Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Estudio inmunohistológico y electrofisiológico de la motoneurona en un modelo de transmisión pasiva de Esclerosis Lateral Amiotrófica

Fratantoni, Silvina Andrea

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Fratantoni, Silvina Andrea. (1999). Estudio inmunohistológico y electrofisiológico de la motoneurona en un modelo de transmisión pasiva de Esclerosis Lateral Amiotrófica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3181_Fratantoni.pdf

Cita tipo Chicago:
Fratantoni, Silvina Andrea. "Estudio inmunohistológico y electrofisiológico de la motoneurona en un modelo de transmisión pasiva de Esclerosis Lateral Amiotrófica". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3181_Fratantoni.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293
Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Tesis Doctoral

Título:

FCE y N BIBLIOTECA

Estudio inmunohistológico y electrofisiológico de la motoneurona en un modelo de transmisión pasiva de Esclerosis Lateral Amiotrófica

Autor: **Silvina Andrea Fratantoni**

Director: **Osvaldo Daniel Uchitel**

Lugar de trabajo:

Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Prof. Eduardo de Robertis, Facultad de Medicina, UBA (1992-1997)

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, F.C.E. y N., U.B.A.

(1998-1999)

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

-1999-

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Doctoral Thesis

Title:

Immunohistological and electrophysiological study of the motoneuron in a passive transfer model of Amyotrophic lateral sclerosis

Author: **Silvina Andrea Fratantoni**

Director: **Osvaldo Daniel Uchitel**

Laboratory:

Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Prof. Eduardo de Robertis, Facultad de Medicina, UBA (1992-1997)

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, F.C.E. y N., U.B.A.

(1998-1999)

-1999-

Agradecimientos:

Hace 10 años conocí a Osvaldo Uchitel como docente de la materia Fisiología del Sistema Nervioso. Desde el primer momento me asombró su capacidad de transmitir su entusiasmo por la neurobiología y especialmente por mostrar orgulloso el set-up de electrofisiología, según sus propias palabras "el alma del laboratorio". Cuando me presentó la posibilidad de desarrollar el tema de ELA, lo hizo depositando en mí su confianza y encaramos el desafío enorme de poner a punto técnicas que no eran de uso corriente en su laboratorio. Fue duro pero creo que salimos airosos. Gracias Osvaldo por apoyarme cuando los resultados eran difíciles de interpretar y por formarme en esta diaria tarea de crear y asombrarse.

A mis compañeros de laboratorio etapa Medicina les debo muchas alegrías, almuerzos increíbles y mucho tiempo dedicado a solucionar problemas de todo tipo. Vero, Fabi, Daro, Marce, Dani, Eleo, Pablo, Gise, Carlitos, Vivi, Guille, Ramiro y Paula, gracias por todos esos años de amistad, convivencia, afecto e innumerables ayudas. A mis compañeros de ahora les quiero agradecer entre otras cosas que me mantegan joven con disparates diarios muy divertidos. Urbano, Rafael, Silvana, Joaquín y nuevamente Marce, gracias.

Gracias a todos los investigadores, becarios, personal asistente y amigos del IBC y del LFBM, por todos los momentos que pasamos juntos, por su colaboración y su paciencia.

Agradezco a Ricardo Reisin y Ana Pardal por la dedicación que ponen en la difícil tarea de ser buenos médicos de pacientes tan especiales como son los de ELA y por ser mejores personas con ellos y con nosotros. Además gracias personales a Ricardo quien no dudó nunca en decir: acá estoy para lo que necesites.

Gracias a la Dra. Analía Taratutto y su gente (Susana y Marcelo), por la buena onda de siempre para dar, prestar, cortar y hasta mirar mis preparados.

Gracias al Dr. Margni y personal de la Cátedra de Inmunología de la FFyB por ayudarme y enseñarme a purificar IgG.

Agradezco a la Universidad de Buenos Aires por haber creado las becas de investigación, cuyo estipendio es el único en todos los estamentos de la ciencia argentina que esta a la altura de los standards internacionales. Y gracias por haberme concedido sucesivas becas desde 1992 hasta hoy.

A Marta Ferresini le quiero agradecer que desde 1991 me escucha, me contiene y me da pañuelitos cuando aparecen las lágrimas.

A Flavia y Alicia les quiero agradecer por ser mis buenas amigas desde la época de estudiantes cuando nos divertíamos como locas estudiando la materia de turno. Gracias Fabi y Vero, amigas a la distancia, via e-mail pero cerca, bien cerca.

Gracias, Charlie, por ser mi Almafuerte de mesa de luz, que nunca escatimó palabras de apoyo y cariño, y que me las dijo al oído tantas veces como fue necesario para que termine esta etapa. Gracias por valorarme y por ser mucho corazón.

Si tengo que ser sincera, mi hijo Tommy no me ayudó en la tesis. Pero gracias a Tommy soy una persona muy distinta desde que él nació. Me llena de un amor increíble y me impulsa a tratar de ser mejor en cada cosa que emprenda. Seguí siendo tan dulce por favor...

Gracias a mis geniales abuelas Juani y Emma, por ser auténticas, dulces, cariñosas y desinteresadas. Gracias hermanito Herni por estar siempre.

Infinitas gracias Mamá, infinitas gracias Papá, por ser únicos en este mundo. No tengo palabras para decirles cuanto los necesito, para decirles cuanto los admiro. Son lo mejor que me pudo pasar y seguiremos muy juntos apoyándonos en todo momento.

