBS with 0.3% Triton X-100.

Immunoblot. Human GAD65 recombinant protein (CIS Biointernational) (0.16 μ g/lane) was electrophoretically separated in a 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose.¹⁵ After blocking with 5% dry Carnation milk and 10% normal goat serum, strips were incubated with the patient's serum (1:1,000 dilution) or GAD-6 monoclonal antibody (Hybridoma Bank, Iowa City, IA) for 12 hours at room temperature, washed with PBS, and incubated with biotinylated goat anti-human IgG, diluted 1:2,000, or horse antimouse IgG, diluted 1:1,000 in 10% normal goat serum for 1 hour. Strips were then processed as described in the immunohistochemistry technique.

Intrathecal synthesis of GAD-Abs. Intrathecal (IT) GAD-Ab synthesis was calculated by Schüller's formula as previously described.¹⁶ Briefly, the GAD-Ab-specific activity (ASA) was estimated in the serum and CSF by the following formula: ASA = serum or CSF titer/[IgG] (mg/L) and expressed in units 10^{-3} (using the reciprocals of end point titers determined by immunohistochemistry). The IT GAD-Ab synthesis was calculated by the following formula: IT ASA = (CSF ASA - [serum ASA \times percentage of IgG from serum])/percentage of IT IgG.

A ratio of IT ASA/serum ASA of GAD-Abs >2 was considered a positive IT synthesis.¹⁶

Results. The serum and CSF of the three patients recognized a band in immunoblots of GAD65 recombinant protein with the same electrophoretic mobility as that recognized by GAD-6 monoclonal antibody or serum of SMS patients (figure 1). By radioimmunoassay, the serum of the three patients had levels of GAD-Abs of 9,300 U/mL, 39,500 U/mL, and 14,000 U/mL that were similar to those of patients with SMS (median, 20,500 U/mL; range, 600 to 67,000 U/mL). The GAD-Ab levels were significantly lower in IDDM patients (48 ± 112 U/mL) ($p < 0.0001$) and

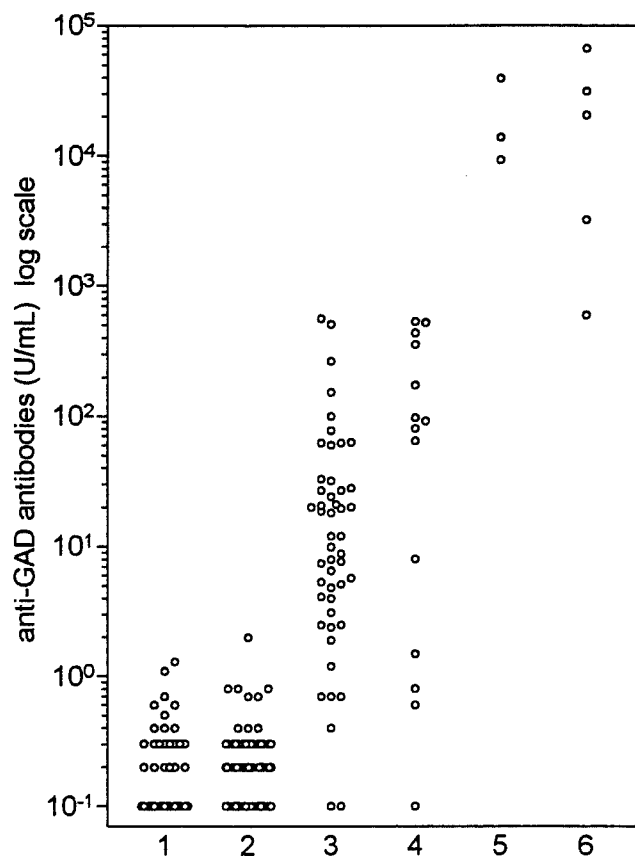


Figure 2. Levels of GAD-Abs, by radioimmunoassay, expressed in arbitrary units, U/mL. Note that the y-axis is a log scale. Along the x-axis: 1 = Control ($n = 91$); 2 = Cerebellar Ataxia ($n = 64$); 3 = IDDM ($n = 49$); 4 = Relatives of IDDM ($n = 14$); 5 = "Autoimmune" Cerebellar Ataxia ($n = 3$); and 6 = SMS ($n = 5$).

ICA-positive relatives (170 ± 203 U/mL) ($p < 0.0001$). None of the 64 patients with cerebellar ataxia not associated with autoimmune disease and the normal subjects had GAD-Abs (figure 2). In the immunohistochemistry studies, only the serum and CSF samples from the three patients, and all but one serum sample of the five SMS patients, showed immunostaining of GABA-ergic nerve terminals on rat cerebellar tissue sections (figure 3). Serum GAD-Ab titers by immunohistochemistry were 1:20,000, 1:16,000, and 1:8,000 in the three patients, and the corresponding CSF titers were 1:400, 1:160, and 1:400. The ratio of IT ASA/serum ASA of GAD-Abs was 16.4, 2.9, and 13.5, respectively, consistent with a positive IT synthesis.

Discussion. The observation of three patients with cerebellar ataxia, high-titer GAD-Abs, and similar clinical and serologic features suggests that GAD-Abs may be related to cerebellar dysfunction and extend the spectrum of neurologic disorders associated with GAD autoimmunity.

GAD-Abs have been detected in a few patients with neurologic disorders other than SMS.^{2,8-13} Honorat et al.¹¹ described a patient with cerebellar cortical atrophy, peripheral neuropathy, and slow sac-



Figure 3. Section of rat cerebellum incubated with the serum from patient 1 showing the characteristic immunoreactivity of GAD-Abs. Counterstained with hematoxylin, magnification $\times 400$ before 22% reduction.

cadic eye movements and GAD-Abs. The patient was not diabetic and did not have other features of polyendocrine autoimmunity. The other patients with cerebellar ataxia and GAD-Abs (two patients with late-onset cerebellar ataxia and another with multi-system atrophy) were described in abstract form^{8,9} and were included as part of a "control" group of neurologic disorders in a study that evaluated the frequency of GAD-Abs in patients with SMS.^{2,10} These patients were diabetic, but no additional information was provided. In addition, two recent reports have emphasized the presence of a cerebellar disorder at the same time or after the diagnosis of SMS.^{17,18}

Our patients presented with an isolated cerebellar syndrome. In one of them, the onset was subacute, with a clinical pattern similar to that of paraneoplastic cerebellar degeneration.¹⁹ The other two patients did not develop clinical or radiologic involvement of the brainstem during the follow-up for more than 3 years, and the course of the cerebellar syndrome was not different from that observed in idiopathic late-onset cerebellar ataxia.²⁰ The three patients had several organ-specific, mostly endocrine, autoimmune manifestations, and presented an HLA genotype associated with the susceptibility to develop autoimmune disorders.^{21,22} All of them had a family history of IDDM, in contrast to the 20% frequency of IDDM found in first-degree relatives of patients with this disease.²³ This clinical and immunologic profile is common to that observed in SMS with GAD-Abs. IDDM, usually of late onset, occurs in up to 30% of patients with SMS.⁴ Epilepsy, present in patient 1, is also reported in about 10% of SMS patients.²

It is unlikely that the GAD-Abs found in our patients were only related to their IDDM because GAD-Ab levels were higher and did not overlap with those of IDDM patients without neurologic disorders. Moreover, the presence of a positive IT synthesis of

GAD-Abs in the CSF samples would not be expected if GAD-Abs were just related to the IDDM.

Could GAD-Abs be responsible for the cerebellar dysfunction of our patients? GAD-Abs were not detected in patients with cerebellar ataxia without the autoimmune background of the GAD-Ab-positive patients. In addition, with the immunohistochemistry technique described in this study that can detect high GAD-Ab titers, we did not find another positive serum sample among more than 300 taken from patients with several neurologic disorders studied in our laboratory (Graus, unpublished observation). These data further suggest high GAD-Ab titers are unlikely to be produced as a consequence of the damage of GABA-ergic neurons by other causes.

Although GAD is a cytoplasmic antigen, there is experimental evidence that shows Purkinje cells may uptake IgG from the CSF.²⁴ Then, GAD-Abs that are present in high levels in the CSF of these patients could theoretically be internalized by the Purkinje cells in vivo, interact with GAD, and cause the neuronal dysfunction. An alternative explanation is that the high GAD-Ab titers only reflect the presence of a more complex, probably cell-mediated immune response against GAD or the predisposition of these patients to a multiantigenic autoimmunity. Even if GAD is not the key antigen, the immunologic profile of these patients and the presence of oligoclonal IgG bands in the CSF suggest that the most probable pathogenesis of the cerebellar disorder is an immune response to a still unknown Purkinje cell antigen, and a trial of immunosuppressor therapy may be warranted.

Other possible causes for the cerebellar syndrome were reasonably excluded in our patients. None presented alcohol abuse, serum anti-Yo antibodies, or an underlying tumor. Cerebellar ataxia has been described in patients with myxedema or pernicious anemia.²⁵ Nevertheless, patient 1 did not improve with vitamin B₁₂ or thyroid replacement, and patients 2 and 3 were euthyroid.

In conclusion, our findings suggest a possible link of GAD autoimmunity not only with SMS, but also with at least some cases of cerebellar ataxia. We suggest that testing for GAD-Abs may be indicated in patients with cerebellar ataxia associated with late-onset IDDM especially if they have a family history of IDDM or present clinical or serologic evidence of other organ-specific autoimmune manifestations.

Acknowledgments

We are indebted to Mercè Bonastre, Eva Sanchez, and Rosa Pagés for their technical assistance and to Drs. R. Gomis and C. Rodriguez for their valuable comments on the manuscript. The GAD 6 monoclonal antibody was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA.

References

1. Solimena M, Folli F, Denis-Donini S, et al. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy, and type I diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1988;318:1012-1020.

2. Solimena M, Folli F, Aparisi R, Pozza G, De Camilli P. Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. *N Engl J Med* 1990;322:1555-1560.
3. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990;347:151-156.
4. Solimena M, De Camilli P. Autoimmunity to glutamic acid decarboxylase (GAD) in stiff-man syndrome and insulin-dependent diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 1991;14:452-457.
5. Lorish TR, Thorsteinsson G, Howard FM. Stiff-man syndrome updated. *Mayo Clin Proc* 1989;64:629-636.
6. Kim J, Namchuk M, Bugawan T, et al. Higher autoantibody levels and recognition of a linear NH₂-terminal epitope in the autoantigen GAD-65 distinguish stiff-man syndrome from insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1994;180:595-606.
7. Daw K, Ujihara N, Atkinson M, Powers AC. Glutamic acid decarboxylase autoantibodies in stiff-man syndrome and insulin-dependent diabetes mellitus exhibit similarities and differences in epitope recognition. *J Immunol* 1996;156:818-825.
8. Solimena M, Piccolo G, Martino G, et al. Autoantibodies directed against gabaergic nerve terminals in a patient with idiopathic late-onset cerebellar ataxia and type IB diabetes mellitus [abstract]. *Clin Neuropathol* 1988;7(suppl):211.
9. Grimaldi LME, Quattrini A, Martino G, et al. Cerebellar autoantibodies in patients with isolated or associated stiff-man syndrome and cerebellar atrophies [abstract]. *Neurology* 1990;40(suppl 1):117-118.
10. Grimaldi LME, Martino G, Braghi S, et al. Heterogeneity of autoantibodies in stiff-man syndrome. *Ann Neurol* 1993;34:57-64.
11. Honnorat J, Trouillas P, Thivolet C, Aguera M, Belin MF. Autoantibodies to glutamate decarboxylase in a patient with cerebellar cortical atrophy, peripheral neuropathy, and slow eye movements. *Arch Neurol* 1995;52:462-468.
12. Nemni R, Bonifacio E, Mortara A, Lampasona V, Canal N. Characterisation and quantification of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD) in neurological syndromes [abstract]. *J Neurol* 1996;243(suppl 2):S23.
13. Nemni R, Braghi S, Natali-Sora MG, et al. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in palatal myoclonus and epilepsy. *Ann Neurol* 1994;36:665-667.
14. Lühder F, Woltanski KP, Mauch L, et al. Detection of autoantibodies to the 65-Kd isoform of glutamate decarboxylase by radioimmunoassay. *Eur J Endocrinol* 1994;130:575-580.
15. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4354.
16. Schuller E. A new strategy for the study of intrathecal immunity. In: Marrosu MG, Cianchetti C, Tabolatto B, eds. *Trends in neuroimmunology*. New York: Plenum Press, 1990:3-12.
17. Giometto B, Miotto D, Faresin F, et al. Anti-gabaergic neuron autoantibodies in a patient with stiff-man syndrome and ataxia. *J Neurol Sci* 1996;143:57-59.
18. Brashear HR, Login IS, Mathe SA, Phillips LH. Cerebellar disorder in stiff-man syndrome [abstract]. *Neurology* 1997;48:A433.
19. Dalmau J, Graus F. Paraneoplastic syndromes. In: Samuels MA, Feste S, eds. *Office practice of neurology*. New York: Churchill Livingstone, 1996:925-934.
20. Klockgether T, Schroth G, Diener HC, Dichgans J. Idiopathic cerebellar ataxia of late onset: natural history and MRI morphology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990;53:297-305.
21. Thomson G, Robinson WP, Kuhner MK, et al. Genetic heterogeneity, modes of inheritance, and risk estimates for a joint study of Caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hum Genet* 1988;43:799-816.
22. Eisenbarth GS, Jackson RA. The immunoendocrinopathy syndromes. In: Wilson JD, Foster DW, eds. *Williams textbook of endocrinology*. Philadelphia: WB Saunders, 1992:1555-1566.
23. Karjalainen J, Salmela P, Ilonen J, Surcel H-M, Knip M. A comparison of childhood and adult type I diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1989;320:881-886.
24. Borges LF, Elliott PJ, Gill R, Iversen SD, Iversen LL. Selective extraction of small and large molecules from the cerebrospinal fluid by Purkinje neurons. *Science* 1985;228:346-348.
25. Cremer GM, Goldstein NP, Paris J. Myxedema and ataxia. *Neurology* 1969;19:37-46.

**TRABAJO 2: Valor diagnóstico de los anticuerpos anti-GAD en el síndrome de la
persona-rígida**

Utilidad diagnóstica de los anticuerpos antiglutamato descarboxilasa en el síndrome de la persona rígida (*stiff-man syndrome*)

Albert Saiz, Manuel Arias^a, Andrés Fernández-Barreiro^b, Adolfo Mínguez^c, Roser Casamitjana^d, Eduardo Tolosa y Francesc Graus

Servicio de Neurología. Departamento de Medicina. ³Laboratorio Hormonal.

Hospital Clínic i Provincial. Universidad de Barcelona. Servicios de Neurología.

^aHospital de Conxo. Santiago de Compostela. ^bHospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia.

^cHospital Virgen de las Nieves. Granada.

El síndrome de la persona rígida (SPR) se caracteriza por rigidez muscular progresiva, de predominio axial, y espasmos. Por su rareza, muchos pacientes permanecen sin diagnóstico durante años o son diagnosticados de un trastorno psiquiátrico. El 60% de los pacientes con SPR presentan anticuerpos antiglutamato descarboxilasa (Ac-GAD). El objetivo fue determinar el valor diagnóstico de los Ac-GAD en un síndrome cuyo espectro clínico no es bien conocido, y en el que el diagnóstico se establece mediante criterios clínicos.

Cinco pacientes con sospecha clínica de SPR fueron estudiados siguiendo los criterios diagnósticos establecidos. La presencia de Ac-GAD fue evaluada mediante radioinmunoanálisis (RIA) e inmunohistoquímica, y confirmada por inmunoblot. El título de Ac-GAD se comparó con el de 49 pacientes con diabetes insulino dependiente (DMID), 322 pacientes con otras enfermedades neurológicas, 14 sujetos no diabéticos familiares de pacientes con DMID con anticuerpos antiisletos pancreático (ICA) y 91 sujetos sanos.

Tres pacientes cumplían todos los criterios diagnósticos (SPR típico). La alteración limitada a una extremidad inferior, y el inicio agudo con afectación distal de las extremidades, conformaba el cuadro de SPR atípico en 2 pacientes. Los 5 pacientes presentaban diversos anticuerpos organospecíficos y, excepto uno, tenían otras enfermedades autoinmunes. El título de Ac-GAD, por RIA, fue muy elevado (media: 24.532 ± 26.892 U/ml) y significativamente superior al de los pacientes con DMID sin afectación neurológica (media: 48 ± 112 U/ml) ($p < 0,0001$). Los Ac-GAD estaban ausentes en los pacientes y sujetos sin SPR.

El espectro clínico del SPR parece ser más amplio que el establecido por los criterios diagnósticos. Los Ac-GAD permiten identificar a pacientes con SPR que no podrían ser diagnosticados con seguridad mediante los criterios actuales.

Diagnostic value of glutamic acid decarboxylase autoantibodies in stiff-man syndrome

Stiff-man syndrome (SMS) is a rare neurological disorder characterized by progressive rigidity of the axial musculature with superimposed spasms. Frequently, SMS remains undiagnosed for prolonged periods or the patients are diagnosed of a primary psychiatric disorder. 60% of the SMS patients harbor GAD-autoantibodies (GAD-Ab). We have analyzed the diagnostic value of GAD-Ab in a syndrome whose clinical expression is not well known, but its diagnosis is performed by clinical criteria.

Five patients were studied following the established clinical criteria for diagnosis of SMS. GAD-Ab were analyzed by radioimmunoassay (RIA) and immunohistochemistry, and confirmed by immunoblot. The GAD-Ab titers were compared with those of 49 patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), 322 with other neurological disorders, 14 non-IDDM first-degree relatives of IDDM patients with antibodies anti-islet cells and 91 normal subjects.

Three patients fulfilled all clinical criteria (typical SMS). Unilateral limb symptoms alone, and acute onset with rapid progression involving the distal limb muscles constituted the atypical features of SMS in the remaining 2 patients. The 5 patients presented several serum organ-specific autoantibodies. All but one also presented autoimmune diseases. By RIA, GAD-Ab titers from all patients were elevated (mean: $24,532 \pm 26,892$ U/ml) and significantly higher than the titers of IDDM patients without neurological disorders (mean: 48 ± 112 U/ml) ($p < 0,0001$). GAD-Ab were absent in the non-SMS patients and in normal subjects.

These findings suggest that clinical expression of SMS is more extensive than that recognized by the established criteria. GAD-Ab are helpful to define the clinical spectrum of SMS.