Silvina, Junio de 1999

Resumen

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es la enfermedad neuromotora humana más común. Los individuos que la padecen muestran disfunción y degeneración progresiva de motoneuronas cerebrales, de la protuberancia y de la médula espinal lo cual se manifiesta clínicamente como una debilidad muscular progresiva, parálisis y muerte dentro de los 3 a 5 años del diagnóstico. No existe una cura para esta enfermedad y su patofisiología permanece sin aclarar.

Evidencias clínicas y experimentales apoyan la posibilidad de que un mecanismo autoinmune esté involucrado en la patogénesis de ELA. En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se ha demostrado que la aplicación de inmunoglobulina G (IgG) de pacientes con ELA sobre terminales motores inducen una disfunción de la transmisión neuromuscular.

Estudios animales han establecido que fisiológicamente la IgG y otras proteínas séricas endógenas son endocitadas por los terminales nerviosos de la placa neuromuscular. Estas proteínas pueden ser localizadas por técnicas inmunocitoquímicas en los somas donde se acumulan luego de ser transportadas por transporte axonal retrógrado.

El objetivo de la primera parte de la tesis fue analizar si la captación de IgG es cuantitativamente diferente en el caso que la misma provenga de pacientes con ELA o de IgG controles (pacientes con otras enfermedades neurológicas o personas sanas).

Para ello, hemos investigado la presencia de IgG humana de pacientes con ELA e IgG control en los somas de las motoneuronas de ratón. La IgG fue aplicada sobre los terminales motores del músculo elevador de la oreja del ratón, Levator auris longus, el cual está inervado por una rama del nervio facial.

La fracción sérica de 7 pacientes con ELA, 6 sujetos controles y 3 pacientes con otras enfermedades neurológicas fue inyectada subcutáneamente dos veces por día durante 5 días (50 μl cada vez de una solución de IgG 20 mg/ml).

Secciones del tallo cerebral conteniendo el núcleo del facial fueron procesadas por inmunocitoquímica para detectar IgG humana y la inmunotinción fue cuantificada con un analizador de imágenes. Para todas las IgG consideradas, la tinción en las motoneuronas del núcleo del facial del lado ipsilateral al sitio de la inyección fue significativamente más intensa.

En los animales tratados con IgG de ELA, la marca ipsilateral fue significativamente más alta que la encontrada en el lado ipsilateral de los animales inyectados con IgG control. Nuestros resultados son compatibles con el concepto de que las motoneuronas preferencialmente captan, transportan y/o acumulan IgG de ELA. La captación de anticuerpos patogénicos por terminales motores podrían tener un rol en la patogénesis de la enfermedad de la motoneurona.

Para definir el posible rol de las IgG de ELA en la inducción de la disfunción de la transmisión neuromuscular, fue nuestro interés estudiar si la participación de canales de calcio voltaje dependientes (CCVD) puede ser alterada por la transmisión pasiva dichos anticuerpos.

En la placa neuromuscular de humanos adultos y también en la placa de ratón, la transmisión sináptica está mediada por la entrada de calcio a través de CCVD del tipo P/Q. Otros canales de calcio, como los de tipo L y N, no están involucrados en la liberación de neurotransmisor. Sin embargo, en nervios en regeneración, la conducción de señales y la transmisión sináptica se hacen altamente sensibles a la nitrendipina, una dihidropiridina bloqueante de los canales de calcio de tipo L, sugiriendo que este canal estaría involucrado en la liberación de neurotransmisor.

A fin de estudiar si la aplicación de IgG humana sobre los terminales motores induce cambios en la transmisión neuromuscular, IgG de pacientes con ELA y de sujetos controles fue inyectada subcutáneamente sobre el músculo Levator auris del ratón.

La fracción sérica de 8 pacientes con ELA y 6 sujetos controles (3 sujetos sanos y 3 pacientes con otras enfermedades neurológicas) fue inyectada subcutáneamente dos veces por día durante 5 días (50 μl cada vez de una solución de IgG 20 mg/ml). Una semana o un mes después de la última inyección, los ratones fueron anestesiados y los músculos removidos en solución Ringer normal. El músculo fue montado en una cámara de registro y el nervio fue estimulado por medio de un electrodo de succión. Los potenciales de placa fueron registrados en por lo menos 15 fibras musculares distintas antes y después de la incubación con Nitrendipina 1 μM o toxinas polipeptídicas. El contenido cuántico de la respuesta evocada fue evaluado por el método de la varianza.

No se observaron cambios en el contenido cuántico de la liberación de neurotransmisor. En los músculos tratados con IgG de ELA o IgG control, la liberación del neurotransmisor permaneció sensible a los bloqueantes de CCVD de tipo P/Q e insensibles al bloqueante de tipo N, como ocurre en los músculos sin tratar. En contraste, las IgG de 5 pacientes distintos de ELA indujeron una reducción significativa en el contenido cuántico de la respuesta evocada luego de la aplicación de Nitrendipina. Esto indicaría que una sensibilidad nueva a este bloqueante de CCVD aparece en los terminales tratados con IgG de pacientes con ELA. Estos resultados sugieren la participación del canal de calcio voltaje dependiente de tipo L en el proceso que llevaría a la muerte neuronal inducida por las inmunoglobulinas de ELA.

Palabras Clave:

Esclerosis Lateral Amiotrófica
Transmisión neuromuscular
Motoneuronas
Placa neuromuscular
Canales de calcio
Nitrendipina

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common human motor neuron disease. Affected individuals show progressive dysfunction and degeneration of brain, brainstem and spinal cord motor neurons, clinically manifested as progressive muscular weakness, paralysis and death within a mean of 3 years. There is no cure available for this disease and its pathophysiology remains unclear.

Clinical and experimental evidence support an autoimmune etiopathogenesis for ALS. Previous studies in our laboratory have shown that local application of immunoglobulin G (IgG) of ALS patients onto nerve terminals induces dysfunction in neuromuscular transmission. In animal studies, it has been established that endogenous IgG and other circulating serum proteins can be taken up by motor nerve terminals. They can be detected by immunocitochemistry in the motoneurons somas where they accumulate following retrograde axonal transport. We investigated the presence of human ALS and control IgG in the soma of mice motoneurons. IgG was applied onto motor nerve terminals by injections on the levator auris longus muscle which is innervated by a branch of the facial nerve.

The seric IgG fraction of 7 ALS patients, 6 control subjects and 3 patients with other neurological diseases was injected subcutaenously, twice a day for 5 days, on the surface of the left Levator auris longus muscle of adult mice (50 μl of 20 mg/ml IgG in PBS per application).

Sections of the brainstem containing the facial nuclei were immunoprocessed to detect human IgG. For all IgG tested, motoneuron labeling was significantly more intense in the facial nucleus ipsilateral to the site of injection. In ALS-IgG-treated animals, ipsilateral labeling was significantly stronger than that found on the ipsilateral side of control IgG-treated animals. Our results are compatible with the concept that motoneurons preferentially take up, transport and/or accumulate ALS-IgG. Uptake of pathogenic antibodies by motoneuron terminals may play a role in the pathogenesis of motoneuron disease.

At both the mature mouse and human neuromuscular junction, synaptic transmission is mediated by Ca^{2+} entry through voltage-sensitive calcium channels (VSCCs) of the P/Q-type family. Other

calcium channels, like the L- and N-type, are not involved in neurotransmitter release. However, in regenerating nerves, signal conduction and synaptic transmission become highly sensitive to Nitrendipine, a dihydropyridine antagonist of L-type calcium channel, suggesting that this type of calcium channel mediate transmitter release.

Therefore, to further define the possible role of ALS IgG in the induction of NMJ dysfunction, it was our interest to study if the participation of other types of VSCCs in transmitter release can be induced by passively transferring these antibodies, as it was found in regenerating NMJ.

In order to search for early changes induced by the application of human IgG onto the motor nerve terminals, IgG from ALS patients and control subjects was injected on the mice Levator auris muscle.

The seric IgG fraction of 8 ALS patients and 6 control subjects (3 healthy subjects and 3 with other neurological diseases) was injected subcutaenously, twice a day for 5 days, on the surface of the left Levator auris longus muscle of adult mice (50 μl of 20 mg/ml IgG in PBS per application). A week or a month after the last injection, mice were anesthetized and the muscle removed in Normal Ringer solution. The muscle was mounted in a recording chamber and the nerve was stimulated by a suction electrode. The end plate potentials were recorded from at least 15 different muscle fibers before and after the incubation with 1 μM Nitrendipine or polipeptidic toxins. The mean quantal content of the evoked response was evaluated by the coefficient of variation method.

No changes in quantal content of transmitter release were observed. In control and ALS IgG treated muscles, neurotransmitter release remained sensitive to P/Q-type and insensitive to N-type VSCC blockers as in untreated muscles. In contrast, IgG from 5 of 8 different ALS patients induced a significant reduction in the quantal content of the evoked response after the incubation with Nitrendipine, indicating that a novel sensitivity to this calcium channel blocker appears in these motor nerve terminals. These results suggest the involvement of L-type VSCC in the process leading to neuronal death induced by ALS IgG.

Key words:

Amyotrophic lateral sclerosis

Neuromuscular transmission

Motoneurons

Neuromuscular junction

Calcium channels

Nitrendipine

Abreviaturas utilizadas en el texto

°C	grados centígrados
μl	microlitros
μM	micromolar
BoTx-A	Toxina botulínica de tipo A
Ca^{2+}	calcio
DEAE	dietilaminoetil celulosa
DHP	dihidropiridina
DMSO	dimetilsulfóxido
d-Tc	d-Tubocurarina
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
EPPs	Potenciales evocados de placa
hr	hora
HVA	high voltage activated (alto umbral de activación)
Hz	Hertz
ICQ	inmunocitoquímica
I.P.	intraperitoneal
IgG	inmunoglobulina G
LVA	low voltage activated (bajo umbral de activación)
m	contenido cuántico
MΩ	megaohms
MEPPs	potenciales de placa miniatura
min.	minutos
ml	mililitros
mM	milimolar
M&M	materiales y métodos
MN	motoneurona
MNi	motoneurona inferior
MNs	motoneurona superior
mV	milivolts
PBS	Buffer salino fosfato
pH	-log [H^+]
S	desvío estándar
SNC	sistema nervioso central
V	amplitud media del EPP
v/v	volumen en volumen
Vm	potential de reposo de membrana
CCVD	canales de calcio voltaje dependientes
ω-Aga-IVA	ω-Agatoxin-IVA
ω-CgTX-GVIA	ω-Conotoxin-GVIA

INTRODUCCION

INTRODUCCION

El sistema nervioso es el órgano más complejo del organismo y uno de los sistemas de integración y coordinación de las funciones de los demás órganos especializados. Existen numerosas patologías humanas en las cuales se ve afectado de alguna manera el sistema nervioso. La información acerca de como responden las células nerviosas a un daño o injuria, entre otros aspectos de la neurobiología, le permite a los médicos clínicos diagnosticar y entender las manifestaciones de las enfermedades neurológicas humanas. Cada vez que los investigadores aprendemos algo acerca del sistema nervioso, nos acercamos a la prevención y/o mejoramiento del sufrimiento que provocan las enfermedades de dicho sistema. De manera recíproca, las manifestaciones de estas enfermedades nos ayudan a comprender como funciona el sistema nervioso. En el caso de las enfermedades neuromusculares este beneficio mutuo entre la ciencia básica y la clínica es muy evidente.