Med Clin (Barc) 1998; 110: 378-381

El Dr. Saiz es beneficiario de una beca posresidencia del Hospital Clínic i Provincial.

Correspondencia: Dr. F. Graus.
Servicio de Neurología. Hospital Clínic i Provincial,
Villarroel, 170. 08036 Barcelona.

Manuscrito aceptado el 29-4-1997

El síndrome de la persona rígida (SPR) (*stiff-man syndrome*) es un trastorno poco frecuente del sistema nervioso central caracterizado por rigidez muscular progresiva, de predominio axial, con espasmos dolorosos espontáneos o precipitados por estímulos sensitivos^{1,2}. Desde el punto de vista fisiopatológico, se cree que es el resultado de un desequilibrio entre las vías excitatorias catecolaminérgicas e inhibitorias GABA-érgicas que controlan la actividad de las neuronas motoras alfa de la médula espinal³. Su diagnóstico se establece mediante criterios clínicos y electrofisiológicos⁴.

La glutamato descarboxilasa (GAD), enzima que sintetiza el GABA a partir del glutamato, ha sido identificada como el principal autoantígeno en el SPR^{5,6} y en la diabetes mellitus insulino dependiente (DMID)^{7,8}. Un 60% de los pacientes con SPR presentan anticuerpos anti-GAD (Ac-GAD). La coexistencia, en este subgrupo de pacientes, de enfermedades autoinmunes, principalmente DMID, y autoanticuerpos organospecíficos sugiere que el SPR puede tener una patogenia autoinmune⁹.

La rareza del SPR unida a la presencia de trastornos psicológicos y escasez en general de signos neurológicos, aparte de la rigidez, y ciertas alteraciones del movimiento de características complejas hacen que muchos de estos pacientes permanezcan sin diagnóstico durante años o sean diagnosticados de un trastorno psiquiátrico primario⁹. El que los criterios diagnósticos se hayan fundamentado únicamente en la clínica puede contribuir a que los pacientes con una presentación o evolución atípica no puedan ser diagnosticados con seguridad de SPR.

En este trabajo se describen las características clínicas y el perfil inmunológico de 5 pacientes con SPR, y se discute la utilidad de la determinación de los Ac-GAD en el diagnóstico de este síndrome.

Pacientes y métodos

Se estudian 5 pacientes con la sospecha clínica de SPR con el fin de analizar si cumplían con los criterios diagnósticos establecidos⁴: 1) inicio insidioso de

rigidez y envaramiento de la musculatura axial; 2) lenta progresión de los síntomas para afectar a la musculatura proximal de las extremidades; 3) deformidad persistente de la columna (mayor postura hiperlordótica de la columna lumbar); 4) espasmos musculares episódicos desencadenados por movimientos bruscos, sacudidas, ruidos y trastornos emocionales; 5) funciones cognitivas normales; 6) exploración motora y sensitiva normal; 7) actividad continua de unidades motoras, a pesar de conseguir la relajación, en el electromiograma (EMG), y 8) actividad EMG abolida por la administración intravenosa de diazepam, o respuesta positiva al tratamiento oral con diazepam.

Los Ac-GAD se determinaron, en el suero de los 5 pacientes y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes 2 al 5, mediante radioinmunoanálisis (RIA) e inmunohistoquímica, y se confirmaron mediante inmunoblot. El título de Ac-GAD se comparó con el de: 1) 49 pacientes con DMID (34 de ellos de diagnóstico reciente); 2) 322 pacientes con otras enfermedades neurológicas (136 con enfermedades neurológicas en las que existe destrucción de neuronas GABA-érgicas: enfermedad de Huntington [22], parálisis supranuclear progresiva [15], ataxia cerebelosa de presumible origen neurodegenerativo [64] y degeneración cerebelosa paraneoplásica [35]; 111 con enfermedades en las que existe disfunción GABA-érgica: epilepsia [59], distonía [20], enfermedad de Parkinson [30] y de Hallervorden-Spatz [2], y 75 con enfermedades en las que no se ha implicado destrucción o disfunción GABA-érgica: enfermedad de Alzheimer [29], parkinsonismos atípicos [12], enfermedad de Friedreich [4], mioclonías segmentarias [2], degeneración corticobasal [1], enfermedad de Steinert [1] y esclerosis múltiple [26]); 3) 14 sujetos no diabéticos, familiares en primer grado de pacientes con DMID y anticuerpos antislote pancreático (ICA) positivos, y 4) 91 donantes de sangre sanos, sin antecedentes familiares de DMID.

Radioinmunoanálisis

La determinación cuantitativa de los Ac-GAD se realizó mediante un equipo comercial (CIS Biointernational, Francia) y se siguieron las instrucciones del proveedor¹⁰. Brevemente, 20 µl de suero estándar (suero humano que contiene Ac-GAD a diferentes concentraciones expresadas en unidades arbitrarias U/ml), y de las muestras, eran incubados con 50 µl de GAD-65 recombinante humano ligado a ¹²⁵I durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, tras añadirse 50 µl de proteína A-seferosa, la mezcla era incubada durante una hora a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, a 1.500 g durante 30 min a 4 °C, se determinó la radiactividad en una gammacámara. Los resultados se interpolan en una curva estándar realizada a partir de las diluciones del suero control positivo. Se establecieron las condiciones apropiadas para que la dilución de cada suero estuviera en la porción recta de la curva estándar. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. El coeficiente de variabilidad inter e intraensayo fue menor del 10%.

TABLA 1

Características clínicas y perfil inmunológico de los 5 pacientes

Paciente	1	2	3	4	5
Edad/sexo	59/M	73/M	52/M	63/M	65/V
Criterios					
1	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	-	-
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	-	+
8	+	+	+	+	+
Enfermedad autoinmune	DMID, Vitiligo	Vitiligo	-	Enfermedad de Graves	DMNID
Anticuerpos organospecíficos	+	+	+	+	+
Bandas oligoclonales de IgG	NR	-	-	-	+

Criterios: definidos en métodos. M: mujer; V: varón; DMID: diabetes mellitus insulinodependiente; DMNID: diabetes mellitus no insulinodependiente; IgG: inmunoglobulina G humana; NR: no realizado. El paciente 2 ha sido descrito previamente¹⁸, y el caso 4 publicado en forma de resumen¹⁹.

Inmunohistoquímica

Ratas Wistar se anestesiaron y perfundieron con suero salino y, posteriormente, con paraformaldehído al 4% en PBS. El cerebelo tras ser fijado con paraformaldehído, durante 4 h, fue crioprotegido con sucrosa al 20% en PBS durante una noche. Las secciones congeladas, con un espesor de 10 µm, se secaron durante 30 min, y se inhibió la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 0,3% en PBS durante 10 min. De forma consecutiva se incubaron con el suero de cabra normal al 10% durante 20 min, el suero de los pacientes (dilución 1:500) durante 3 h a 37 °C, la antiinmunoglobulina G (anti-IgG) humana biotilnada durante 30 min y el complejo avidina-biotina inmunoperoxidasa (Vector Labs., Burlingame, EE.UU.) durante 30 min. La reacción se reveló con diaminobenzidina (DAB) (Sigma, Madrid). Las diluciones de los anticuerpos se realizaron con PBS y Tritón X-100 al 0,3%.

Inmunoblot

Unos 0,16 µg de proteína de fusión GAD-65 recombinante humana parcialmente purificada (CIS Biointernational, Francia) se separaron por electroforesis en un gel del 10% de acrilamida y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa²¹. Tras el bloqueo con leche en polvo al 5% y suero de cabra normal al 10%, las tiras se incubaron con los sueros de los pacientes (dilución 1:5.000) o con el anticuerpo GAD-6 monoclonal (Hybridoma Bank, Iowa City, Iowa, EE.UU.) durante 12 h a temperatura ambiente, lavadas con PBS e incubadas con IgG biotilnada antihumana (1:2.000) o antirrator (1:100) diluidas en suero de cabra normal al 10% durante una hora. Posteriormente, las tiras se procesaron tal como se describió en la inmunohistoquímica.

Resultados

Hallazgos clínicos

La edad media de los pacientes, 4 mujeres y un varón, era de 62 años. Tres pacientes (casos 1, 2 y 3) cumplían todos los criterios, y dos (casos 4 y 5) sólo los cumplían parcialmente. En la tabla 1 están resumidas las principales características clínicas, en función de los criterios diagnósticos, y el perfil inmunológico de los 5 pacientes. Los siguientes casos ilustran las características principales de los pacientes de esta serie.

Paciente 1. Mujer de 59 años, que consultó por un cuadro de meses de evolución de rigidez muscular progresiva que afectaba inicialmente a la musculatura

dorsolumbar, y que se extendió posteriormente a la musculatura abdominal, cervical y de la extremidad superior derecha. Los estímulos externos le desencadenaban espasmos dolorosos, y éstos, al igual que la rigidez, disminuían durante el sueño. La exploración general era normal, a excepción de la presencia de vitiligo generalizado. En la exploración neurológica destacaba una muy perceptible rigidez de la musculatura dorsolumbar, abdominal y de la extremidad superior derecha. Presentaba una hiperlordosis lumbar, y durante la marcha hiperextendía el tronco. El resto de la exploración era normal. La resonancia magnética (RM) craneal y medular, así como el estudio del LCR, fue normal. El EMG, mientras la paciente permanecía en reposo, evidenció la presencia de actividad continua de unidades motoras. Sólo se determinó un tipo de anticuerpo organospecífico, los anticuerpos anticélula gástrica parietal, que fueron positivos (1/80).

El tratamiento oral con diazepam (hasta 40 mg/día) y carbamacepina (400 mg/día) mejoró, aunque parcialmente, la rigidez axial y los espasmos. Un año después apareció una diabetes mellitus, inicialmente tratada con antidiabéticos orales y, posteriormente, con insulina por mal control metabólico.

Paciente 4. Mujer de 63 años que consultó por un cuadro, de inicio insidioso, caracterizado por dificultad progresiva para la marcha, y torpeza y rigidez de la extremidad inferior derecha (EID), que le ocasionaba caídas frecuentes. Dos meses después, aparecieron episodios de espasmos dolorosos de la EID. Posteriormente, la pierna adoptó una postura anómala permanente, con dorsiflexión del pie y extensión de la pierna, que le incapacitaba para realizar las actividades de la vida diaria. Tras iniciarse tratamiento oral con diazepam, hasta un máximo de 40 mg, desaparecieron los espasmos dolorosos, mejoró la rigidez y la marcha fue posible con la ayuda de un bastón. Un año después, la paciente refirió un empeoramiento de la rigidez de la EID. Por este motivo, se le añadió tratamiento corticoide sin que se observara una respuesta clínica apreciable. Como antecedente médico, había presentado un hipertiroidismo a los 50 años, que remitió con carbimazol en un año. En la exploración neurológica destacaba una postura espontánea en abducción de la EID, con inversión medial del pie e hiperextensión de los dedos. El tono muscular era normal, y presentaba una grave rigidez a la movilización pasiva de la pierna y el pie derecho, con imposibilidad para movilizar los dedos. Ante estímulos táctiles se producían espasmos dolorosos. La marcha era inestable, cautelosa, buscando pun-

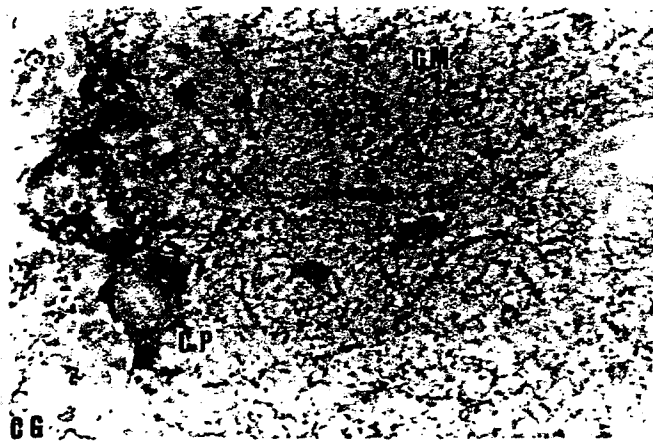


Fig. 1. Sección del cerebro de la rata incubado con el suero del paciente 1 que presenta la característica inmunorreactividad de los Ac-GAD en forma de punteado por toda la capa molecular (CM), alrededor de la célula de Purkinje (CP), y en la capa de los gránulos (CG). Contrasteido con hematoxilina, x 400.

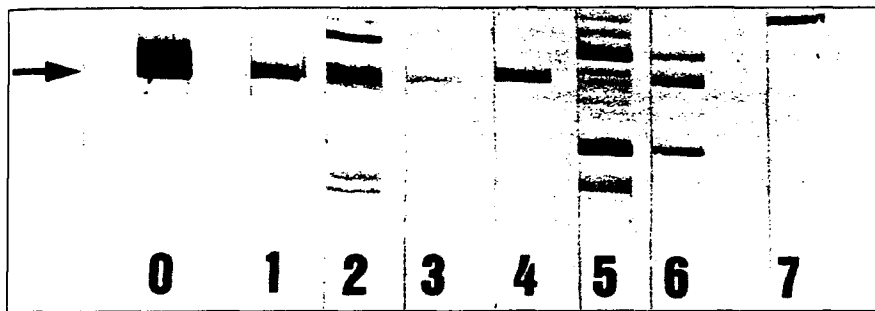


Fig. 2. Inmunoblot de proteína recombinante humana GAD-65 inmunoreaccionada con los sueros de los pacientes con SPR (tiras 1-5), LCR del paciente 5 (tira 6) y el sujeto normal (tira 7). Los sueros y el LCR de los pacientes con SPR presentan una banda positiva (flecha) que tiene la misma movilidad electrofórica que la reconocida por el anticuerpo monoclonal GAD-6 (tira 0). Las otras bandas que aparecen en las tiras son inespecíficas debido a que se usó un GAD-65 parcialmente purificado.

tos de sustentación, y se observaba el envaramiento de la EID. El resto de la exploración neurológica era normal.

La RM craneal y medular y el análisis del LCR fueron normales. El EMG, en tratamiento con diazepam oral, demostró la presencia de contracción de los músculos agonistas y antagonistas de la pierna derecha, y ausencia de actividad continua de unidades motoras con la relajación. La analítica general fue normal. Los ICA y antimicrosomales (1/400) fueron positivos, mientras que los anticuerpos antitiroglobulina y anticélula gástrica parietal fueron negativos.

Tras ser tratada con Ig por vía i.v. (0,4 g/kg/día durante 5 días) se apreció una importante disminución de la rigidez, además de normalización de la postura de la EID y mejoría de la marcha, que se ha mantenido estable con tandas adicionales bimensuales durante un año.

Paciente 5. Varón de 65 años que consultó en marzo de 1996 por desviación dolorosa del tobillo derecho, días después de sufrir una pequeña herida en el dorso de ese pie. Ante la sospecha inicial de artritis, se procedió a la corrección bajo anestesia general e inmovilización con bota de yeso. Dos semanas después consultó de nuevo por persistencia del dolor, mayor deformidad y la presencia

de espasmos dolorosos en toda la extremidad, espontáneos y desencadenados por estímulos, que llegaban a la cintura pelviana y el abdomen inferior, acompañados de síntomas vegetativos. Ante la sospecha inicial de tétanos, el paciente ingresó en la UCI. Como antecedentes médicos, destacaba la presencia de diabetes mellitus tipo II desde hacía 15 años, en tratamiento con antidiabéticos orales. La exploración física demostró una herida cicatrizada en la región intermaleolar, con el tobillo derecho deformado en equino-varo por contracción tónica irreducible del grupo posterior de la pierna y la musculatura intrínseca del pie. La rigidez afectaba a la musculatura adductora, y en menor medida a los glúteos y al grupo anteroexterno de la pierna derecha. Presentaba episodios de espasmos dolorosos que afectaban a todo el miembro inferior. El resto de la exploración era normal. Se siguió tratamiento con gammaglobulina antitetánica, vacuna antitetánica, ciclo de metronidazol i.v. y desbridamiento de la herida. Con la infusión de diazepam i.v. (hasta un máximo de 10 mg/h) los espasmos desaparecieron, y persistió la rigidez, de predominio distal, de la EID. Dada la escasa respuesta al tratamiento oral con benzodiazepinas (hasta 40 mg/día), se procedió a la infiltración de la musculatura distal de la EID

con toxina botulínica, y se estabilizó el cuadro.

La RM craneal y medular fue normal. El EMG evidenció la presencia de actividad continua de unidades motoras de distribución difusa, aunque predominante en las extremidades inferiores, a pesar de la relajación, y una polineuropatía sensitivo-motora axonal. Los siguientes anticuerpos organospecíficos fueron positivos: ICA y anticuerpos antitiroglobulina (295 U/ml) (normal: 0-68 U/ml). El estudio del LCR fue normal, excepto por la presencia de bandas oligoclonales de IgG.

A mediados de mayo, reaparecieron los espasmos dolorosos de la EID, y se instauró de forma progresiva una rigidez dolorosa de la extremidad inferior izquierda (EII), también de predominio distal, con espasmos ocasionales que llegan a afectar a la musculatura lumbar. Los espasmos mejoraron tras la perfusión continua de diazepam i.v., sin que se viera afectada la rigidez de la musculatura lumbar y de los miembros inferiores que le impedía la sedestación. Tras un periodo de estabilización, durante 2 meses, bajo diferentes pautas farmacológicas por vía oral (diazepam hasta 40 mg/día, baclofeno hasta 35 mg/día, tizanidina hasta 16 mg/día y clorpromacina hasta 150 mg/día asociada a fenitoína con un máximo de 300 mg/día), presentó un nuevo empeoramiento clínico. Tras la implantación de una bomba de infusión intratecal de baclofeno (hasta un máximo de 750 µg/día) desaparecieron los espasmos y disminuyó la rigidez, lo que permitió el movimiento espontáneo de las piernas.

Datos de laboratorio

En el estudio inmunohistoquímico, sólo el suero de cuatro de los pacientes (excepto el caso 5) y el LCR de todos ellos presentaron la tinción de las terminaciones nerviosas GABA-érgicas en las secciones del cerebelo de la rata (fig. 1). La presencia de Ac-GAD fue confirmada, mediante inmunoblot, en el suero y en el LCR de los 5 pacientes (fig. 2). Mediante RIA, el título de Ac-GAD en el suero de los 5 pacientes fue de 20.500, 67.000, 600, 31.300, y 3.225 U/ml. El título fue significativamente menor en los pacientes diabéticos (media: 48 ± 112 U/ml) ($p < 0,0001$), y en los familiares ICA-positivos (media: 170 ± 203 U/ml) ($p < 0,0001$). Los Ac-GAD fueron negativos en los pacientes con otras enfermedades neurológicas, y en los sujetos normales.