Los movimientos voluntarios (que nos permiten desarrollar los comportamientos más diversos como escribir, caminar, etc.) son ejecutados por las neuronas denominadas alfa-motoneuronas (MN) y que son las encargadas de controlar a los músculos esqueléticos. Las motoneuronas residen en el sistema nervioso central, con un soma o cuerpo de tamaño considerable que contiene al núcleo. Poseen un axón que es el que se proyecta hacia la periferia y en el caso de las motoneuronas este axón se conecta al músculo en una unión particular denominada placa neuromuscular.

Hay dos tipos de MN; las MN inferiores (MNi) que se encuentran en médula espinal (espinales) y tallo cerebral (craneales) inervan a músculos esqueléticos y las MN superiores (MNs) que se sitúan en regiones superiores del cerebro (corteza) actúan sobre las MN inferiores controlando la ejecución de los movimientos voluntarios. La comunicación entre las MNs e MNi está dada por tres sistemas motores descendentes que inervan a las MNi (espinales y craneales). Uno se origina directamente en la corteza cerebral, el sistema piramidal y está constituido por las proyecciones corticoespinales y corticobulbares y los otros dos lo hacen en el tallo cerebral, el sistema dorso lateral y el ventromedial, que son los equivalentes del sistema extrapiramidal. Las fibras del sistema piramidal se originan en

las neuronas piramidales del área motora primaria.

Los humanos pueden padecer enfermedades que afectan a las motoneuronas, las cuales tienen también un efecto secundario en los músculos esqueléticos correspondientes. Algunos pacientes presentan cambios profundos en los somas neuronales o en los axones periféricos pero solo pequeños cambios en las fibras musculares. Estas enfermedades son denominadas "neurogénicas" y se dividen en aquellas que afectan preferentemente los somas (enfermedades de la motoneurona) y aquellas que afectan los axones periféricos (neuropatías periféricas).
Otros pacientes, en los cuales ocurre degeneración de los músculos con poco cambio en MN o axones, presentan lo que se denomina enfermedades miopáticas.
La Esclerosis Lateral Amiotrófica es una de las enfermedades neurogénicas más conocidas. Es un síndrome neurológico progresivo y fatal en el cual hay en el cual hay pérdida de MN, lo cual produce en el paciente debilidad muscular progresiva y finaliza con la muerte. Aunque los mecanismos de la patogenicidad de la ELA permanecen deconocidos, exsiten numerosas hipótesis que intentan elucidar que causa la muerte específica de las MN. Asimismo no se sabe todavía si se ve afectado primero el soma de la MN o su terminal nervioso en contacto con el músculo. Este contacto nervio-músculo, denominado placa neuromuscular podría ser uno de los sitios implicados en la etiología de la enfermedad ya que los pacientes presentan una falla en la transmision neuromuscular. En la siguiente sección se desarrollará su estructura y fisiología en detalle y más adelante se comentarán las características de la enfermedad.

Aspectos generales de la transmisión sináptica
Fisiología de la transmisión neuromuscular

Las neuronas tienen la habilidad de comunicarse rápida y precisamente entre ellas o con células no neuronales tales como las células musculares y glandulares.

La comunicación entre dos neuronas o de una neurona con una fibra muscular se realiza en una zona especializada de contacto, denominada sinapsis. Sobre la base de la morfología de

la zona de aposición de ambas células se divide a las sinapsis en dos tipos. Las sinapsis eléctricas, en las cuales ambas células tienen los citoplasmas conectados y las sinapsis químicas, las cuales presentan una brecha discreta (espacio sináptico) de aproximadamente 50 nm entre ambas.

La mayoría de las sinapsis corresponden a esta última característica y una neurona (celula "transmisora" o presináptica) libera una sustancia biológicamente activa (un neurotrasmisor) que provoca una respuesta excitatoria o inhibitoria en una segunda celula (receptora o postsináptica).

El proceso de liberación del mensajero químico es normalmente llamado neurotransmisión o transmisión sináptica y es considerado un fenómeno nodal en el funcionamiento del sistema nervioso.

Una sinapsis muy estudiada es la **placa motora o neuromuscular** donde ocurre un contacto entre el terminal nervioso de una neurona motora (presinapsis) y el músculo estriado esquelético (postsinapsis).

Estructura de la placa neuromuscular

Las fibras musculares esqueléticas de los vertebrados son células cilíndricas, alargadas y multinucleadas. Cada fibra está inervada por una rama del axón de una motoneurona cuyo cuerpo se encuentra en la médula espinal o en el tallo cerebral.

En las cercanías del músculo el nervio pierde la vaina de mielina que lo recubre, y comienza a formar botones o ramificaciones terminales que se ponen en estrecho contacto con la superficie de la fibra muscular a inervar (Couteaux, 1960).

En el citoplasma de estos terminales nerviosos se encuentran abundantes mitocondrias y un gran número de vesículas esféricas en las que se acumula el neurotransmisor característico, la acetilcolina (Ach) (De Robertis, 1967).

Las regiones de la membrana presináptica ligeramente engrosadas sobre las cuales están agrupadas las vesículas sinápticas dentro del terminal nervioso, son llamadas "zonas activas de liberación" La estructura de las zonas activas comprende un área de membrana especializada, un ensamblado particular de vesículas sinápticas y estructuras responsables

del reciclaje local de la membrana de las vesículas (Smith & Agustine 1988).
En la fibra muscular, en la zona donde está en contacto con el terminal nervioso, aparece una estructura modificada con una gran concentración de núcleos y mitocondrias, denominada **placa motora o neuromuscular**. En esta zona, la membrana plasmática de la fibra muscular se pliega en forma radial a fin de aumentar la superficie de contacto con el terminal nervioso y en estos pliegues se concentran los receptores nicotínicos de acetilcolina (Fertuck y Salpeter, 1974). Las zonas activas de liberación de encuentran justamente enfrentadas con estos pliegues de la membrana postsináptica donde se halla la mayor concentración de receptores de Ach.
Claras evidencias senalan que las vesículas liberan su contenido fusionándose con la membrana presináptica a lo largo de las zonas activas, mediante un proceso de exocitosis (Couteaux y Pecot-Déchavassine 1970, Peper y col.,1974).

En la brecha sináptica hay un material extracelular, la lámina basal, que sigue completamente los contornos de la superficie de la fibra muscular. En ella se concentra la acetilcolinesterasa, enzima que degrada la Ach, impidiendo que se prolongue su acción sobre el receptor post-sináptico.

Transmisión neuromuscular

Se ha demostrado que la relación entre la actividad eléctrica de la célula y la liberación de neurotransmisor no es directa sino que se produce a través de un intermediario, el ion calcio.
En la placa neuromuscular de los vertebrados, la llegada de un potencial de acción al terminal sináptico induce una secuencia ordenada de eventos. La llegada de dicho potencial de acción al terminal presináptico causa la apertura de canales de calcio voltaje dependientes (CCVD) de la zona activa. La entrada de Ca^{2+} a través de ellos, produce una alta concentración de Ca^{2+} espacial y temporalmente localizada en dicha zona (generación de microdominios), y a través de un complejo mecanismo (todavía desconocido) se produce la fusión de las vesículas que contienen neurotransmisor a la membrana citoplasmática y la liberación de su contenido al espacio sináptico.

Las moléculas de Ach difunden por el espacio sináptico y se unen a los receptores presentes en la membrana postsináptica. La proteína receptora de la Ach es una proteína que atraviesa la membrana, la cual contiene un sitio de unión al neurotransmisor y un canal iónico (Changeaux, 1990). Cuando se une el neurotransmisor, este receptor cambia su conformación y permite el paso de iones de sodio y la consecuente despolarización de la célula postsináptica (Takeuchi y Takeuchi, 1960)

Esta despolarización (respuesta excitatoria) recibe el nombre de potencial de placa (EPP) y en condiciones normales esta despolarización alcanza el umbral de activación de los canales de Na^{+} voltaje dependientes presentes en la membrana de la fibra muscular, lo cual inicia un potencial de acción propagado que culmina en la contracción muscular (Aidley, 1960). Sin embargo cuando se agrega a la solución del baño una apropiada cantidad de curare (sustancia que impide la unión de la Ach a su receptor), el EPP es reducido en amplitud hacia niveles subumbrales, y el potencial de acción desaparece. Recién en estas condiciones es observable el EPP que de otra forma queda solapado por el potencial de acción. Los EPPs presentan como principal característica un decaimiento electrotónico, es decir que su amplitud decae y la señal se enlentece a medida que el electrodo de registro se ubica lejos de la región de las placas (Fatt & Katz 1951).

Rol del Ca^{2+} en la liberación

La depolarización no alcanza por si misma para producir la liberación del nt. Se requiere además la presencia de iones calcio en el medio extracelular.

La depolarización parece ser el mecanismo a través del cual se induce un flujo de iones calcio hacia el interior de la terminación presináptica. En todos los procesos secretores estudiados, el aumento de la concentración de calcio en el interior de la célula secretora desencadena la secreción.

La entrada de Ca^{2+} al terminal nervioso a través de los CCVD cumple un rol esencial en el proceso de transmisión sináptica y es aceptada como el paso de acoplamiento entre la despolarización producida por el potencial de acción, que viaja a través del nervio, y la posterior secuencia de eventos que llevan a la liberación de neurotransmisor.

Si la concentración de calcio extracelular es nula, no se produce la liberación del neurotransmisor (del Castillo y Stark, 1952) y además dicha secreción es una función de la concentración de Ca^{2+} intracelular (Llinás y col.1982). El calcio debe estar presente en el momento que llega la despolarización al terminal (Katz y Miledi 1967). Su efecto como promotor de la liberación es antagonizado por iones que bloquean la entrada de calcio, como por ejemplo el catión Mg^{2+}, Mn^{2+} y Co^{2+}

Las vesículas que contienen al neurotransmisor se encuentran, como ya se mencionó, agrupadas alrededor de las zonas activas en las cuales se demostró la existencia de grandes partículas transmembranales (Heuser y col., 1974), cuya densidad podría coincidir con el número de canales de Ca^{2+} necesarios para la liberación de neurotransmisor (Pumplin y col.1981).