Discusión

Los tres primeros pacientes de esta serie ilustran las principales características clínicas típicas del SPR, que incluyen un inicio insidioso con aparición de rigidez

en la musculatura axial hasta afectar a la musculatura proximal de las extremidades, la característica postura hiperlordótica y los espasmos musculares dolorosos espontáneos o reflejos a los estímulos, junto a la normalidad de las funciones cognitivas y del resto de la exploración neurológica y la presencia de una actividad continua de unidades motoras en reposo en el EMG^{2,4,12}. La existencia de Ac-GAD en estos pacientes, con un cuadro clínico típico y que cumplen con los criterios diagnósticos establecidos, corrobora el valor positivo de estos anticuerpos en el diagnóstico del síndrome⁸.

Los criterios clínicos generalmente aceptados, aunque muy específicos¹³, no parecen ser suficientemente sensibles ya que no fueron cumplidos por dos de los pacientes descritos por sus características clínicas atípicas. La ausencia de afectación axial con un cuadro limitado a una extremidad, en el caso 4, es una forma de presentación que no se ha descrito previamente. En el caso 5, la característica más atípica fue su inicio agudo, su expresión clínica localizada y su relación temporal con una herida local, que motivó un diagnóstico de presunción inicial de tétanos, con un curso rápidamente progresivo y la afectación predominante, y distal, de las extremidades inferiores.

Que los 2 pacientes con sintomatología atípica forman parte del espectro clínico del SPR es sugerido por las siguientes razones: a) la coexistencia de manifestaciones clínicas y serológicas de autoinmunidad organospecífica idéntica a la que presentan el 60% de los casos de SPR típicos con Ac-GAD; b) la presencia de bandas oligoclonales en el caso 5; c) la respuesta a tratamientos que mejoran sintomáticamente el SPR, y d) un título de Ac-GAD muy elevado y significativamente superior al de los pacientes diabéticos sin afectación neurológica, y su ausencia en otras enfermedades neurológicas degenerativas o inflamatorias. Precisamente, es este conjunto de características asociadas al SPR el que ha sugerido la hipótesis autoinmune de su patogenia⁸.

En el paciente 5 concurre otro hallazgo de interés no descrito previamente, la negatividad de los Ac-GAD en el suero mediante inmunohistoquímica y su positividad en el LCR. La inmunohistoquímica fue la técnica utilizada por Solimena et al⁶ cuando describieron que el 60% de los pacientes con SPR presentaban Ac-GAD. No obstante, el estudio del LCR sólo se realizó en el 70% de los pacientes de esa serie⁶. Nuestro hallazgo sugiere que es posible la existencia de falsos negativos si sólo es estudiado el suero por esta técnica y, por tanto, que el porcentaje de pacientes con SPR y Ac-GAD puede ser mayor que el descrito. No parece probable que nuestro hallazgo esté rela-

cionado con una menor sensibilidad para detectar Ac-GAD, pues la utilización de la técnica de avidina-biotina inmunoperoxidasa en nuestro estudio inmunohistoquímico mejora la sensibilidad de la técnica de inmunofluorescencia sin disminuir su especificidad¹⁴.

Que los 5 sueros fueran, en cambio, positivos por RIA, una técnica más sensible que la inmunohistoquímica, refuerza la idea de que el número de pacientes con SPR seronegativos puede ser menor que el descrito, y concuerda con que alguno de estos pacientes «idiopáticos» también responde a la misma terapia inmunodepresora¹⁵. Nuevos estudios con un número mayor de enfermos que cumplan criterios de SPR son necesarios para ver si la frecuencia de pacientes anti-GAD negativos evaluados por este método es realmente inferior.

A su vez, si el RIA es la técnica empleada en la determinación de estos anticuerpos, ha de considerarse que los pacientes con DMID también presentan Ac-GAD, aunque a títulos inferiores, lo que hace necesario que cada laboratorio estandarice la técnica con sus propios controles para conocer el intervalo de valores de referencia de los pacientes con DMID con el fin de orientar, al clínico, el significado de esa determinación. Por ejemplo, un cuadro neurológico inespecífico en un paciente diabético no será atribuido a la presencia de Ac-GAD a títulos bajos que pueden ser reflejo de su propia diabetes. Actualmente, no existe un consenso sobre el método ideal de determinación de Ac-GAD¹⁶. El empleo de una técnica complementaria como el inmunoblot puede añadir seguridad al valor de los Ac-GAD en un paciente con sospecha de SPR. Así, el suero de los pacientes con SPR reacciona con el GAD en el inmunoblot por presentar anticuerpos dirigidos contra epitopos, fundamentalmente, lineales que son capaces de reconocer al GAD desnaturalizado, mientras que en los diabéticos por ser conformacionales raramente lo hacen¹⁷.

Este estudio sugiere que el espectro clínico del SPR puede ser más amplio que el establecido por los criterios diagnósticos actuales. Los Ac-GAD resultan útiles para el diagnóstico del SPR y su aportación puede ser decisiva en la identificación de aquellos cuadros atípicos que no podrían ser diagnosticados con seguridad con los criterios en curso.

Agradecimiento

Quisiéramos expresar nuestro agradecimiento a Mercè Bonastre, Eva Sánchez y Rosa Pagés por su inestimable ayuda técnica y a los Dres. R. Gomis y C. Rodríguez por sus comentarios sobre el manuscrito. El anticuerpo monoclonal GAD-6 fue proporcionado por Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, Iowa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Moersch FP, Woltman HW. Progressive fluctuating muscular rigidity and spasms (stiff-man syndrome): report of a case and some observations in 13 other cases. *Mayo Clin Proc* 1956; 31: 421-427.
- Gordon EE, Januszko DM, Kaufman L. A critical survey of stiff-man syndrome. *Am J Med* 1967; 42: 582-599.
- Meinck HM, Ricker K, Conrad B. The stiff-man syndrome: new pathophysiological aspects from abnormal exteroceptive reflexes and the response to clomipramine, clonidine and tizanidine. *J Neuroi Neurosurg Psychiatry* 1984; 47: 280-287.
- Lorish TR, Thorsteinsson G. Stiff-man syndrome update. *Mayo Clin Proc* 1989; 64: 629-636.
- Solimena M, Folli F, Denis-Donini S, Comi GC, Pozza G, De Camilli P et al. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy and type I diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1988; 318: 1.012-1.020.
- Solimena M, Folli F, Aparisi R, Pozza G, De Camilli P. Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. *N Engl J Med* 1990; 322: 1.555-1.560.
- Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Rietz A, Solimena M, Cascaho M et al. Identification of the 64 kD autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature (Lond)* 1990; 347: 151-156.
- Solimena M, De Camilli P. Autoimmunity to glutamic acid decarboxylase (GAD) in stiff-man syndrome and insulin-dependent diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 1991; 14: 452-457.
- Henningsen P, Clement U, Küchenhoff J, Simon F, Meinck HM. Psychological factors in the diagnosis and pathogenesis of stiff-man syndrome. *Neurology* 1996; 47: 38-42.
- Lüther F, Woltanski KP, Mauch L, Haubruck H, Kohnert KD, Rjasanowski I et al. Detection of autoantibodies to the 65 kD isoform of glutamate decarboxylase by radioimmunoassay. *Eur J Endocrinol* 1994; 130: 575-580.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4.350-4.354.
- Reñé R, Vila-Duplá MJ, Tortosa A, Ricart C, Montero J, Martínez-Matos JA. Síndrome del hombre rígido (síndrome de Moersch y Woltman). Aportación de dos casos. *Neurología* 1990; 5: 284-287.
- Kim J, Namchuck M, Bugawan T, Fu Q, Jaffe M, Shi Y et al. Higher autoantibody levels and recognition of a linear NH2-terminal epitope in the autoantigen GAD 65, distinguish stiff-man syndrome from insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1994; 180: 595-606.
- Van Noorden S, Polak JM. Immunocytochemistry today techniques and practice. En: Polak JM, Van Noorden S, editores. *Immunocytochemistry practical application in pathology and biology*. Bristol: Wright, 1983; 11-42.
- Karlson EW, Sudarsky L, Ruderman E, Pierson S, Scott M, Helfgott SM. Treatment of stiff-man syndrome with intravenous immune globulin. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 915-918.
- Schmidli RS, Colman PG, Bonifacio E, and Participating Laboratories. Disease sensitivity and specificity of 52 assays for glutamic acid decarboxylase antibodies. The second international GADAb workshop. *Diabetes* 1995; 44: 636-640.
- Ellis TM, Atkinson MA. The clinical significance of an autoimmune response against glutamic acid decarboxylase. *Nature Med* 1996; 2: 148-153.
- Requena I, Arias M, Pardo J, Portela M, Álvarez JA. Síndromes de actividad muscular continua: presentación de un caso central (stiff-man) y uno periférico (neuromiotonía) asociado a neuroborreliosis. *Rev Neurol (Barc)* 1995; 23: 129-133.
- Saiz A, Valdeoriola F, Pastor P, Obach V, Tolosa E, Graus F. Utilidad diagnóstica de los anticuerpos anti-GAD en un caso de síndrome de persona rígida (SPR) de presentación atípica. *Neurología* 1995; 10: 469.

TRABAJO 3: El síndrome de la pierna-rígida, una forma focal del síndrome de la persona-rígida

Stiff-Leg Syndrome: A Focal Form of Stiff-Man Syndrome

Albert Saiz, MD, Francesc Graus, MD,
Francesc Valldeoriola, MD, Josep Valls-Solé, MD,
and Eduardo Tolosa, MD

We report on 2 patients who presented stiffness and spasms similar to those of stiff-man syndrome (SMS) that were limited to one leg for up to 11 years. Patients had serum glutamic acid decarboxylase (GAD) autoantibodies in high titer, clinical evidence of organ-specific autoimmunity, and electromyographic pattern of continuous motor unit activity with abnormally enhanced exteroceptive reflexes. The clinical and immunological profile suggests that this disorder may be a focal form of SMS.

Saiz A, Graus F, Valldeoriola F, Valls-Solé J,
Tolosa E. Stiff-leg syndrome: a focal
form of stiff-man syndrome.
Ann Neurol 1998;43:400–403

The stiff-man syndrome (SMS) is a rare neurological disorder characterized by progressive muscular rigidity

From the Service of Neurology, Department of Medicine, Hospital Clínic i Provincial, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Received Jun 24, 1997. Accepted for publication Oct 29, 1997.

Address correspondence to Dr Graus, Neurology Service, Hospital Clínic i Provincial, Villarroel 170, E-08036 Barcelona, Spain.

predominantly of the trunk muscles with superimposed spasms. Up to 60% of patients with SMS harbor glutamic acid decarboxylase autoantibodies (GAD-Ab) in the serum and cerebrospinal fluid (CSF).¹ The diagnosis of SMS is based on clinical and neurophysiological criteria.² The limitation of this diagnostic approach is that patients who present with atypical features or never develop the full-blown clinical syndrome cannot be diagnosed as having SMS. This limitation is confirmed in other neurological disorders in which the discovery of a biological marker has expanded the clinical spectrum of the disease.³

The current criteria made impossible to diagnose as SMS four recently published cases of patients who had stiffness and painful spasms confined for years to one or both lower limbs without involvement of the trunk muscles. Two patients had clinical or serological evidence of organ-specific autoimmunity, but none had GAD-Ab. The authors coined the term *stiff-leg syndrome* to define the neurological dysfunction of their patients.⁴

We report on 2 patients with stiffness and spasms limited to one leg who presented with GAD-Ab, further evidence that this focal disorder may be related to SMS.

Patients and Methods

Electrophysiology Recording

Conventional needle electromyography was performed in the lumbar paraspinal muscles, quadriceps, tibialis anterior, and gastrocnemius medialis muscles of both sides. Spinal motoneuron excitability was examined with exteroceptive stimuli. Several trains of five electrical stimuli, separated by 50 msec and repeated about every 30 seconds, were applied to the posterior tibial, supraorbital, and median nerves. Responses were recorded simultaneously in the biceps femoris and tibialis anterior muscles at rest.

Immunological Testing

GAD-Ab was assessed by radioimmunoassay and immunohistochemistry and confirmed by immunoblot as previously described.⁵ We compared the GAD-Ab levels of the 2 patients with those of (1) 4 patients with diagnosis of SMS, according to accepted criteria²; (2) 77 patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM); (3) 322 patients with other neurological disorders; and (4) 91 healthy blood donors with no family history of IDDM.

Patient 1

A 63-year-old woman noticed rigidity of the right leg with progressive gait instability in October 1991. Two months later, she developed episodes of sudden, painful spasms involving dorsiflexion and inversion of her right foot with extension of the leg. Her symptoms progressed, leading to a persistent abnormal posture of the leg with considerable difficulty in walking. Treatment with diazepam provided relief of the spasms, but the gait disturbance persisted. Past medical history was significant for hyperthyroidism at 50 years of

age that reverted to normal with treatment in 1 year. On neurological examination, there was abnormal posturing, with persistent extension and abduction, of the right leg and medial inversion of the foot and hyperextension of the toes. The leg was rigid, more so distally, and movements were severely limited, with no palpable muscle tenderness. Voluntary movements of the leg and tactile stimuli often precipitated a spasm. She could only walk with assistance. Her gait was characterized by shuffling, mild widened base, and shortened stride. She admitted a fear of falling and refused to walk without the help of another person. The rest of the neurological and general examination was normal. Results of magnetic resonance imaging of the brain and spinal cord, CSF examination, and routine laboratory analysis, including thyroid hormones, were normal. The patient was treated with intravenous immune globulin (IVIg) (400 mg/kg/day for 5 days). The rigidity improved with almost normalization in her abnormal posture within a few days. Improvement has been maintained for 2 years with bimonthly 1-day courses of IVIg, but she still needs a cane to walk in the street.

Patient 2

A 56-year-old woman was referred for evaluation of a progressive gait disorder that started 11 years ago when she noticed occasional episodes in which the right leg suddenly became stiff, usually when the patient attempted to cross the street or was forced to walk in a hurry. The episodes became more frequent and provoked unexpected falls. She was diagnosed as having agoraphobic anxiety neurosis and treated with benzodiazepines with partial relief of her spasms. Over the ensuing 6 years, her symptoms progressed slowly, leading to permanent stiffness of the right leg, with abnormal posture and increased gait disturbance. Past medical history was significant for epilepsy diagnosed in childhood and IDDM discovered at 52 years of age. General examination was normal. On neurological examination there was abnormal posturing of the right leg, with knee extension, ankle plantarflexion, and inversion of the foot. The leg was rigid, with limitation of the movements of the foot. Voluntary movement of the leg and tactile stimuli occasionally precipitated a spasm. The gait was slow and very cautious, searching for points of support. She walked only with assistance on short steps, with a mildly widened base and stiffness of the right leg. Results of magnetic resonance imaging of the brain and spinal cord, CSF analysis, and routine laboratory analysis, including thyroid hormones, were normal.

Results

Electrophysiological Findings

The results were essentially identical in both patients. Needle electromyography disclosed continuous firing of action potentials restricted to the tibialis anterior muscle of the affected leg after needle insertion, at a frequency of 9 to 10 Hz. Action potential firing briefly stopped with repeated requests for complete relaxation but reappeared after a brief period of rest. In addition, there were a few fibrillation potentials in the tibialis anterior of the affected leg and lumbar paraspinal muscles.

Long latency reflex responses of the tibialis anterior

and biceps muscles were abnormally persistent, showing less habituation in the affected leg after repeated stimulation of the posterior tibial, supraorbital, and median nerves in both patients.

Immunological Findings

The serum and CSF of the 2 patients recognized a band in immunoblots of GAD65 recombinant protein with the same electrophoretic mobility as that identified by the serum of patients with SMS. By radioimmunoassay, the serum levels of GAD-Ab (33,300 U/ml, 42,000 U/ml) were similar to those of patients with SMS (mean, 23,250 U/ml; range, 600–67,000 U/ml) but significantly higher than in patients with IDDM (mean, 44.7 ± 106 U/ml) ($p < 0.0001$). GAD-Ab titers in the CSF were 27 and 74 U/ml. None of the patients with other neurological disorders and normal subjects had GAD-Ab. In the immunohistochemistry studies, the serum and CSF samples of the 2 patients immunoreacted with GABA-ergic nerve terminals of rat cerebellar and pancreatic β cells of human pancreas. Patient 1 also had thyroid microsomal, thyroglobulin, and gastric parietal cell antibodies. CSF IgG oligoclonal bands, anti-amphiphysin,⁶ and anti-Hu, Yo, or Ri autoantibodies⁷ were not observed.

Discussion

We describe 2 patients with a similar clinical picture, characterized by insidious onset of rigidity, spasms, and abnormal posture of one leg that did not spread to the other limb or trunk despite the presence of symptoms for up to 11 years. The electromyographic examination disclosed continuous motor unit activity and abnormally enhanced exteroceptive reflexes suggesting disinhibition of the spinal motoneurons. Both patients had high-titer GAD-Ab, a useful marker of SMS in the setting of appropriate clinical and electrophysiological features.⁸

GAD-Ab are also reported in a few patients with other neurological disorders, particularly cerebellar ataxia.^{5,9–12} Therefore, the finding of GAD-Ab by itself does not absolutely mean our patients' syndrome represents a particular clinical expression of SMS. However, we favor the possibility of a focal form of SMS based on the following reasons:

1. The clinical and electrophysiological profile is similar to that described in SMS except for the confinement of symptoms to one leg.^{13,14} Initial involvement of the distal muscles of one leg, mimicking a focal dystonia, is occasionally reported in patients who later develop SMS.¹⁵

2. The fear to walk unaided and the gait disturbance was more severe than expected from the leg stiffness. This discrepancy led to the initial misdiagnosis of agoraphobic anxiety neurosis, a feature frequently reported in SMS.¹⁶
3. The association with high-titers of GAD-Ab and clinical evidence of organ-specific autoimmunity is a common feature of patients with SMS. In addition, Patient 2 had epilepsy, which is also reported in 10% of patients with SMS.¹
4. Other disorders were reasonably excluded. The chronic evolution and the absence of brainstem signs does not support the diagnosis of progressive encephalomyelitis with rigidity,¹⁷ a disorder caused by widespread inflammatory infiltrates and neuronal loss more important in the spinal cord that causes a subacute downhill clinical course. Roobol and co-workers¹⁸ described a patient with subacute onset of rigidity and painful spasms confined to one leg who subsequently developed a small cell lung cancer. In our patients, the absence of cancer after more than 3 years rules out the possible paraneoplastic origin of the symptoms.

Conclusion

Our findings suggest that the clinical spectrum of SMS may be more extensive than expected and reinforces the need to redefine the SMS diagnostic criteria. We propose the term *focal SMS* for those patients who fulfill the diagnostic criteria of SMS except for the distribution of the affected muscles that are restricted to one limb. Detection of GAD-Ab strongly supports the diagnosis of these focal forms.

Dr Saiz is a recipient of a post-residency grant from the Hospital Clínic.

We thank Mercè Bonastre, Eva Sánchez, Rosa Pagés, and Dr Roser Casamitjana for their technical assistance.

References

1. Solimena M, De Camilli P. Autoimmunity to glutamic acid decarboxylase (GAD) in stiff-man syndrome and insulin-dependent diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 1991;14:452–457
2. Lorish TR, Thorsteinsson G, Howard FM. Stiff-man syndrome updated. *Mayo Clin Proc* 1989;64:629–636
3. Dürr A, Cossee M, Agid Y, et al. Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N Engl J Med* 1996;335:1169–1175
4. Brown P, Rothwell JC, Marsden CD. The stiff leg syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62:31–37
5. Saiz A, Arpa J, Sagasta A, et al. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in three patients with cerebellar ataxia, late-onset insulin-dependent diabetes mellitus, and polyendocrine autoimmunity. *Neurology* 1977;49:1026–1030
6. De Camilli P, Thomas A, Cofield R, et al. The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of

stiff-man syndrome with breast cancer. *J Exp Med* 1993;178:2219-2223

7. Dalmau J, Posner JB. Neurologic paraneoplastic antibodies (anti-Yo, anti-Hu, anti-Ri): the case for a nomenclature based on antibody and antigen specificity. *Neurology* 1994;44:2241-2246
8. Kim J, Namchuk M, Bugawan T, et al. Higher autoantibody levels and recognition of a linear NH₂-terminal epitope in the autoantigen GAD65 distinguish stiff-man syndrome from insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1994;180:595-606
9. Solimena M, Folli F, Aparisi R, et al. Autoantibodies to GABAergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. *N Engl J Med* 1990;322:1555-1560
10. Grimaldi LME, Martino G, Braghi S, et al. Heterogeneity of autoantibodies in stiff-man syndrome. *Ann Neurol* 1993;34:57-64
11. Honnorat J, Trouillas P, Thivolet C, et al. Autoantibodies to glutamate decarboxylase in a patient with cerebellar cortical atrophy, peripheral neuropathy and slow eye movements. *Arch Neurol* 1995;52:462-468
12. Nemni R, Braghi S, Natali-Sora MG, et al. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in palatal myoclonus and epilepsy. *Ann Neurol* 1994;36:665-667
13. McEvoy KM. Stiff-man syndrome. *Mayo Clin Proc* 1991;66:300-304
14. Meinck HM, Ricker K, Hülser PJ, et al. Stiff-man syndrome: clinical and laboratory findings in eight patients. *J Neurol* 1994;241:157-166
15. Jankovic J, Fahn S. Dystonic disorders. In: Jankovic J, Tolosa E, eds. *Parkinson's disease and movement disorders*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993:337-374
16. Henningsen P, Clement U, Küchenhoff J, et al. Psychological factors in the diagnosis and pathogenesis of stiff-man syndrome. *Neurology* 1996;47:38-42
17. Whiteley AM, Swash M, Urich H. Progressive encephalomyelitis with rigidity: its relation to "subacute myoclonal spinal neuronitis" and to the "stiff-man syndrome." *Brain* 1976;99:27-42
18. Roobol TH, Kazzaz BA, Vecht CH. Segmental rigidity and spinal myoclonus as a paraneoplastic syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987;50:628-631

**TRABAJO 4: Síndrome de la persona-rígida (stiff-man syndrome): un espectro
clínico y patológico más amplio de lo esperado**

SINDROME DE LA PERSONA-RIGIDA (STIFF-MAN SYNDROME): UN ESPECTRO CLINICO Y PATOLOGICO MAS AMPLIO DE LO ESPERADO

Albert Saiz (Manuscrito en preparación)

Introducción

El síndrome de la persona-rígida (SPR) es un infrecuente trastorno neurológico caracterizado por rigidez muscular progresiva, de predominio axial, con espasmos sobreimpuestos.^{1,2} Fisiopatológicamente se cree que es el resultado de un desequilibrio entre las vías excitatorias catecolaminérgicas e inhibitorias GABA-érgicas que controlan la actividad de las neuronas motoras alfa de la médula espinal.³

El diagnóstico del síndrome se establece mediante criterios clínicos y electrofisiológicos.⁴ Una entidad con características clínicas similares al SPR es la encefalomiелitis progresiva con rigidez (EMPR). Esta se caracteriza por un curso más rápido, la afectación de pares craneales, signos medulares segmentarios y de vías largas, la alteración del líquido ceforraquídeo, y la presencia de infiltrados linfocitarios perivasculares.^{5,6} Recientemente hemos descrito que el síndrome de la pierna-rígida puede ser una forma focal de SPR.⁷ En este trabajo presentamos un paciente con un cuadro clínico atípico de SPR en su inicio, que desarrolla el cuadro característico en su evolución pero con un curso rápidamente progresivo similar al observado en la encefalomiелitis progresiva con rigidez. No obstante, el paciente presentaba anticuerpos anti-glutamato decarboxilasa (Ac-GAD) en el suero y líquido ceforraquídeo, y el estudio patológico no demostró la presencia de infiltrados inflamatorios. Este

caso sugiere de nuevo que el espectro clínico del SPR puede ser más amplio del esperado y refuerza la necesidad de redefinir los criterios diagnósticos del SPR.

Caso clínico

Varón de 65 años, que consultó en Marzo de 1996 por desviación dolorosa del tobillo derecho, días después de sufrir una pequeña herida en el dorso de ese pie. Ante la sospecha inicial de artritis, se procedió a la corrección bajo anestesia general e inmovilización con bota de yeso. Dos semanas después consultó de nuevo por persistencia del dolor, y la presencia de espasmos dolorosos que afectaban a toda la extremidad y llegaban a deformar la escayola. Los espasmos eran tanto espontáneos como desencadenados por estímulos que llegaban hasta la cintura pelviana y abdomen inferior, acompañados de síntomas vegetativos. Ante la sospecha inicial de tétanos, el paciente fue ingresado en UCI. Como antecedentes médicos destacaba la presencia de diabetes mellitus tipo II desde hacía 15 años, en tratamiento con antidiabéticos orales, y había recibido la vacuna antitetánica anualmente los últimos 3 años. La exploración física mostró una herida cicatrizada en dorso del pie derecho, el tobillo deformado en equino-varo por contracción tónica irreductible del grupo posterior de la pierna y musculatura intrínseca del pie. La rigidez afectaba a musculatura adductora, y en menor medida a glúteos y grupo anteroexterno de la pierna derecha. Presentaba episodios de espasmos dolorosos que afectaban a todo el miembro inferior. El resto de la exploración era normal. Se siguió tratamiento con gammaglobulina antitetánica, vacuna

antitetánica, y ciclo de metronidazol endovenoso (ev) con desbridamiento de la herida. Con la infusión de diazepam ev (hasta un máximo de 10 mg/hora) los espasmos desaparecieron, persistiendo la rigidez, de predominio distal, de esa extremidad. Dada la escasa respuesta al tratamiento oral con benzodiazepinas (hasta 40 mg/día), se procedió a la infiltración de la musculatura distal con toxina botulínica, estabilizándose el cuadro.

La RM craneal y medular fueron normales. El EMG evidenció la presencia de actividad continua de unidades motoras de distribución difusa, aunque predominante en las extremidades inferiores, el periodo de silencio eléctrico en tibiales anteriores presente, y una polineuropatía sensitivo-motora axonal. En el estudio inmunohistoquímico, el líquido cefalorraquídeo (LCR), pero no el suero, inmunorreaccionaba con las terminaciones nerviosas gaba-érgicas en las secciones de cerebelo de rata (título 1/10). Mediante radioinmunoensayo el título de Ac-GAD era de 3.225 U/ml en suero, y 272 U/ml en el LCR. La presencia de Ac-GAD se confirmó, tanto en suero como en el LCR, mediante inmunoblot.⁸ Los anticuerpos anti-islole pancreático y anti-tiroglobulina fueron positivos. El estudio de LCR fue normal excepto por la presencia de bandas oligoclonales de IgG.

A mediados de Mayo, reaparecieron los espasmos dolorosos de la extremidad, y se instauró de forma progresiva una rigidez dolorosa de la otra extremidad inferior, también de predominio distal, con espasmos ocasionales que llegaban a interesar a la musculatura lumbar. Los espasmos mejoraron tras la perfusión de diazepam ev, sin que se viera afectada la rigidez de la musculatura lumbar y de los miembros inferiores que le impedían la

sedestación. Tras un periodo de estabilización, durante 2 meses, bajo diferentes pautas farmacológicas por vía oral (diazepam hasta 40 mg/día, baclofeno hasta 35 mg/día, tizanidina hasta 16 mg/día, clorpromacina hasta 150 mg/día asociada a fenitoína con un máximo de 300 mg/día), presentó un nuevo empeoramiento clínico. Tras la implantación de una bomba intratecal de baclofeno (hasta un máximo de 750 mcg/día) desaparecieron los espasmos y disminuyó la rigidez, permitiendo el movimiento espontáneo de las piernas. Un curso de inmunoglobulinas ev durante 5 días no modificó el cuadro clínico. En Noviembre de 1996 reingresó por incremento de la rigidez y de los espasmos dolorosos que mejoraron levemente tras incrementar la dosis de baclofeno. Nueve días después del ingreso, aparecieron paroxismos intensos de espasmos asociados a disnea precisando de ingreso en UCI. El paciente fallece 5 días después por un cuadro séptico de origen respiratorio.

La autopsia general sólo puso de manifiesto una bronconeumonía aspirativa. El examen macroscópico del encéfalo y médula espinal era normal. El examen microscópico del encéfalo no mostró alteraciones significativas. La médula espinal, fundamentalmente a nivel lumbar, mostraba pérdida neuronal moderada que afectaba a neuronas grandes y pequeñas del asta anterior, y la presencia de neuronas vacuoladas. Proliferación astrogliar y microglial en asta anterior, y ausencia de infiltrados linfocitarios perivasculares (Figura).

Discusión

El caso que se presenta es atípico para un SPR en varios aspectos: 1) su inicio agudo y expresión clínica localizada, afectación limitada a la musculatura distal de una extremidad inferior; y 2) un curso rápidamente progresivo, 1 mes, hasta el desarrollo del cuadro clínico completo. Unas manifestaciones iniciales que por su relación temporal con una herida local motivaron un diagnóstico inicial de tétanos, y que posteriormente por su rápido curso clínico sugirieron una encefalomiелitis progresiva con rigidez (EMPR). Características, en cualquier caso, incompatibles con el diagnóstico de SPR siguiendo los criterios establecidos.⁴ A pesar de ello, pensamos que el cuadro clínico del paciente podía formar parte del espectro del SPR por las siguientes razones: 1) unas manifestaciones clínicas características, una vez instaurado el cuadro completo, y la ausencia de signos troncoencefálicos, alteración de vías largas, y la normalidad del LCR; 2) un EMG característico, y la normalidad del periodo de silencio eléctrico, dato este último que lo diferencia del tétanos;⁹ 3) la presencia de Ac-GAD en suero y LCR, y la coexistencia de manifestaciones clínicas y serológicas de autoinmunidad organo-específica; y 4) la presencia de bandas oligoclonales de IgG en el LCR.

En este caso además concurría otro hallazgo de interés no descrito previamente, la negatividad de los Ac-GAD en el suero mediante inmunohistoquímica y su positividad en el LCR. La inmunohistoquímica, fue la técnica descrita por Solimena et al¹⁰ cuando describieron que el 60% de los pacientes con SPR presentaban Ac-GAD. No obstante, el estudio de LCR sólo se realizó en el 70% de los pacientes de esa serie. Un dato que sugiere la posible

existencia de falsos negativos si sólo es estudiado el suero por esta técnica. La utilización de una técnica más sensible como el RIA puede obviar este problema.¹¹ Sin embargo, cuando el paciente es diabético, como en este caso, un título bajo de Ac-GAD en el suero podría ser atribuido a su diabetes, pero no su presencia a título alto en el LCR.

Que la duración de la enfermedad fuera tan corta, 8 meses hasta su fallecimiento, es algo que también es atípico para un SPR y podría seguir sugiriendo una EMPR. No obstante en el SPR, como en la EMPR, también se ha descrito muerte súbita asociada a una disfunción autonómica aguda que para algunos autores están desencadenadas por los graves espasmos, mientras que para otros son secundarias a una disfunción hipotalámica inmuno-mediada.^{5,12-16} El estudio necrótico, sin embargo, descartó la presencia de los infiltrados linfocitarios perivasculares característicos de la EMPR que también se han descrito de forma ocasional en el SPR (1 de los pacientes con Ac-GAD).^{12,13} Es más, en un caso con un cuadro clínico característico de SPR, la presencia de ese infiltrado fue el que llevó al diagnóstico de EMPR.¹⁵ Los casos autopsicos de pacientes con SPR son escasos y en general no han mostrado alteraciones significativas, si bien en la mayoría los estudios histoquímicos son incompletos, o no son especificados.^{1,1,17-19} En la Tabla 1 y 2 se resumen las principales características de los pacientes con SPR y EMPR con estudios neuropatológicos detallados, incluyendo la neuronitis espinal mioclónica subaguda²⁰ que probablemente sea una forma relacionada con la última. Los cambios degenerativos de las neuronas del asta anterior, y la gliosis son los hallazgos más prominentes en el SPR, mientras que la pérdida neuronal,

gliosis, y aumento en la actividad microglial, como en nuestro caso, junto con la infiltración inflamatoria lo son en el EMPR (Tabla 2). En el caso que presentamos hay un hallazgo que no se ha descrito previamente, la presencia de vacuolas en las motoneuronas preservadas. Este hallazgo podría ser consecuencia de la hiperactividad de estas motoneuronas relacionadas con la desinhibición de las interneuronas espinales. Destrucción de interneuronas que ha sido demostrada en otros casos⁶ y que desafortunadamente no se ha podido documentar en este caso por la mala preservación del tejido. No obstante, la afectación limitada a la médula y de forma predominante a los segmentos lumbosacros concuerda con la clínica del paciente, y permite considerar que el cuadro clínico es algo más que un mero trastorno funcional, tal como se ha sugerido en el SPR.⁹ Además, la presencia de un título elevado de Ac-GAD en el LCR, y superior al del suero, y la presencia de bandas oligoclonales en el LCR, sugiere la existencia de un proceso inmuno-mediado. La ausencia del infiltrado inflamatorio perivascular, algo que también se ha visto en algunos casos de encefalomiелitis paraneoplásica tal vez como un estadio final, podría estar en este caso relacionado con el tratamiento previo mediante inmunoglobulinas. En cualquier caso, que algunos pacientes con EMPR presenten Ac-GAD,^{16,26} y que pacientes con SPR asociados o no a Ac-GAD presenten los hallazgos inflamatorios característicos de la encefalomiелitis^{12,13} sugiere, tal como propusieron Kasperek y Zebrowski,²⁴ que en algunos casos de SPR y EMPR subyace el mismo proceso patológico. De todos modos, el caso presente refuerza la importancia de definir claramente el espectro clínico del SPR.

Bibliografía

1. Moersch FP, Woltman HW. Progressive fluctuating muscular rigidity and spasms ("stiff-man" syndrome): report of a case and some observations in 13 other cases. *Mayo Clin Proc* 1956;31:421-427.
2. Gordon EE, Januszko DM, Kaufman L. A critical survey of stiff-man syndrome. *Am J Med* 1967;42:582-599.
3. Meinck HM, Ricker K, Conrad B. The stiff-man syndrome: new pathophysiological aspects from abnormal exteroceptive reflexes and the response to clomipramine, clonidine and tizanidine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1984;47:280-287.
4. Lorish TR, Thorsteinsson G. Stiff-man syndrome update. *Mayo Clin Proc* 1989;64:629-636.
5. Whiteley AM, Swash M, Urich H. Progressive encephalomyelitis with rigidity. *Brain* 1976;99:27-42.
6. Howell DA, Lees AJ, Toghil PJ. Spinal internuncial neurones in progressive encephalomyelitis with rigidity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1979;42:773-785.
7. Saiz A, Graus F, Valldeoriola F, Valls-Solé J, Tolosa E. Stiff-leg syndrome: a focal form of stiff-man syndrome. *Ann Neurol* 1998 (En prensa).
8. Saiz A, Arpa J, Sagasta A, Casamitjana R, Zarranz JJ, Tolosa E, Graus F. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in three patients with cerebellar ataxia, late-onset insulin-dependent diabetes mellitus, and polyendocrine autoimmunity. *Neurology* 1997;49:1026-1030.
9. Thompson PD. Stiff people. En: Marsden CD, Fahn S, editores. *Movement*

Disorders 3. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1994;373-405.

10. Solimena M, Folli F, Aparisi R, Pozza G, De Camilli P. Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. *N Engl J Med* 1990;322:1555.

11. Meinck HM, Maile S, Faber L, et al. Autoantibodies against glutamic acid decarboxylase 65 in stiff-man syndrome and in other neurological disease-sensitivity and specificity of a novel radioligand assay. *Europ Neurol* 1996;3(Suppl.5):72 (Abstract).

12. Mitsumoto H, Schwartzman MJ, Estes ML, Chou SM, La Franchise EF, De Camilli P, Solimena M. Sudden death and paroxysmal autonomic dysfunction in stiff-man syndrome. *J Neurol* 1991;238:91-96.

13. Meinck HM, Ricker K, Hülser PJ, Schmid E, Peiffer J, Solimena M. Stiff-man syndrome: clinical and laboratory findings in eight patients. *J Neurol* 1994;241:157-166.

14. Goetz CG, Klawans HL. On the mechanism of sudden death in Moersch-Woltman syndrome. *Neurology* 1983;33:930-932.

15. Armon C, Swanson JW, McLean JM, et al. Subacute encephalomyelitis presenting as stiff-person syndrome: clinical, polygraphic, and pathologic correlations. *Movement disorders* 1996;11:701-709.