Liberación cuántica de neurotransmisor

En 1952 Paul Fatt y Bernard Katz encontraron, al insertar un microelectrodo de registro en fibras musculares en reposo, que las zonas de las placas presentan actividad eléctrica espontánea por debajo del umbral de activación del potencial de acción. Estos cambios en el potencial ocurrían en forma espontanea e irregular, poseían una amplitud de 0,5-1 mV, y decaían electrotónicamente en el espacio. Los mismos fueron denominados potenciales de placa miniaturas (MEPPs) y en otras zonas de la fibra muscular esta actividad espontánea no era observada.

Estos resultados sugirieron que esos potenciales se debían a la liberación espontánea de una cantidad discreta de Ach (del Castillo y Katz, 1954 a). Katz y colaboradores concluyeron que un MEPP es el producto de la exocitosis de una única vesícula que contiene numerosas moléculas de Ach. A este paquete multimolecular, se lo denominó **cuanto**. Un paquete o cuanto es la unidad más pequeña en la cual el neurotransmisor es secretado y representa el contenido de una única vesícula sináptica.

En experimentos posteriores, Kuffler y Yoshikami (1975), evaluaron que la cantidad de Ach contenida en cada vesícula sináptica era de aproximadamente 10.000 moléculas.

Potenciales evocados

Fatt y Katz (1952) también observaron que en determinadas condiciones iónicas extracelulares (baja concentracion de calcio con respecto al magnesio) y ante el estímulo del nervio, los potenciales evocados fluctuaban en forma escalonada (múltiplos de la unidad), encontrándose a veces respuesta de 1 mV y otras veces ninguna respuesta. Fatt y Katz propusieron entonces que estos potenciales espontáneos eran los elementos o unidades (como si fueran ladrillos) a partir de los cuales estaban compuestos los potenciales logrados por estimulación del nervio (evocados neuralmente).

Estudios de del Castillo y Katz (1954b), en los cuales se estudiaron las fluctuaciones de los potenciales evocados en soluciones con distintas concentraciones de $Ca^{2\cdot}$ y $Mg^{2\cdot}$, les permitieron confirmar que la respuesta evocada estaba siempre compuesta de las unidades cuánticas (MEPPs). La liberación evocada es siempre un múltiplo de la unidad cuántica.

En todas las sinapsis químicas estudiadas hasta el momento, la liberación de transmisor es cuántica. Cada paquete o cuanto, produce un cambio unitario fijo en la membrana postsináptica (potencial unitario). El potencial sináptico normal está dado por la suma de números variables de estos potenciales unitarios.

Normalmente, el potencial de placa está formado por 200 unidades o paquetes. En la liberación evocada luego de la estimulación del nervio, también la liberación es en cuantos y el número de cuantos liberado depende de la concentración de calcio que entra al terminal y por lo tanto depende de la concentración de calcio extracelular.

La concentración de calcio que entra al terminal no afecta el número de moléculas de Ach en cada cuanto (la vesícula) pero sí la probabilidad de que un cuanto sea liberado y por lo tanto si entra más calcio al terminal, más cuantos son liberados.

Estas vesículas sinápticas, de aprox. 50 nm de diámetro, han sido luego encontradas en todas las sinapsis químicas estudiadas. Estudios de fraccionamiento subcelular de terminales colinérgicos conjuntamente con ensayos bioquímicos mostraron que la mayor parte de la Ach se halla concentrada en estas vesículas sinápticas (Whittaker y Zimmermann, 1974).

Del Castillo y Katz (1954b) propusieron que las fluctuaciones de las amplitudes de los EPPs ocurrían al azar y que estas fluctuaciones podían predecirse por métodos estadísticos. Formularon entonces lo que se conoce como Hipótesis Cuántica de la Liberación, en la cual postularon que en cada placa neuromuscular existe una población de n unidades capaces de responder a un estímulo nervioso, y que la probabilidad media de responder es p. El contenido cuántico promedio por impulso (m) sería

$$m \quad np.$$

Un problema de la suposición de una distribución binomial era que los correlatos físicos del n y p, no podían ser claramente establecidos. Estos autores propusieron que en condiciones normales p sería bastante grande pero que si se disminuía el Ca y se aumentaba el Mg, la p sería lo suficientemente pequeña como para que la liberación siguiese una distribución de Poisson, con lo cual no se necesitaba conocer n y p; sólo se requería evaluar la media de la distribución (del Castillo y Katz 1954b; Katz 1969).

Clasificación de los diversos tipos de CCVD

La actividad eléctrica de todas las células y en especial de las neuronas depende del movimiento de carga, llevada por pequeños iones inorgánicos a través de la membrana plasmática. La manera en que estos iones atraviesan la misma es mayormente a través de canales iónicos, una clase especial de proteínas de membrana muy ubicuas. En algunos casos, estos canales forman poros hidrofílicos a través de los cuales los iones fluyen de un lado a otro de la membrana de acuerdo a su gradiente de concentración. En una misma neurona puede haber diferentes canales iónicos y se clasifican de acuerdo a diferentes criterios como farmacología, conductancia, modo de apertura y selectividad al ion.

Los canales no son poros inertes en la membrana sino que son entidades dinámicas que pueden pasar por transiciones rápidas entre el estado abierto (en el cual pasan iones) y el cerrado. La apertura de muchos canales, particularmente aquellos que modulan el comportamiento eléctrico de la neurona son sensibles a cambios en el potencial o voltaje de membrana, y son llamados canales voltaje dependientes.