16. Stayer C, Tronnier V, Dressnandt J, et al. Intrathecal baclofen therapy for stiff-man syndrome and progressive encephalomyelopathy with rigidity and myoclonus. *Neurology* 1997;49:1591-1597.

17. Asher R. A woman with stiff-man syndrome. *Br Med J* 1958;I:265-266.

18. Cohen L. Stiff-man syndrome: two patients treated with diazepam. *JAMA* 1966;195:222-224.
19. Maccario M, Blaugh JR, Mena H. Sudden death in Moersch-Wotlman syndrome. *Neurology* 1984;34:407.
20. Campbell AMG, Garland H. Subacute myoclonic spinal neuronitis. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1956;19:268-274.
21. Trethowan WH, Allsop JL, Turner B. The stiff-man syndrome: a report of two further cases. *Arch Neurol* 1960;3:448-456.
22. Martinelli P, Pazzaglia P, Montagna P, Coccagna G, Rizzuto N, Simonati S, Lugaresi E. Stiff-man syndrome associated with nocturnal myoclonus and epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1978;41:458-462.
23. Nakamura N, Fujiya S, Yahara O, Fujioka Y, Kawakami Y. Stiff-man syndrome with spinal cord lesion. *Clin Neuropathol* 1986;5:40-46.
24. Kasperek S, Zebrowski S. Stiff-man syndrome and encephalomyelitis: report of a case. *Arch Neurol* 1971;24:22-30.
25. Lhermitte F, Chain F, Escourelle R, Chedru F, Guilleminault C, Francoual M. Un nouveas cas de contracture tetaniforme distinct du "stiff-man syndrome". *Rev Neurol (Paris)*1973;128:3-21.
26. Burn DJ, Ball J, Lees AJ, Behan PO, Morgan-Hughes JO. A Case of progressive encephalomyelitis with rigidity and positive antiglutamic acid decarboxylase antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991;54:449-451.

Tabla 1. Información clínica de casos autópsicos de SPR y EMPR

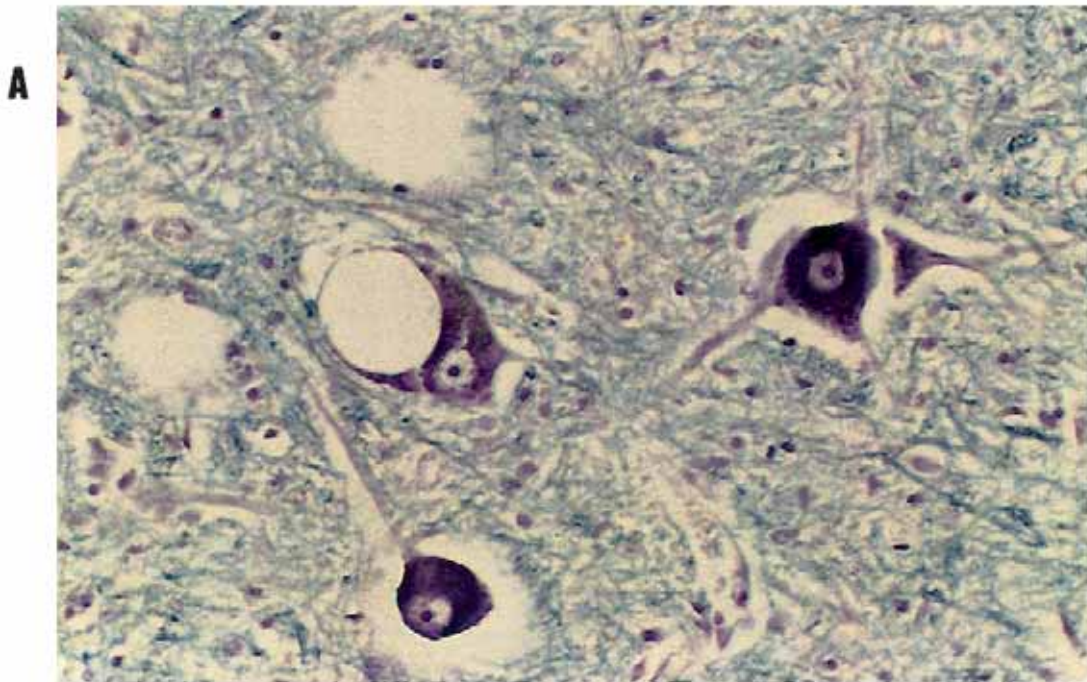
Autor	Año	Edad/Sexo	E. Autoinmune asociada	Tiempo evolución	Síntomas atípicos de SPR	Ac-GAD
<i>Síndrome de persona-rígida</i>						
Trethowan et al ²¹	1960	76 / M	No	4 años	No	NR
Martinelli et al ²²	1978	52 / H	No	10 años	No	NR
Nakamura et al ²³	1986	51 / H	?	?	?	NR
Mitsumoto et al ¹²	1991	34 / M	DMID	6 años	No	Sí
Mitsumoto et al ¹²	1991	35 / M	No	8 años	Limitación de la mirada vertical	Sí
Meinck et al ¹³	1994	27 / H	No	5 años	No	NR
<i>Encefalomiелitis</i>						
Campbell et al ²⁰	1956	30 / H	DMID	Meses	No / Fiebre	NR
Campbell et al ²⁰	1956	32 / H	No	1 mes	No / Fiebre	NR
Kasperek et al ²⁴	1971	49 / M	No	17 meses	Troncoencéfalo arreflexia	NR
Lhermitte et al ²⁵	1973	70 / H	No	38 meses	Troncoencéfalo sensibilidad profunda Babinski bilateral	NR
Whiteley et al ⁵	1976	61 / M	No	13 meses	No	NR
Whiteley et al ⁵	1976	19 / H	No	1 mes	No	NR
Howell et al ⁶	1979	56 / M	No	26 meses	Troncoencéfalo arreflexia Babinski bilateral	NR
Armon et al ¹⁵	1996	60 / M	No	2,5 años	No	NR
<i>Caso actual</i>						
Saiz A	1998	65 / H	DMNID	8 meses	No	Sí

Tabla 2. Información patológica de casos autópsicos de SPR y EMPR

Autor	Año	Infiltrados inflamatorios	Pérdida de motoneuronas	Vacuolas	Gliosis	Microglia
<i>Síndrome de persona-rígida</i>						
Trethowan et al ²¹	1960	No	No	No	Sí	No
Martinelli et al ²²	1978	No	leve C5-C6	No	No	No
Nakamura et al ²³	1986	No	Sí?	?	?	?
Mitsumoto et al ¹²	1991	No	No	No	Sí	No
Mitsumoto et al ¹²	1991	Sí (GB, TE, ME)	No	No	No	No
Meinck et al ¹³	1994	Sí (TE, ME)	Sí	No	Sí	No
<i>Encefalomiелitis</i>						
Campbell et al ²⁰	1956	Sí (ME)	No	No	Sí	Sí
Campbell et al ²⁰	1956	Sí (Bulbo, ME)	No	No	Sí	Sí
Kasperek et al ²⁴	1971	Sí (HP, TE, ME)	Sí (>C)	No	Sí	No
Lhermitte et al ²⁵	1973	Sí (pálido, TE, ME)	Sí (>C)	No	Sí	No
Whiteley et al ⁴	1976	Sí (TE, ME)	Sí	No	Sí	Sí
Whiteley et al ⁵	1976	Sí (TE, ME)	No evidente	No	Sí	Sí
Howell et al ⁶	1979	Sí (TE, ME)	Interneuronas	No	Sí	Sí
Amon et al ¹⁵	1996	Sí (Difusa)	No	No	Sí	Sí
<i>Caso actual</i>						
Saiz A	1998	No	Sí (lumbar)	Sí	Sí	Sí

SPR: síndrome de persona-rígida; EMPR: encefalomiелitis progresiva con rigidez; H: hombre; M: mujer; NR: no realizado; DMID: diabetes mellitus insulino-dependiente; DMNID: diabetes mellitus no insulino-dependiente; HP: hipocampo; GB: ganglios basales; TE: troncoencéfalo; ME: médula espinal.

Figura: Sección a nivel del asta anterior de la médula lumbar. A. Se puede observar la presencia de degeneración vacuolar de una motoneurona del asta anterior (teñido con luxol fast blue X 400). B. Detalle de una motoneurona con degeneración vacuolar (teñido con hematoxilina eosina X 600).



**TRABAJO 5: Anticuerpos anti-anfifisina en pacientes con trastornos neurológicos
paraneoplásicos diferentes del síndrome de la persona-rígida**

SHORT REPORT

Anti-amphiphysin I antibodies in patients with paraneoplastic neurological disorders associated with small cell lung carcinoma

A Saiz, J Dalmau, M Husta Butler, Q Chen, J Y Delattre, P De Camilli, F Graus

Abstract

Patients with stiff man syndrome and breast cancer develop anti-amphiphysin I antibodies that primarily recognise the C terminus of the protein. Anti-amphiphysin I antibodies have also been identified in a few patients with paraneoplastic neurological disorders (PND) and small cell lung cancer (SCLC). The frequency of anti-amphiphysin I antibodies in patients with SCLC and PND was analysed and the epitope specificity of these antibodies was characterised.

Anti-amphiphysin I antibodies were evaluated by immunohistochemistry on human and rat cerebellum and immunoblots of rat brain homogenates. Serum samples included 134 patients with PND and anti-Hu antibodies (83% had SCLC), 44 with SCLC and PND without anti-Hu-antibodies, 63 with PND and either Yo, Ri, or Tr antibodies, 146 with SCLC without PND, and 104 with non-PND. Positive serum samples were confirmed with immunoblots of recombinant human amphiphysin I and immunoreacted with five overlapping peptide fragments covering the full length of the molecule.

Serum samples positive for anti-amphiphysin I antibodies included those from seven (2.9%) patients with PND and two (1.4%) with SCLC without PND. Six of the seven anti-amphiphysin I antibody positive patients with PND had SCLC (three with Hu-antibodies), and one had anti-Hu-antibodies but no detectable tumour. The PND included encephalomyelitis/sensory neuropathy (five patients), cerebellar degeneration (one), and opsoclonus (one). All anti-amphiphysin I antibodies reacted with the C terminus of amphiphysin I, but seven also recognised other fragments of the molecule.

In conclusion, anti-amphiphysin I antibodies are present at low frequency in patients with SCLC irrespective of the presence of an associated PND. All anti-amphiphysin I antibody positive serum samples have in common reactivity with the C terminus of the protein.

(*J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;66:214-217)

Keywords: autoantibodies; amphiphysin I; paraneoplastic; small cell lung carcinoma; stiff man syndrome

Amphiphysin I, a nerve terminal protein with a putative role in endocytosis,¹ is recognised by autoantibodies present in the serum and CSF samples from female patients with paraneoplastic stiff man syndrome (SMS) and breast cancer.²⁻³ The anti-amphiphysin I antibodies of these patients predominantly react with the C terminus of the protein.^{1,4} A recent study⁵ identified anti-amphiphysin I antibodies in the serum of three patients with small cell lung carcinoma (SCLC) and paraneoplastic encephalomyelitis and sensory neuronopathy (PEM/SN), a disorder usually associated with anti-Hu-antibodies.⁶ The serum of one of these patients had anti-Hu antibodies but none of them developed typical SMS. Although this study suggested that PEM/SN in patients with SCLC may associate with several autoantibody specificities and that anti-amphiphysin I antibodies are not restricted to SMS, the frequency and specificity of these associations were not defined. A few additional cases of anti-amphiphysin I antibody positive patients with PND other than SMS associated with either breast or lung cancer were reported.⁷ To clarify these clinical-serological associations is important because these antibodies are considered good markers of specific types of paraneoplastic syndromes and tumours.

In the present study, we analysed the frequency of anti-amphiphysin I antibodies in a large series of patients with PND other than SMS, to determine whether: (1) anti-amphiphysin I antibodies are associated with a particular type of PND or tumour and (2) whether amphiphysin I autoepitopes differ in patients with different clinical syndromes.

Materials and methods

Serum samples were obtained from 241 patients with PND, 146 with SCLC without PND or anti-Hu-antibodies, and 104 with non-paraneoplastic neurological disorders usually considered in the differential diagnosis of PND (cerebellar disorders 56, sensory neuropathy 41; opsoclonus seven). Among the 241 patients with PND, 134 had PEM/SN (83%

Service of Neurology and Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain
A Saiz
F Graus

Department of Neurology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA
J Dalmau

Department of Cell Biology and Howard Hughes Medical Institute, Yale University School of Medicine, New Haven, Conn, USA
M Husta Butler
P De Camilli

Service of Neurology, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, INSERM U134, Paris, France
Q Chen
J Y Delattre

Correspondence to:
Dr Francesc Graus, Servei de Neurologia, Hospital Clínic, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. Telephone 0034 3 2272213; fax 0034 3 2275414; email graus@medicina.ub.es

Received 9 March 1998 and in revised form 3 September 1998
Accepted 11 September 1998

had SCLC), 44 had SCLC and PND without anti-Hu antibodies (paraneoplastic cerebellar degeneration 30; PEM/SN seven; opsoclonus seven), and 63 had PND and either Yo, Ri, or Tr antibodies. Serum samples were collected in three of the participant laboratories (Barcelona, Paris, and New York) and kept frozen at -70°C . Serum samples from two patients with paraneoplastic SMS and breast cancer were used as positive controls.

Immunohistochemistry on human and rat cerebellum (serum screening dilution 1:500) and immunoblot of rat brain homogenate (serum dilution 1:10 000) were done as previously described in detail.^{8,9} To make the anti-amphiphysin I antibody detection more uniform, all immunoblots were prepared in the same laboratory (Hospital Clinic, Barcelona) and nitrocellulose strips containing the same amount of immobilised antigen were sent to the other two participating laboratories (Paris and New York) that processed the strips with the same protocol.

CRITERIA FOR THE PRESENCE OF ANTI-AMPHIPHYSIN I ANTIBODIES

A serum was considered positive for anti-amphiphysin I antibodies when immunoblots of rat brain homogenate showed a reactive band of identical electrophoretic mobility (around 128 kDa) than that obtained with the positive control. All positive and seven randomly taken negative serum samples were subsequently evaluated by indirect immunofluorescence on formaldehyde fixed rat cerebellar tissue² and immunoblots of recombinant human amphiphysin I⁴ at Yale University (MHB, PDC). Serum samples were tested at dilutions of 1:4 and 1:500 for the immunofluorescence and the immunoblot experiments respectively. Clinical information was blinded from investigators performing these immunoblots.

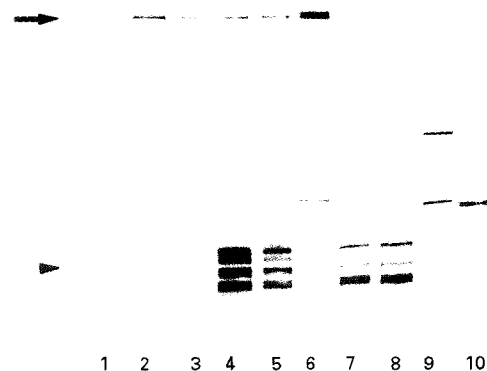
EPITOPE ANALYSIS

Glutathione S-transferase (GST) fusion proteins consisting of five overlapping fragments of amphiphysin I were prepared as described previously.⁴ The five GST fusion proteins were subjected to SDS-PAGE (10% acrylamide) and western blotting as previously described.¹⁰ Monoclonal antibodies directed to each fragment of amphiphysin I were used to identify the correct band. Positive and negative human serum samples were also used as controls.

Results

IMMUNOBLOT STUDIES

Nine serum samples immunoreacted with a band identical with that obtained with the positive control in immunoblots of rat brain homogenate (figure). In all of them, the presence of anti-amphiphysin I antibodies was confirmed in immunoblots of recombinant human amphiphysin I, whereas seven negative serum samples by the screening criteria, blindly examined with the positive ones, did not react with the recombinant protein. All nine positive samples reacted with fragment V of amphiphysin I that includes the C terminus



Immunoblots of rat brain homogenate probed with a normal human serum (lane 1), serum from paraneoplastic SMS and breast cancer with anti-amphiphysin I antibodies, as positive controls (lanes 2,3), PND and SCLC (lanes 4-8), and SCLC without PND (lanes 9-10). Three serum samples from patients with PND and SCLC (lanes 4-6) immunoreacted with a band (around 128 kDa) of the same electrophoretic mobility as that recognised by the positive anti-amphiphysin I antibody serum samples (arrow). Four serum samples also presented anti-Hu antibodies (arrowhead).

of the molecule,⁴ but the reactivity with the other four fragments of amphiphysin I was not uniform with seven samples recognising multiple fragments.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY STUDIES

None of the nine positive anti-amphiphysin I antibody serum samples could be identified by immunohistochemistry on human cerebellum. In rat cerebellar sections evaluated by the avidin-biotin immunoperoxidase technique, the presence of anti-amphiphysin I antibodies was shown in only one serum sample, which corresponded to that with the strongest immunoreactivity in immunoblots. However, when the nine serum samples were evaluated by indirect immunofluorescence using a higher concentration,² all but one gave an immunoreactive pattern compatible with anti-amphiphysin I antibodies.

CLINICAL-IMMUNOLOGICAL CORRELATION

Seven anti-amphiphysin I antibody positive patients had PND (2.9%) and two had SCLC without neurological disorders (1.4%). Six of the seven patients with PND had SCLC that was diagnosed after onset of the neurological symptoms. In one patient, who also was anti-Hu-antibody positive, the tumour could not be found at necropsy. We include this patient in the PND group because the patient presented typical clinical and neuropathological features of PEM/SN with neuronal loss and inflammatory infiltrates in the dorsal root ganglia and spinal cord. None of the patients without PND or with PND associated with anti-Yo, Ri, or Tr antibodies had anti-amphiphysin I antibodies.

The clinical features of the seven patients with PND and anti-amphiphysin I antibodies are summarised in the table. Five of the seven patients developed symptoms of PEM/SN and four of them also had high titres of anti-Hu-antibodies. The other two patients had paraneoplastic cerebellar degeneration and

Clinical features of anti-amphiphysin positive patients with paraneoplastic neurological disorders

Patient	Age/sex	Clinical syndrome	Hu-Ab	Time (months) PND/tumour	Cancer	Outcome
1	60/F	Sensorimotor neuropathy	Yes	-23	SCLC	Necropsy: PEM/SN†
2	58/M	PEM/SN	Yes	-7	SCLC	Necropsy: PEM/SN†
3	71/M	PEM/SN and LEMS	Yes	-17	SCLC	Necropsy: PEM/SN†
4	64/M	Sensory neuropathy	No*	0	SCLC	Death: pulmonary embolus
5	64/M	Cerebellar syndrome	No	-18	SCLC	Alive for 7 years
6	74/M	Opsoclonus/myoclonus	No*	-1	SCLC	Necropsy: perivascular/meningeal inflammatory infiltrates. Moderate neuronal loss in dentate nucleus and Purkinje cells
7	80/F	Sensory neuropathy	Yes	n.a.	None	Necropsy: PEM/SN**

PEM/SN=Paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy; LEMS=Lambert-Eaton myasthenic syndrome; SCLC=small cell lung carcinoma; NA=not applicable.

*Patients had low titre of Hu-Ab similar to that found in 16% of SCLC without paraneoplastic neurological disorders.¹¹

†Necropsy findings typical of PEM/SN with multifocal inflammatory infiltrates, reactive gliosis, and neuronal loss.

opsoclonus/myoclonus syndrome. The frequency of anti-amphiphysin I antibodies in patients with PND and SCLC (3.9%) with (2.7%) or without (6.8%) anti-Hu-antibodies was not statistically different from that in patients with SCLC without PND.

Discussion

The main finding of the present study is that the frequency of anti-amphiphysin I antibodies was low in patients with SCLC and PND. The group of patients with the highest frequency of anti-amphiphysin I antibodies (6.8%) corresponded with those with SCLC, PND, and negative anti-Hu-antibodies. However, even for this group the frequency of anti-amphiphysin I antibodies was not significantly different from that in patients with SCLC without PND.

The clinical range of anti-amphiphysin I antibody positive patients was not uniform. None developed clinical or neurophysiological features of SMS, five patients had PEM/SN and two developed other PND (see below). Four out of the five PEM/SN patients had anti-Hu-antibodies, a not surprising finding considering that the great majority of patients with PEM/SN, 95% in this series, had anti-Hu-antibodies.⁶ Necropsy findings of the four patients with PEM/SN harbouring both anti-Hu-antibodies and anti-amphiphysin I antibodies were similar to those reported in anti-Hu-antibody positive patients with PEM/SN but without anti-amphiphysin I antibodies.⁷ Although postmortem of one of our anti-amphiphysin I antibody positive patients did not show a tumour, this patient had anti-Hu-antibodies and typical clinical and postmortem features of PEM/SN raising the possibility that a small, tumour was overlooked.

The other two patients presented paraneoplastic cerebellar degeneration and the opsoclonus/myoclonus syndrome respectively. Patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and SCLC, who do not develop other features of PEM/SN, usually lack anti-Hu-antibodies but 36% of them harbour P/Q type voltage gated calcium channel antibodies probably related to a higher than expected association with the Lambert-Eaton myasthenic syndrome.¹² Similarly, anti-Hu-antibodies are rarely identified in paraneoplastic opsoclonus-myoclonus associated with SCLC although a few patients have been reported.^{13, 14} Excluding these exceptions, when paraneoplastic cerebellar degeneration and

opsoclonus/myoclonus develop as isolated syndromes in patients with SCLC, they are not generally associated with any specific antineuronal antibody. Our series supports this notion, because anti-amphiphysin I antibodies were identified in only 3% of paraneoplastic cerebellar degeneration and 14% of patients with opsoclonus-myoclonus and SCLC.

The low frequency of anti-amphiphysin I antibodies in patients with SCLC with PND, the lack of association with a particular neurological syndrome, and the similar frequency of anti-amphiphysin I antibodies in patients with SCLC without PND is by contrast with that described with anti-Hu-antibodies that are particularly associated with PEM/SN syndrome and SCLC.⁶ This is also by contrast with the close link between anti-amphiphysin I antibodies and SMS associated with breast cancer.²

Our study suggests that the optimal immunohistochemical method to detect antineuronal antibodies depends on the type of antibody. In the current study, the use of recommended techniques and serum dilutions to detect antineuronal antibodies¹⁵ failed to identify anti-amphiphysin I antibodies which, however, were readily demonstrated using higher serum concentrations and a different protocol.² In any case, immunoblot seems more sensitive than immunohistochemistry to detect anti-amphiphysin I antibodies.

The anti-amphiphysin I antibodies from all our patients recognised fragment V (C terminus) of human amphiphysin I, although many of them also recognised additional fragments. This finding is in agreement with that previously reported in patients with SCLC with PEM/SN and patients with SMS and breast cancer. Interestingly, in a series of 30 mouse monoclonal antibodies which were raised against human amphiphysin I, only three were directed against fragment V.¹⁰ This indicates that the epitopes recognised by the human serum samples do not simply coincide with the most immunogenic portion of the molecule.

Anti-amphiphysin I antibodies may be useful in predicting the paraneoplastic origin of a neurological disorder in a given patient without known cancer because, in agreement with a previous report,⁵ we did not find anti-amphiphysin I antibodies in a large series of patients without PND but whose symptoms were initially suspected to be paraneoplastic. However, the low incidence of anti-

amphiphysin I antibodies in patients with PND and SCLC represents a limitation for its use as a diagnostic marker of PND other than SMS.

We thank Dr M Solimena for many helpful discussions, Professor HM Meinck for providing one of the anti-amphiphysin I positive serum samples, and Mercè Bonastre for her excellent technical assistance. The work was supported in part by grants SGR 9500027 Generalitat de Catalunya, FIS 97/2100 Madrid, Spain (FG), and NIH grant NS-26064, USA (JD).

- 1 David C, McPherson PS, Mundigl O, *et al.* The role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:331-5.
- 2 Folli F, Solimena M, Cofield R, *et al.* Autoantibodies to a 128-kd synaptic protein in three women with the stiff-man syndrome and breast cancer. *N Engl J Med* 1993;328:546-51.
- 3 De Camilli P, Thomas A, Cofield R, *et al.* The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of stiff-man syndrome with breast cancer. *J Exp Med* 1993;178:2219-3.
- 4 David C, Solimena M, De Camilli P. Autoimmunity in stiff-man syndrome with breast cancer is targeted to the C-terminal region of human amphiphysin, a protein similar to the yeast proteins Rvs167 and Rvs161. *FEBS Lett* 1994;351:73-9.
- 5 Dropcho EJ. Anti-amphiphysin antibodies with small-cell lung carcinoma and paraneoplastic encephalomyelitis. *Ann Neurol* 1996;39:659-67.
- 6 Dalmau J, Graus F, Rosenblum MK, *et al.* Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuropathy. A clinical study of 71 patients. *Medicine* 1992;71:59-72.
- 7 Lennon VA, Manley HA, Kim K, *et al.* Amphiphysin autoantibodies: a paraneoplastic serological marker of breast and lung cancer-related encephalomyeloradiculoneuritis but not classical stiff-man syndrome [abstract]. *Neurology* 1997;48:A434.
- 8 Graus F, Dalmau J, Valldeoriola F, *et al.* Immunological characterization of a neuronal antibody (anti-Tr) associated with paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *J Neuroimmunol* 1997;74:55-61.
- 9 Saiz A, Arpa J, Sagasta A, *et al.* Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in three patients with cerebellar ataxia, late-onset insulin-dependent diabetes mellitus, and polyendocrine autoimmunity. *Neurology* 1997;49:1026-30.
- 10 Floyd S, Butler MH, Cremona O, *et al.* Expression of amphiphysin I, an autoantigen of paraneoplastic neurological syndromes, in breast cancer. *Molecular Med* 1998;4:29-39.
- 11 Graus F, Dalmau J, Reñé R, *et al.* Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival. *J Clin Oncol* 1997;15:2866-72.
- 12 Mason WP, Graus F, Lang B, *et al.* Small-cell lung cancer, paraneoplastic cerebellar degeneration and the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Brain* 1997;120:1279-300.
- 13 Anderson NE, Budde-Steffen C, Rosenblum MK, *et al.* Opsoclonus, myoclonus, ataxia, and encephalopathy in adults with cancer: a distinct paraneoplastic syndrome. *Medicine* 1988;67:100-9.
- 14 Hersh B, Dangond F, Dalmau J, *et al.* Paraneoplastic opsoclonus-myoclonus associated with anti-Hu antibody. *Neurology* 1994;44:1754-5.
- 15 Moll JWB, Antoine JC, Brashear HR, *et al.* Guidelines on the detection of paraneoplastic anti-neuronal-specific antibodies. *Neurology* 1995;45:1937-41.

BMJ
Publishing
Group

BMA House, Tavistock Square, London WC1H 9JR. Tel. 0171 383 6305. Fax 0171 383 6699

© 1999. All rights of reproduction of this reprint are reserved in all countries of the world.

Printed in Great Britain by Meridian Print Centre Ltd. Derby

JNNP/Feb/99

Anti-amphiphysin I antibodies in patients with paraneoplastic neurologic disorders associated with small-cell lung carcinoma

A. Saiz MD⁽¹⁾, J. Dalmau MD⁽²⁾, M. Husta Butler PhD⁽³⁾, Q. Chen MD⁽⁴⁾, J.Y. Delattre MD⁽⁴⁾, P. De Camilli MD⁽³⁾, F. Graus MD⁽¹⁾

⁽¹⁾ Service of Neurology, Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁽²⁾ Department of Neurology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, ⁽³⁾ Department of Cell Biology and Howard Hughes Medical Institute, Yale University School of Medicine, New Haven, Conn, USA. ⁽⁴⁾ Service of Neurology, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, INSERM U134, Paris, France.

Corresponding author: Francesc Graus MD, Servei de Neurologia, Hospital Clínic. Villarroel 170, Barcelona 08036. Spain.
Phone (343)2272213; Fax (343)2275414

Acknowledgments : We thank Dr. M. Solimena for many helpful discussions, Prof. H.M. Meinck for providing one of the anti-amphiphysin I positive sera and Mercé Bonastre for her excellent technical assistance. Supported in part by grants : SGR 9500027 Generalitat de Catalunya, FIS 97/2100 Madrid, Spain (FG). NIH grant NS-26064, USA (JD)

Key Words : Autoantibodies, amphiphysin I, paraneoplastic, small-cell lung carcinoma, stiff-man syndrome.

Abstract

Background: Patients with stiff-man syndrome and breast cancer develop anti-amphiphysin I antibodies (Am-Ab) that primarily recognize the C-terminus of the protein. Am-Ab have also been identified in a few patients with paraneoplastic neurologic disorders (PND) and small-cell lung cancer (SCLC) but the significance of this association is unclear.

Objective: To determine the frequency of Am-Ab in SCLC patients with PND and to characterize the epitope specificity of these antibodies.

Methods: Am-Ab were evaluated by immunohistochemistry on human and rat cerebellum, and immunoblots of rat brain homogenates. Serum samples included 134 patients with PND and anti-Hu antibodies (Hu-Ab) (83% had SCLC), 44 with SCLC and PND without Hu-Ab, 63 with PND and either Yo, Ri, or Tr antibodies, 146 with SCLC without PND, and 104 with non-PND. Positive sera were confirmed with immunoblots of recombinant human amphiphysin I and immunoreacted with five overlapping peptide fragments covering the full length of the molecule.

Results: Positive Am-Ab sera included from 7 (2.9%) patients with PND and 2 (1.4%) with SCLC without PND. Six of the 7 Am-Ab positive PND patients had SCLC (3 with Hu-Ab), and one had Hu-Ab but no detectable tumor. The PND included encephalomyelitis/sensory neuropathy (5 patients), cerebellar degeneration (1) and opsoclonus (1). All Am-Ab reacted with the C-terminus of amphiphysin I, but seven also recognized other fragments of the molecule.

Conclusions: Am-Ab are present at low frequency in patients with SCLC irrespective of the presence of an associated PND. All Am-Ab positive sera have in common reactivity with the C-terminus of the protein.

Introduction

Amphiphysin I, a nerve terminal protein with a putative role in endocytosis [1,2], is recognized by autoantibodies present in the serum and CSF from female patients with paraneoplastic stiff-man syndrome (SMS) and breast cancer[3,4]. The anti-amphiphysin I antibodies (Am-Ab) of these patients predominantly react with the C-terminus of the protein which contains a SH3 domain. This SH3 domain interacts with other proteins involved in synaptic vesicle endocytosis [2,5]. A recent study [6] identified Am-Ab in the serum of three patients with small-cell lung carcinoma (SCLC) and paraneoplastic encephalomyelitis and sensory neuronopathy (PEM/SN), a disorder usually associated with anti-Hu antibodies (Hu-Ab) [7-9]. The serum of one of these patients had Hu-Ab but none of them developed typical SMS. Although this study suggested that PEM/SN in SCLC patients may associate with several autoantibody specificities and that Am-Ab are not restricted to SMS, the frequency and specificity of these associations were not defined. A few additional cases of Am-Ab positive patients with PND other than SMS associated with either breast or lung cancer were reported [10]. To clarify these clinical-serological associations is important because these antibodies are considered good markers of specific types of paraneoplastic syndromes and tumors.

In the present study, we analyzed the frequency of Am-Ab in a large series of patients with paraneoplastic neurologic disorders (PND) other than SMS, to determine whether: 1) Am-Ab are associated with a particular type of

PND or tumor and 2) whether amphiphysin I autoepitopes differ in patients with different clinical syndromes.

Materials And Methods

Sera and tissues

Serum samples were obtained from 241 patients with PND, 146 with SCLC without PND or Hu-Ab, and 104 with non-paraneoplastic neurologic disorders usually considered in the differential diagnosis of PND (Table 1). Sera were collected in three of the participant laboratories (Barcelona, Paris, and New York) and kept frozen at -70°C . Serum samples from two patients with paraneoplastic SMS and breast cancer were used as positive controls.

Samples of human cerebellum were obtained from neurologically normal individuals within 16 hours after death and embedded in optimal cutting temperature compound (OCT, Miles Inc, USA). Wistar rats were anesthetized and perfused with saline followed with 4% paraformaldehyde in 0.12 M sodium phosphate buffer. The cerebellum was further fixed with 4% paraformaldehyde for 4 hours and cryoprotected with 20% sucrose in phosphate buffered saline (PBS) overnight. Human and rat samples were snap frozen in isopentane chilled by liquid nitrogen, and stored at -70°C .

For immunoblot analysis, approximately 20 g of fresh rat brain were homogenized in 600 ml of 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, 0.2 mM EDTA, 1 mM 2-aminoethylisothiuronium bromide (AET), 0.2 mM pyridoxal 5-phosphate (PLP), pepstatin, aprotinin, leupeptin, antipain (each at 4 ug/ml;

Sigma, USA), and 0.4 uM PMSF with a glass-Teflon homogenizer using 10 up-and-down strokes at 900 rpm. The homogenate was sonicated and clarified by centrifugation at 130,000 g for 1 hour at 4°C.

Immunohistochemistry

Seven μ -thick frozen sections of rat cerebellum fixed as indicated above were sequentially incubated at room temperature with 0.3% hydrogen peroxide in PBS for 10 minutes, 10% normal goat serum for 20 minutes, the patient's serum diluted at 1:500 for 3h at 37°C, biotinylated goat anti-human IgG for 30 minutes, and the avidin biotin immunoperoxidase complex (Vector Labs, USA) for 30 minutes. The reaction was developed with 0.05% diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, USA) with 0.01% hydrogen peroxide in PBS with 0.5% Triton X-100. Dilution of antibodies was done in PBS with 0.3% Triton X-100. Immunohistochemistry on human cerebellum was done with the same protocol except that the frozen sections were fixed in cold acetone for ten minutes, the incubation with patient's serum was done overnight at 4°C, and antibodies were not diluted in Triton X-100.

Immunoblotting of rat brain homogenate

Rat brain homogenate was resuspended in sample buffer containing 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 5% 2-mercaptoethanol, boiled for 2 minutes, electrophoresed (30 μ g per lane) in 7.5% or 10% SDS-polyacrylamide gels, and transferred to nitrocellulose[12]. After blocking with 5% dry carnation milk and 10% normal goat serum for 1 hour, nitrocellulose strips were incubated with the patient's serum (1:10,000 dilution) or positive control (1:50,000), overnight at

room temperature, washed with PBS, and incubated with biotinylated goat anti-human IgG, diluted 1:2,000 in 10% normal goat serum for one hour. Strips were then processed as described in the immunohistochemistry technique. To make the Am-Ab detection more uniform, all immunoblots were prepared in the same laboratory (Hospital Clinic, Barcelona) and nitrocellulose strips containing the same amount of immobilized antigen were sent to the other two participating laboratories (Paris and New York) that processed the strips with the same protocol.

Criteria for the presence of anti-amphiphysin I antibodies

A serum was considered positive for Am-Ab when in immunoblots of rat brain homogenate showed a reactive band of identical electrophoretic mobility (around 128 Kd) than that obtained with the positive control. All positive and seven randomly taken negative sera were subsequently evaluated by indirect immunofluorescence on formaldehyde-fixed rat cerebellar tissue [3,13] and immunoblots of recombinant human amphiphysin I [5] at Yale University (M. HB, P.DC). Serum samples were tested at dilutions of 1:4 and 1:500 for the immunofluorescence and the immunoblot experiments respectively. Clinical information was blinded from investigators performing these immunoblots.

Epitope analysis

Glutathione S-transferase (GST)-fusion proteins consisting of five overlapping fragments of amphiphysin I were prepared as described previously [5]. The five GST-fusion proteins were subjected to SDS-PAGE (10% acrylamide) and western blotting. Nitrocellulose strips were blocked with

blotto (5% milk, 20 mM Tris-HCL, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween-20), then incubated with patient's serum at a dilution of 1:500 for 2 hours. Strips were washed three times, incubated in rabbit anti-human IgG (dilution 1:1000) for 1 hour in Blotto, and again washed three times. Finally the strips were incubated in anti-rabbit IgG conjugated to alkaline-phosphatase (1:1000 in Blotto) for one hour, washed and developed using standard procedures with nitroblue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate. Monoclonal antibodies directed to each fragment of amphiphysin I were used to identify the correct band. Positive and negative human serum were also used as controls.

Results

Immunoblot studies

Nine sera immunoreacted with a band identical to that obtained with the positive control in immunoblots of rat brain homogenate (Figure 1). In all of them, the presence of Am-Ab was confirmed in immunoblots of recombinant human amphiphysin I, whereas seven negative sera by the screening criteria, blindly examined with the positive ones, did not react with the recombinant protein. All nine positive sera reacted with fragment V of amphiphysin I, that includes the C-terminus of the molecule [5], but the reactivity with the other four fragments of amphiphysin I was not uniform with seven sera recognizing multiple fragments.