El acople entre la llegada del impulso nervioso y la liberación del neurotransmisor es mediado por el aumento transitorio de calcio en el terminal presináptico (Katz, 1969). Este

aumento ocurre principalmente por influjo de calcio desde el medio extracelular a través de canales de calcio, los cuales se activan en respuesta a la despolarización provocada por el potencial de acción (Llinás, 1991). En los últimos 10 años se realizaron estudios que revelaron la existencia de diversos canales de Ca^{2+} con una gran riqueza y complejidad estructural, lo cual sugiere que existe una especialización funcional de los distintos canales de Ca^{2+} (Catterall 1995, Dunlap y col., 1995, Reuter, 1996). Además del rol fundamental que tienen los flujos de Ca en la excitabilidad neuronal y la liberación de neurotransmisor, los cambios de Ca^{2+} intracelular están involucrados en la regulación de eventos tan diversos de la fisiología celular como la supervivencia neuronal, el crecimiento neurítico, la motilidad del citoesqueleto, la eficacia sináptica y la expresión de algunos genes (Ghosh y Greenberg, 1995).

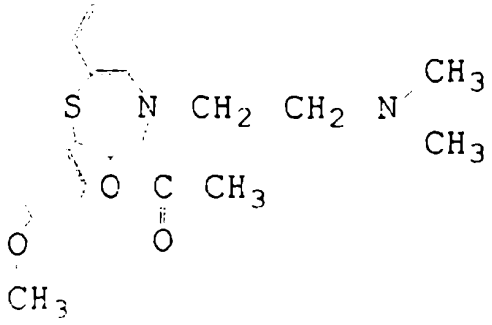
Herramientas farmacológicas para el estudio de los canales de Ca^{2+}

La farmacología de los CCVD es extremedamente compleja, lo cual se pone en evidencia por la enorme diversidad de iones y compuestos orgánicos que pueden alterar sus propiedades y por las diversas formas en que los agentes farmacológicos interactúan con los CCVD. Los iones y ligandos se pueden unir tanto a sitios regulatorios intracelulares o extracelulares no asociados con el poro iónico como a sitios dentro del poro y obstruir el acceso al mismo (Scott y col., 1991)

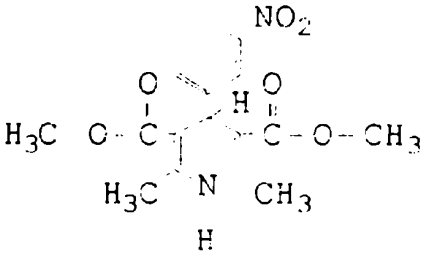
Drogas antagonistas de los canales de Ca^{2+}

Compuestos orgánicos:

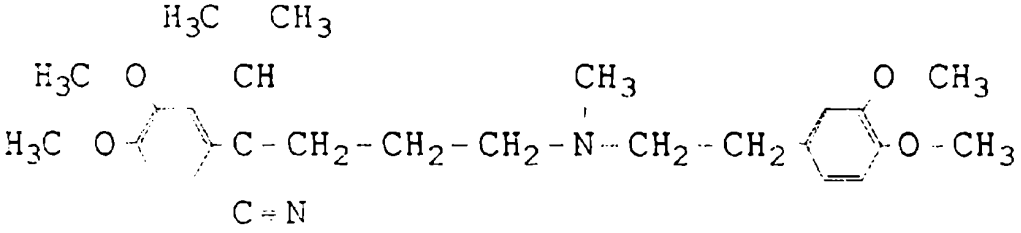
Existen tres clases principales de compuestos orgánicos bloqueantes de canales de Ca: las fenilalquilaminas, las dihidropiridinas (DHPs) y las benzotiazepinas. La mayoría de estos compuestos afectan principalmente a los canales de tipo L. Las DHPs son los ligandos más comúnmente utilizados siendo los más conocidos la nifedipina, la nitrendipina y la nicardipina. Estos son los compuestos más selectivos y los que permitieron purificar, caracterizar y clonar los canales de tipo L.



DILTIAZEM
(benzotiazepina)



NITRENDIPINA
(dihidropiridina)



VERAPAMIL
(fenilalquilamina)

Estructuras representativas de los bloqueantes de canales de tipo L

Toxinas derivadas del veneno de animales predadores:

Muchos venenos de animales (tanto marinos como terrestres) ejercen sus efectos tóxicos interfiriendo con procesos fisiológicos claves para la sobrevida de la presa. A partir de la purificación de los componentes químicos presentes en estos venenos, se encontraron diferentes componentes con capacidad de bloquear específicamente distintos tipos de canales iónicos.

El grupo de toxinas peptídicas obtenidas a partir de venenos de animales cuyo blanco de acción y sitio de unión son los canales CCVD se conocen como las ω-toxinas. En el veneno de varias especies de predadores, que mediante el mismo paralizan a su presa, existen

distintas toxinas que se unen específicamente a muchos de estos canales (Olivera y col., 1994). Estas toxinas naturales y otras sintéticas (Dunlap y col., 1995) han sido herramientas muy útiles para la identificación del rol de los diferentes VDCC en la transmisión sináptica.

Características moleculares de los CCVD

A pesar del alto grado de diversidad, los CCVD presentan un conjunto común de elementos estructurales. Los mismos han sido caracterizados principalmente en base de canales de calcio de los túbulos T del músculo esquelético donde existe una elevada expresión de canales de calcio.

Los CCVD son complejos de proteínas heteroméricas conformados por cuatro subunidades (α_1, α_2/δ, β y γ). La subunidad $\alpha 1$ que forma el poro por el cual permean los iones Ca^{2+} está asociada con las subunidades β y la $\alpha 2$-δ. Existe una subunidad γ, la cual sólo se expresa en el músculo esquelético (Catterall, 1995). Ver figura en página siguiente.