Immunohistochemistry studies

None of the nine positive Am-Ab sera could be identified by immunohistochemistry on human cerebellum. In rat cerebellar sections evaluated by the avidin-biotin immunoperoxidase technique, the presence of Am-Ab was demonstrated in only one serum, which corresponded to that with the strongest immunoreactivity in immunoblots. However, when the nine sera were evaluated by immunohistochemistry at Yale University with a different protocol [3], all but one gave an immunoreactive pattern compatible with Am-Ab.

Clinical-immunological correlation

Seven Am-Ab positive patients had PND(2.9%) and two had SCLC without neurologic disorders (1.4%). Six of the seven patients with PND had SCLC that was diagnosed after onset of the neurological symptoms. In one patient, who also was Hu-Ab positive, the tumor could not be found at autopsy. We include this patient in the PND group because the patient presented typical clinical and neuropathologic features of PEM/SN with neuronal loss and inflammatory infiltrates in the dorsal root ganglia and spinal cord. None of the patients with non-paraneoplastic neurologic disorders or with PND associated with anti-Yo, Ri or Tr antibodies had Am-Ab.

Table 2 summarizes the clinical features of the 7 patients with PND and Am-Ab. Five of the 7 patients developed symptoms of PEM/SN and four of them also had high titers of Hu-Ab. The other two patients had paraneoplastic cerebellar degeneration and opsoclonus/myoclonus syndrome respectively.

The frequency of Am-Ab in patients with PND and SCLC (3.9%) with (2.7%) or without (6.8%) Hu-Ab was not statistically different from that observed in SCLC patients without PND.

Discussion

This is the first study that analyzes the frequency of Am-Ab in a large series of patients with PND other than SMS. Two previous studies suggested an association between PND and Am-Ab in patients with SCLC, but none of them described the frequency of Am-Ab in patients with SCLC and several types of PND or in a control group of SCLC patients without PND[6,10]. The main finding of the present study is that the frequency of Am-Ab was low in SCLC patients with PND. The group of patients with the highest frequency of Am-Ab (6.8%) corresponded to those with SCLC, PND, and negative Hu-Ab. However, even for this group the frequency of Am-Ab was not significantly different from that observed in SCLC patients without PND.

We do not think that the low frequency of Am-Ab could be explained by the relatively high dilution (1:10,000) of the sera used in the immunoblots of rat brain homogenates. This dilution was lower than the routinely used by the positive control sera (1:50,000) and is useful for the detection of the most common antineuronal paraneoplastic antibodies [14,15]. In addition, the use of a lower dilution would probably had increased the occurrence of unspecific bands and false positive results when confirmed with immunoblots of recombinant amphiphysin I.

The clinical spectrum of Am-Ab positive patients was not uniform. None developed clinical or neurophysiologic features of SMS, 5 patients suffered from PEM/SN and two developed other PND (see below). Four out of the 5 PEM/SN patients had Hu-Ab, a not surprising finding considering that the great majority of PEM/SN patients, 95% in this series, had Hu-Ab [7]. Autopsy findings of the four PEM/SN patients harboring both Hu-Ab and Am-Ab were similar to those reported in Hu-Ab positive patients with PEM/SN but without Am-Ab [7].

The other two patients presented paraneoplastic cerebellar degeneration and the opsoclonus/myoclonus syndrome respectively. Patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and SCLC, who do not develop other features of PEM/SN, usually lack Hu-Ab but 36% of them harbor P/Q type voltage-gated calcium channel antibodies probably related to a higher than expected association with the Lambert-Eaton myasthenic syndrome [16]. Similarly, Hu-Ab are rarely identified in paraneoplastic opsoclonus-myoclonus associated with SCLC although a few patients have been reported [17,18]. Excluding these exceptions, paraneoplastic cerebellar degeneration and opsoclonus/myoclonus, when they develop as isolated syndromes in patients with SCLC, generally do not appear to be associated with any specific antineuronal antibody. Our series supports this notion, because Am-Ab were identified in only 3% of paraneoplastic cerebellar degeneration and 14% of opsoclonus-myoclonus patients with SCLC.

The low frequency of Am-Ab in SCLC patients with PND, the lack of association with a particular neurological syndrome, and a similar frequency of Am-Ab in SCLC patients without PND is in contrast with that described with Hu-Ab that are particularly associated with PEM/SN syndrome and SCLC [7-9]. This is also in contrast to the close link between Am-Ab and breast cancer associated with SMS or similar neurologic conditions [3]. In spite of these considerations, Am-Ab may be useful to predict the paraneoplastic origin of the neurologic disorder of a given patient without known cancer because, in agreement with a previous report [6], we did not find Am-Ab in a large series of patients with non-paraneoplastic neurologic syndromes where a paraneoplastic etiology is usually considered. Although the autopsy of one of our Am-Ab positive patients did not show a tumor, this patient had Hu-Ab and typical clinical and post-mortem features of PEM/SN raising the possibility that a small, microscopic, tumor was overlooked [17].

Our study suggest that the optimal immunohistochemical method to detect antineuronal antibodies depends on the type of antibody: in the current study, the use of recommended techniques and serum dilutions to detect antineuronal antibodies [19] failed to identify Am-Ab which, however, were readily demonstrated using higher serum concentrations and a different protocol [13].

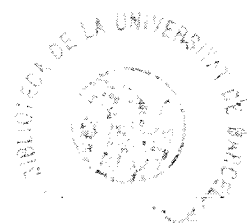
The Am-Ab from all our patients recognized fragment V (C-terminus) of human amphiphysin I, although many of them recognized additional fragments. This finding is in agreement with that previously reported in SCLC

patients with PEM/SN and patients with SMS and breast cancer. Interestingly, in a series of 30 mouse monoclonal antibodies which were raised against human amphiphysin I, only three were directed against fragment V [20]. This observation indicates that the epitopes recognized by the human sera do not simply coincide with the most immunogenic portion of the molecule.

The findings of this study confirms and extends the previous evidence that Am-Ab may be present in some patients with PND and SCLC. Although the frequency of Am-Ab is low, their detection may help in the diagnosis of a given neurological syndrome as paraneoplastic and direct the search to SCLC or breast cancer.

References

1. Lichte B, Veh RW, Meyer HE, Kilimann MW. Amphiphysin, a novel protein associated with synaptic vesicles. *EMBO J* 1992; 11:2521-2530
2. David C, McPherson PS, Mundigl O, DeCamilli P. The role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:331-335
3. Folli F, Solimena M, Cofield R, et al. Autoantibodies to a 128-kd synaptic protein in three women with the stiff-man syndrome and breast cancer. *N Engl J Med* 1993;328:546-551
4. De Camilli P, Thomas A, Cofield R, et al. The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of stiff-man syndrome with breast cancer. *J Exp Med* 1993;178:2219-223
5. David C, Solimena M, De Camilli P. Autoimmunity in stiff-man syndrome with breast cancer is targeted to the C-terminal region of human amphiphysin, a protein similar to the yeast proteins Rvs167 and Rvs161. *FEBS Lett* 1994;351:73-79
6. Dropcho EJ. Anti-amphiphysin antibodies with small-cell lung carcinoma and paraneoplastic encephalomyelitis. *Ann Neurol* 1996;39:659-667
7. Dalmau J, Graus F, Rosenblum MK, Posner JB. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. A clinical study of 71 patients. *Medicine* 1992;71:59-72



8. Dropcho EJ. Autoimmune central nervous system paraneoplastic disorders: Mechanisms, diagnosis, and therapeutic options. *Ann Neurol* 1995;37(S1):S102-S113
9. Darnell RB. Onconeural antigens and the paraneoplastic neurologic disorders: At the intersection of cancer, immunity, and brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:4529-4536
10. Lennon VA, Manley HA, Kim K, Parisi JE, Kiliman MW, Benarroch EE. Amphiphysin autoantibodies: A paraneoplastic serological marker of breast and lung cancer-related encephalomyeloradiculoneuritis but not classical stiff-man syndrome. *Neurology (Abstract)* 1997;48: A434
11. Graus F, Dalmau J, Valldeoriola F, et al. Immunological characterization of a neuronal antibody (anti-Tr) associated with paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease, *J Neuroimmunol* 1997;74:55-61
12. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979;76:4350-4354
13. DeCamilli P, Cameron R, Greengard P. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. I. Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections. *J Cell Biol* 1983; 96:1337-1354
14. Graus F, Dalmau J, Reñé R, et al. Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: Association with complete response to therapy and improved survival. *J Clin Oncol* 1997;15:2866-2872

15. Dalmau J, Furneaux HM, Gralla RJ, Kris mG, Posner JB. Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small-cell lung cancer-A quantitative western blot analysis. *Ann Neurol* 1990;27:544-552
16. Mason WP, Graus F, Lang B, et al. Small-cell lung cancer, paraneoplastic cerebellar degeneration and the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Brain* 1997;120:1279-1300
17. Anderson NE, Budde-Steffen C, Rosenblum MK, et al. Opsoclonus, myoclonus, ataxia, and encephalopathy in adults with cancer: A distinct paraneoplastic syndrome. *Medicine* 1988;67:100-109
18. Hersh B, Dangond F, Dalmau J, Gultekin S, Geller E, PY Wen. Paraneoplastic opsoclonus-myoclonus associated with anti-Hu antibody. *Neurology* 1994;44:1754-1755
19. Moll JWB, Antoine JC, Brashear HR, et al. Guidelines on the detection of paraneoplastic anti-neuronal-specific antibodies. *Neurology* 1995;45:1937-1941
20. Floyd S, Butler MH, Cremona O, et al. Expression of amphiphysin I, an autoantigen of paraneoplastic neurological syndromes, in breast cancer. *Molecular Med* 1998;4:29-39

Table 1

Clinical diagnosis of the patients evaluated for anti-amphiphysin antibodies

Clinical diagnosis	number of patients
<u>PEM/SN and Hu-Ab</u>	134
Associated with: SCLC	111
other tumors	10
no tumor	13
<u>Hu-Ab negative PND and SCLC</u>	44
Clinical syndrome: PCD	30
PEM/SN	7
opsoclonus/myoclonus	7
<u>PND not associated with SCLC or Hu-Ab</u>	63
PCD with Yo-Ab and ovary/breast cancer	47
PCD with Tr-Ab and Hodgkin's disease[11]	5
PND(&) with Ri-Ab and several cancers*	11
<u>Non-PND neurological syndromes</u>	104
Cerebellar disorders	56
Sensory neuropathies	41
Opsoclonus	7
SCLC patients without PND	146

PEM/SN: Paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy; PCD:

Paraneoplastic cerebellar degeneration; PND: Paraneoplastic neurological disorders; SCLC: Small-cell lung carcinoma

(&) All patients had brainstem encephalitis but not all opsoclonus

(*) Breast cancer: 5 patients; SCLC: 2; Non-SCLC: 1; Bladder cancer: 1; No cancer: 2.

Table 2. Clinical features of anti-amphiphysin positive patients with paraneoplastic neurologic disorders

Patient	Age/sex	Clinical syndrome	Hu-Ab	Time(months) PND/tumor	Cancer	Outcome
1	60/F	myxed neuropathy	Yes	-23	SCLC	Autopsy: PEM/SN**
2	58/M	PEM/SN	Yes	-7	SCLC	Autopsy:PEM/SN**
3	71/M	PEM/SN and LEMS	Yes	-17	SCLC	Autopsy: PEM/SN**
4	64/M	sensory neuropathy	No*	0	SCLC	Death: Pulmonary embolus
5	64/M	Cerebellar syndrome	No	-18	SCLC	Alive for 7 years
6	74/M	Opsoclonus/ myoclonus	No*	-1	SCLC	Autopsy: perivascular/ meningeal inflammatory infiltrates. Moderate neuronal loss in dentate nucleus and Purkinje cells
7	80/F	Sensory neuropathy	Yes	n.a.	None	Autopsy: PEM/SN**

PEM/SN: Paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy; LEMS:

Lambert-Eaton myasthenic syndrome; SCLC: Small-cell lung carcinoma. n.a. :
not applicable

* Patients had low titer of Hu-Ab similar to that found in 16% of SCLC without paraneoplastic neurological disorders[14]. ** Autopsy findings typical of PEM/SN with multifocal inflammatory infiltrates, reactive gliosis, and neuronal loss.

Figure Legend

Immunoblots of rat brain homogenate probed with the serum of a patient with SMS and anti-GAD antibodies (lane 1), paraneoplastic SMS and breast cancer with Am-Ab (lanes 2,3), PND and SCLC (lanes 4-8), SCLC without PND (lanes 9-10). Three sera from patients with PND and SCLC (lanes 4-6) immunoreacted with a band (around 128 Kd) of the same electrophoretic mobility as that recognized by the positive Am-Ab sera (arrow). Four sera also presented anti-Hu antibodies (arrowhead).

DISCUSION

Desde la descripción inicial de la asociación de los Ac-GAD al síndrome de la persona-rígida (SPR), se ha detectado de forma ocasional la presencia de estos anticuerpos en otras enfermedades neurológicas no relacionadas con el SPR. Cuatro pacientes con enfermedades degenerativas cerebelosas (3 con ataxia cerebelosa de inicio tardío, y 1 con atrofia multisistémica),^{3,7,8} uno con mioclonias palatinas,⁹ y finalmente un parkinsonismo.⁸ Excepto en dos de estos pacientes,^{7,9} el resto fueron detectados en grupos controles de pacientes con enfermedades neurológicas degenerativas que eran evaluados para determinar la frecuencia de AC-GAD en pacientes con SPR, y se desconoce su perfil clínico e inmunológico. A pesar de la existencia de estos casos aislados, no existe ningún estudio específico dirigido a conocer el espectro de enfermedades neurológicas asociadas a los Ac-GAD. Evaluación que por sí misma puede dar respuesta a si la presencia de estos anticuerpos es un mero epifenómeno relacionado con la destrucción neuronal.

El **trabajo 1 y 2** muestran que los Ac-GAD *están asociados a una segunda enfermedad neurológica no descrita previamente, una ataxia cerebelosa de inicio en la edad adulta en un contexto de autoinmunidad organo-específica similar a la del SPR, y la ausencia de estos anticuerpos en otras enfermedades neurológicas degenerativas en las que no coexisten signos de autoinmunidad, a pesar de la existencia de destrucción o disfunción GABA-érgica.*

En el **trabajo 1** se pone de manifiesto que un mecanismo autoinmunitario puede estar implicado en la patogenia de ciertos casos de ataxias cerebelosas aparentemente degenerativas, y que el GAD puede ser uno de los principales antígeno diana de la reacción inmune.

Se trataba de 3 pacientes mujeres con una edad media de 64 años, con un síndrome cerebeloso aislado de características crónicas en dos, similar en su evolución clínica y radiológica al de las ataxias cerebelosas de inicio en la edad adulta, y subagudo en el tercero, similar en la presentación a la degeneración cerebelosa paraneoplásica.. Las tres pacientes tenían una historia familiar de diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID), todas presentaban una DMID de inicio en la edad adulta, asociaban otras enfermedades autoinmunes organo-específicas, y presentaban un genotipo HLA que se asocia a la susceptibilidad para desarrollar trastornos autoinmunes. Una de las pacientes desarrolló en su evolución epilepsia, una asociación descrita en un 10% de los pacientes con SPR. Las tres presentaban un título alto de Ac-GAD tanto en suero como en el líquido cefalorraquídeo, una síntesis intratecal específica de AC-GAD y bandas oligoclonales de IgG, un perfil clínico e inmunológico similar al observado en los pacientes con SPR y Ac-GAD. Que el título de Ac-GAD de estas pacientes fuera tan elevado y muy superior al de los pacientes con DMID sin enfermedad neurológica, y la existencia de una síntesis intratecal de Ac-GAD en el líquido cefalorraquídeo, hace poco probable que la presencia de estos anticuerpos estuviera relacionado con el hecho de que fueran diabéticas. La ausencia de Ac-GAD en otros pacientes con ataxia cerebelosa sin el mismo contexto de autoinmunidad sugiere que estos anticuerpos no son

producidos como consecuencia de la destrucción de las neuronas Gaba-érgicas por otras causas. Si bien el GAD es un antígeno intracitoplasmático, estudios experimentales han demostrado que las células de Purkinje pueden absorber IgG del líquido cefalorraquídeo. Teóricamente se podría pensar que los Ac-GAD presentes a altos títulos en el líquido cefalorraquídeo pueden ser internalizados por las células de Purkinje in vivo, interactuar con el GAD y causar su disfunción neuronal. Una explicación alternativa es que el alto título de Ac-GAD de estos pacientes es el reflejo de su predisposición a una autoinmunidad multiantigénica. Todo ello concordante con la hipótesis principal de trabajo. Independientemente de si el GAD es la clave antigénica, el perfil inmunológico de estos pacientes sugiere que la probable patogenia del trastorno cerebeloso es de origen inmunitario.

En el **trabajo 2** se muestra la *utilidad diagnóstica de los Ac-GAD en el SPR* pues permiten identificar a pacientes con SPR que no podrían ser diagnosticados con seguridad mediante los criterios clínicos actuales, y se sugiere que el espectro clínico del SPR puede ser más amplio que el establecido por los criterios diagnósticos.

En este trabajo se estudió a cinco pacientes con sospecha clínica de SPR para ver si cumplían con los criterios diagnósticos establecidos, y se comparó la presencia y el título de Ac-GAD con el de 49 pacientes diabéticos, 322 pacientes con otras enfermedades neurológicas, y 91 sujetos sanos. Tres pacientes cumplían con los criterios clínicos aceptados (SPR típico), y la presencia de Ac-GAD en ellos corroboraba el valor positivo de estos anticuerpos en el diagnóstico del síndrome. Sin embargo, los criterios aunque

muy específicos no parecían ser muy sensibles puesto que no fueron cumplidos por dos de los pacientes. La ausencia de afectación axial con un cuadro limitado a una extremidad inferior, en un caso, era una forma de presentación no descrita previamente. La forma de inicio aguda, en otro caso, la expresión clínica localizada y su relación temporal con una herida local que motivó un diagnóstico de presunción inicial de tétanos, con un curso rápidamente progresivo y la afectación predominante, y distal, de las extremidades inferiores, conformaban los casos de SPR atípicos. Sin embargo todos los pacientes presentaban Ac-GAD con un título muy superior al de los pacientes con DMID, todos presentaban otros autoanticuerpos organo-específicos, y excepto uno tenían otras enfermedades autoinmunes. Es decir, los cinco pacientes presentaban el conjunto de características asociadas al SPR que han sugerido la hipótesis autoinmune de su patogenia. Mientras que los Ac-GAD estaban ausentes en los pacientes con otras enfermedades neurodegenerativas sin ese contexto de autoinmunidad y en los sujetos sanos.

En el **trabajo 3** se confirma que el espectro clínico del SPR es más amplio que el sugerido por los criterios clínicos establecidos. Así, se describe una forma clínica no reconocida previamente, el síndrome de la pierna-rígida como forma focal del síndrome de la persona-rígida.

Brown et al⁵⁹ habían descrito cuatro pacientes con rigidez y espasmos dolorosos que afectaban a una o ambas piernas sin afectación de la musculatura axial. Dos de los pacientes presentaban evidencia clínica o serológica de autoinmunidad organo-

específica, pero ninguno Ac-GAD. Los autores acuñaron el término de síndrome de la pierna-rígida para definir el cuadro clínico de estos pacientes, separando esta entidad del SPR. En nuestro trabajo, ponemos de manifiesto la dificultad que existe para poder diagnosticar a un paciente que presenta un cuadro clínico atípico o que no llega nunca a desarrollar el síndrome completo, cuando el diagnóstico sólo se puede establecer mediante criterios clínicos, y argumentamos porqué esta forma clínica es una forma focal de SPR. Así, se describe a dos pacientes con un cuadro clínico similar, de inicio insidioso y curso lentamente progresivo, caracterizado por rigidez, espasmos, y postura anómala de una pierna que no se extendió a la otra pierna ni al tronco a pesar de la presencia de síntomas durante más de 11 años. En ambos pacientes coexistían manifestaciones clínicas y serológicas de autoinmunidad organo-específica, un elevado título de Ac-GAD, y un patrón electromiográfico de actividad continua de unidades motoras con unos reflejos exteroceptivos anormalmente aumentados. En conclusión, nuestro trabajo refuerza la necesidad de redefinir los criterios diagnósticos del SPR, y proponemos el término de SPR focal para definir aquellos pacientes que cumplen con los criterios de SPR excepto por la distribución de la musculatura afectada. La detección de Ac-GAD en estos pacientes soporta el diagnóstico de estas formas clínicas.

En el **trabajo 4** de nuevo se sugiere que el espectro clínico, y también patológico, del SPR puede ser más amplio de lo esperado, y que al menos en ciertos casos de síndrome de la persona-rígida y encefalomiелitis progresiva con rigidez puede subyacer el mismo proceso patológico.

Este trabajo ilustra la dificultad que existe en ocasiones en diferenciar entre casos de síndrome de persona-rígida (SPR) y encefalomiелitis progresiva con rigidez (EMPR). Esta última caracterizada por un curso subagudo y rápidamente progresivo, con alteraciones clínicas atípicas para el SPR como la rigidez prominente de extremidades, disfunción troncoencefálica, trastornos autonómicos, pleocitosis del líquido cefalorraquídeo (LCR), y la presencia de pérdida neuronal e infiltrados inflamatorios perivasculares en la necropsia.²³ En el trabajo se describe a un paciente con un cuadro clínico atípico de SPR en su inicio, que desarrolla el cuadro clínico característico en su evolución pero con un curso rápidamente progresivo, similar al observado en la EMPR, que le lleva a su fallecimiento en 8 meses. No obstante, el paciente presentaba Ac-GAD en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR), manifestaciones clínicas y serológicas de autoinmunidad organo-específica, y la presencia de bandas oligoclonales de IgG en el LCR. El estudio patológico mostró una pérdida de neuronas del asta anterior, junto a neuronas vacuoladas, proliferación astrogial y microglial, en la médula lumbar, y la ausencia de infiltrado inflamatorio. Es decir unos hallazgos similares a los descritos en la EMPRR, y a un paciente con SPR asociado a Ac-GAD, pero sin el infiltrado inflamatorio característico. Este trabajo sugiere que en algunos casos de SPR y EMPR puede subyacer el mismo proceso patológico, y refuerza la importancia de definir claramente el espectro clínico del SPR.

En el **trabajo 5** se destaca que la detección de los anticuerpos anti-anfifisina ayudan a definir el origen paraneoplásico de un síndrome neurológico particular y permiten dirigir la búsqueda hacia un cáncer de mama o un carcinoma de pulmón de células pequeñas.

En este trabajo se estudió la frecuencia de anticuerpos anti-anfifisina (Ac-AF) en pacientes con cuadros paraneoplásicos diferentes al síndrome de la persona-rígida, para ver si se relacionaban con algún tipo de cuadro neurológico o tumor particular. El principal hallazgo fue que la frecuencia de estos anticuerpos en pacientes con trastornos neurológicos paraneoplásicos y carcinoma de pulmón de células pequeñas era baja, 7 pacientes, (2,9%) y no significativamente diferente a la de pacientes con carcinoma de pulmón pero sin afectación neurológica, 2 pacientes, (1,4%). En cuatro de los 7 pacientes con Ac-AF coexistían anticuerpos anti-Hu, y el cuadro neurológico correspondía a una encefalomiелitis/neuropatía sensitiva (5 pacientes), degeneración cerebelosa paraneoplásica (1) y opsoclonus (1). Todos los pacientes, incluidos los que no asociaban cuadro neurológico, reaccionaban con el C-terminal de la anfifisina, el mismo patrón descrito que en los pacientes con SPR paraneoplásico asociado a Ac-AF.

En conclusión, los anticuerpos anti-anfifisina están presentes en algunos pacientes con trastornos neurológicos paraneoplásicos y carcinoma de pulmón de células pequeñas. Aunque su frecuencia es baja, su detección permite adscribir el cuadro neurológico como paraneoplásico y dirigir la búsqueda hacia un cáncer de pulmón de células pequeñas o de mama.

V. CONCLUSIONES

De los trabajos presentados se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La autoinmunidad GAD no sólo se relaciona con el síndrome de la persona-rígida si no también con una ataxia cerebelosa asociada a una autoinmunidad organo-específica similar a la que presentan los pacientes con síndrome de la persona-rígida.
2. El espectro clínico de los pacientes con síndrome de la persona-rígida es más amplio que el establecido por los criterios diagnósticos. Los Ac anti-GAD permiten identificar a pacientes que no podrían ser diagnosticados con seguridad mediante los criterios actuales.
3. La ausencia de Ac-GAD en pacientes con enfermedades neurodegenerativas y destrucción de neuronas GABA-érgicas permite establecer que los Ac anti-GAD no son un epifenómeno relacionado con la destrucción celular.
4. La incidencia de anticuerpos anti-anfifisina en pacientes con síndromes paraneoplásicos es baja. Sin embargo, su detección ayuda a establecer que el cuadro clínico neurológico es paraneoplásico y permite dirigir la búsqueda hacia un cáncer de pulmón de células pequeñas o un cáncer de mama.

VI. BIBLIOGRAFIA

*ESPECTRO DE ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS ASOCIADAS A ANTICUERPOS ANTI-
GLUTAMATO DECARBOXILASA (GAD)*

1. Lernmark A. Glutamic acid decarboxylase. Gene to antigen disease. *Journal of Internal Medicine* 1996;240:259-277.
2. Solimena M, Folli F, Denis-Donini S, et al. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy and type I diabetes mellitus. *N Engl Med* 1988;318:1012.
3. Solimena M, Folli F, Aparisi R, Pozza G, De Camilli P. Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. *N Engl J Med* 1990;322:1555.
4. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, et al. Identification of the 64 kD autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990;347:151.
5. Solimena M, De Camilli P. Autoimmunity to glutamic acid decarboxylase (GAD) in stiff-man syndrome and insulin-dependent diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 1991;14:452.
6. Seissler J, Amann J, Mauch L, et al. Prevalence of autoantibodies to the 65 and 67 kD isoforms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993;92:1394.
7. Honnorat J, Trouillas P, Thivolet C, Aguera M, Belin MF. Autoantibodies to glutamate decarboxylase in a patient with cerebellar cortical atrophy, peripheral neuropathy, and slow eye movements. *Arch Neurol* 1995;52:462.

8. Grimaldi LME, Martino G, Braghi S, et al. Heterogeneity of autoantibodies in stiff-man syndrome. *Ann Neurol* 1993;34:57-64.
9. Nemni R, Braghi S, Natali-Sora MG, et al. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in palatal myoclonus and epilepsy. *Ann Neurol* 1994;36:665.
10. Kaufman DL, Houser CR, Tobin AJ. Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J Neurochem* 1991;56:720-723.
11. Li L, Jiang J, Hagopian WA, et al. Differential detection of rat islet and brain glutamic acid decarboxylase (GAD) isoforms with sequence-specific peptide antibodies. *J Histochem Cytochem* 1995;43:53-59.
12. Ellis TM, Atkinson MA. The clinical significance of an autoimmune response against glutamic acid decarboxylase. *Nature Medicine* 1996;2:148-153.
13. Tuomilehto J, Tuomilehto-Wolf E, Zimmet P, Mackay I, Rowley M. Antibodies to glutamic acid decarboxylase as predictors of insulin-dependent diabetes mellitus before clinical onset of disease. *Lancet* 1994;343:1383.
14. Tisch R, Yang XD, Singer S, et al. Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 1993;366:72.
15. Atkinson MA, Kaufman DL, Campbell L, et al. Response of peripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1992;339:458.

16. Harrison LC, Honeyman MC, De Aizpurua HJ, et al. Inverse relation between humoral and cellular immunity to glutamic acid decarboxylase in subjects at risk of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1993;341:1365.
17. Moersch FP, Woltman HW. Progressive fluctuating muscular rigidity and spasms ("stiff-man" syndrome): report of a case and some observations in 13 other cases. *Mayo Clin Proc* 1956;31:421-427.
18. Blum P, Jankovic J. Stiff-Person syndrome: an autoimmune disease. *Movement Disorders* 1991;6:12-20.
19. Gordon EE, Januszko DM, Kaufman L. A critical survey of stiff-man syndrome. *Am J Med* 1967;42:582-599.
20. Meinck HM, Ricker K, Conrad B. The stiff-man syndrome: new pathophysiological aspects from abnormal exteroceptive reflexes and the response to clomipramine, clonidine, and tizanidine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1984;47:280-287.
21. Lorish TR, Thorsteinsson G, Howard FM. Stiff-man syndrome updated. *Mayo Clin Proc* 1989;64:629.
22. Isaacs H. Stiff man syndrome in a black girl. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1979;42:988-994.
23. Thompson PD. Stiff people. En: Marsden CD, Fahn S, editores. *Movement Disorders 3*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1994;373-405.
24. McEvoy KM. Stiff-man syndrome. *Mayo Clin Proc* 1991;66:300-304.

25. Henningsen P, Clement U, Küchenhoff J, Simon F, Meinck HM. Psychological factors in the diagnosis and pathogenesis of stiff-man syndrome. *Neurology* 1996;47:38-42.
26. Requena I, Arias M, Pardo J, Portela M, Alvarez JA. Síndromes de actividad muscular continua: presentación de un caso central (stiff-man) y uno periférico (neuromiotonía) asociado a neuroborreliosis. *Rev Neurol (Barc)* 1995;23 (119):129-133.
27. Mitsumoto H, Schwartzman MJ, Estes ML, et al. Sudden death and paroxysmal autonomic dysfunction in stiff-man syndrome. *J Neurol* 1991;238:91-96.
28. Meinck HM, Ricker K, Hülser PJ, Schmid E, Peiffer J, Solimena M. Stiff man syndrome: clinical and laboratory findings in eight patients. *J Neurol* 1994;241:157-166.
29. Meinck HM, Ricker K, Hülser PJ, Solimena M. Stiff man syndrome neurophysiological findings in eighth patients. *J Neurol* 1995;242:134-142.
30. Whiteley AM, Swash M, Urich H. Progressive encephalomyelitis with rigidity. *Brain* 1976;99:27-42.
31. Howell DA, Lees AJ, Toghill PJ. Spinal internuncial neurones in progressive encephalomyelitis with rigidity. *J neurol Neurosurg Psychiatry* 1979;42:773-785.
32. Campbell AMG, Garland H. Subacute myoclonic spinal neuronitis. *J neurol Neurosurg Psychiatry* 1956;19:268-274.

33. Martinelli P, Pazzaglia P, Montagna P, et al. Stiff-man syndrome associated with nocturnal myoclonus and epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1978;41:458-462.
34. Trethowan WH, Allsop JL, Turner B. The stiff-man syndrome. *Arch Neurol* 1960;3:114-122.
35. Nakamura N, Fujiya S, Yahara O, Fujioka Y, Kawakami Y. Stiff-man syndrome with spinal cord lesion. *Clin Neuropathol* 1986;5:40-46.
36. Armon C, Swanson JW, McLean JM, et al. Subacute encephalomyelitis presenting as stiff-person syndrome: clinical, polygraphic, and pathologic correlations. *Movement disorders* 1996;6:701-709.
37. Kasperek S, Zebrowski S. Stiff-man syndrome and encephalomyelitis: report of a case. *Arch Neurol* 1971;24:22-30.
38. Howard FM. A new and effective drug in the treatment of stiff-man syndrome. *Mayo Clin Proc* 1963;38:203-212.
39. Piccolo G, Cosi V, Zandrini C, Moglia A. Steroid-responsive and dependent stiff-man syndrome a clinical and electrophysiological study of two cases. *Ital J Neurol Sci* 1988;9:559-566.
40. Brashear HR, Phillips LH. Autoantibodies to GABAergic neurons and response to plasmapheresis in stiff-man syndrome. *Neurology* 1991;41:1588-1592.
41. Vicari AM, Folli F, Pozza G, et al. Plasmapheresis in the treatment of stiff-man syndrome. *N Engl J Med* 1989;320:1499.

42. Gordon MF, Pullman SL. Plasmapheresis in the treatment of stiff-man syndrome. *Neurol* 1991;41 (suppl 1):223.
43. Harding AE, Thompson PD, Kocen RS et al. Plasma exchange and immunosuppression in stiff-man syndrome (letter). *Lancet* 1989;2:915.
44. Karlson EW, Sudarsky L, Ruderman E, Pierson S, Scott M, Helfgott M. Treatment of stiff-man syndrome with intravenous immune globulin. *Arthr Rheum* 1994;37:915-918.
45. Seitz RJ, Blank B, Kiwit JCW, Benecke R. Stiff-person syndrome with anti-glutamic acid decarboxylase autoantibodies: complete remission of symptoms after intrathecal baclofen administration. *J Neurol* 1995;242:618.
46. Prevett MC, Brown P, Duncan JS. Improvement of stiff-man syndrome with vigabatrin. *Neurology* 1997;48:1133-34.
47. Tasker JG, Dudek FE. Electrophysiology of GABA-mediated synaptic transmission and possible roles in epilepsy. *Neurochem Res* 1991;16:251-262.
48. Young W. The stiff-man syndrome. *Br J Med Pract* 1966;20:507-510.
49. Bosi E, Vicari A, Comi G, et al. Association of stiff-man syndrome and type I diabetes with islet cells and other autoantibodies. *Arch Neurol* 1988;45:246-247.
50. Butler MH, Solimena M, Dirks R, Hayday A, De Camilli P. Identification of a dominant epitope of Glutamic acid decarboxylase (GAD-65) recognized by autoantibodies in Stiff-man syndrome. *J Exp Med* 1993;178:2097.

51. Kim J, Namchuk M, Bugawan T, et al. Higher autoantibody levels and recognition of a linear NH₂-terminal epitope in the autoantigen GAD 65, distinguish stiff-man syndrome from insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1994;180:595.
52. Daw K, Ujihara N, Atkinson M, Powers AC. Glutamic acid decarboxylase autoantibodies in stiff-man syndrome and insulin-dependent diabetes mellitus exhibit similarities and differences in epitope recognition. *The Journal of Immunology* 1996;156:818-825.
53. Folli F, Solimena M, Cofield R, et al. Autoantibodies to a 128-kD synaptic protein in three women with the stiff-man syndrome and breast cancer. *N Engl J Med* 1993;328:546-51.
54. Soliven BC, Lange DJ, Penn AS, et al. Seronegative myasthenia gravis. *Neurology* 1988;38:514-517.
55. Van Noorden S, Polak JM. Immunocytochemistry today techniques and practice. En: Polak JM, Van Noorden S, editores. *Immunocytochemistry practical application in pathology and biology*. Bristol: Wright 1983:11-42.
56. De Camilli P, Thomas A, Cofield R, et al. The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of stiff-man syndrome with breast cancer. *J Exp Med* 1993;178:2219-2223.
57. David C, Solimena M, De Camilli P. Autoimmunity in stiff-man syndrome with breast cancer is targeted to the C-terminal region of human amphiphysin, a

**ESPECTRO DE ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS ASOCIADAS A ANTICUERPOS ANTI-
GLUTAMATO DECARBOXILASA (GAD)**

- protein similar to the yeast proteins Rvs167 and Rvs161. FEBS Lett 1994;351:73-79.
58. Dropcho EJ. Anti-amphiphysin antibodies with small-cell lung carcinoma and paraneoplastic encephalomyelitis. Ann Neurol 1996;39:659-667.
59. Brown P, Rothwell JC, Marsden CD. The stiff leg syndrome. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1997;62:31-37.



Utrecht, March 17, 1999

Professor J. VAN GIJN
Joint Chief Editor

University Department of Neurology
University Hospital of Utrecht
P.O. Box 85500
NL-3508 GA Utrecht, The Netherlands

Fax (+31) 30-2542100
Phone (+31) 30-2507975
email j.vangijn@neuro.azu.nl

F. Graus, MD
Servei de Neurologia
Hospital Clinic. Villarroel 170
Barcelona 08036 Spain

Ms: 98-G159

Stiff-man syndrome with vacuolar degeneration of anterior horn motorneurons

Dear Dr. Graus,

Thank you for submitting a revised version of the above manuscript, with the covering letter in which you detailed the changes that have been made. I have read through both documents and conclude that you have adequately responded to the reviewers' comments.

I am happy to tell you that your article has now been accepted for publication as a Letter to the Editors (please note that this means we shall not include the Abstract) in the **Journal of Neurology**.

Your manuscript has been forwarded to the Technical Editor. He will review your text with special attention for clarity, consistency and style; if necessary he will make appropriate changes.

You will receive page proofs within 3-6 months. Please make sure that these are promptly dealt with, even if you are absent. Thank you again for submitting your work to the **Journal of Neurology**.

Yours sincerely,

J. van Gijn MD FRCPE
Co-Chief Editor
Journal of Neurology