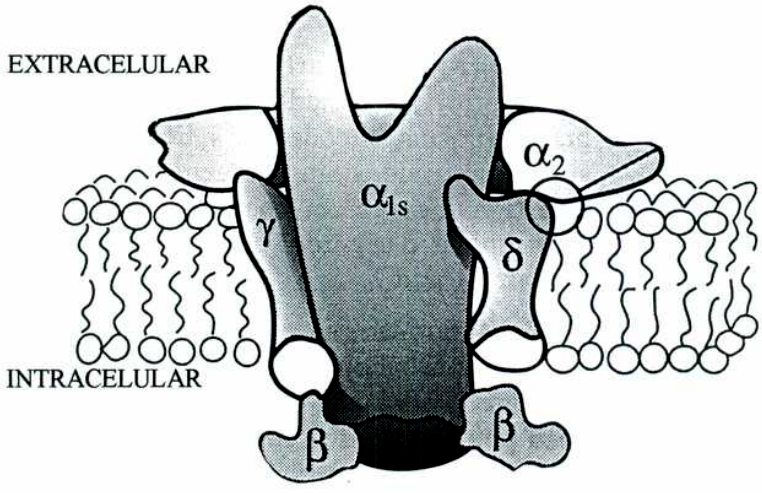
La subunidad $\alpha 1$, la cual es también sitio de unión de los distintos agonistas y antagonistas de los CCVD, es una proteína de aprox. 175 kDa, que contiene 4 dominios homólogos unidos por secuencias de aminoácidos que forman bucles o loops intracelulares. Cada dominio presenta seis regiones transmembranales putativas (S1-S6).

Al presente se conocen al menos 19 subunidades $\alpha 1$ estructuralmente diferentes, 16 de las cuales se expresan en el sistema nervioso (Catterall 1995; Dunlap y col, 1995; Reuter, 1996). Esta gran diversidad de canales puede ser atribuida no sólo al hecho de que las distintas subunidades $\alpha 1$ son codificadas por al menos seis genes diferentes sino a que además se sabe que presentan splicing alternativo.

A través de técnicas de biología molecular, se descubre un número cada vez mayor de subunidades de estos canales, las cuales están ampliamente distribuidas en el SNC.

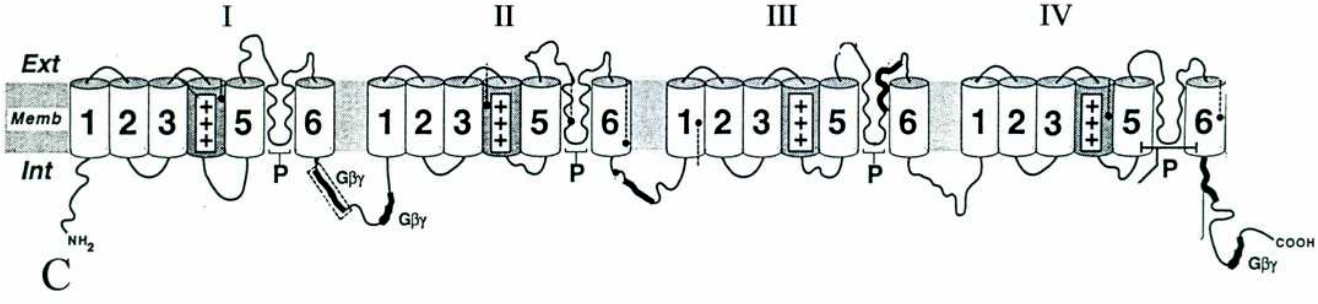
CANAL DE CALCIO VOLTAJE DEPENDIENTE

A



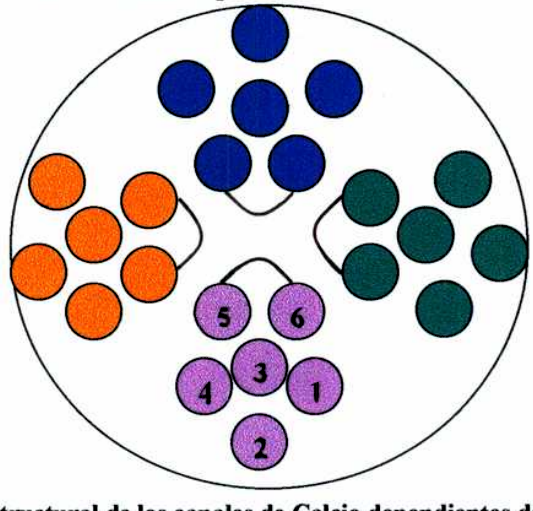
B

SUBUNIDAD α_1 CON SUS CUATRO DOMINIOS



C

ENSAMBLADO DE LA SUBUNIDAD α_1



Modelo estructural de los canales de Calcio dependientes de voltaje

A- Esquema de la disposición aparente en la membrana plasmática de las distintas subunidades (α_1,β, α_2,δ,γ) que conforman a los CCVD. Modelo obtenido del libro The Ion channel Facts Book IV. **B-** Esquema de la subunidad $\alpha_1$donde se distinguen los cuatro dominios (I-IV) con sus correspondientes regiones transmembranales putativas (1-6). Los segmentos con signos +, son los sensores de voltaje. La letra P indica los dominios formadores del poro. **C- R**epresentación de la disposición aparente de las regiones transmembranales de la subunidad $\alpha_1$en la membrana plasmática.

Diversidad

Sobre la base de las propiedades fisiológicas y farmacológicas se han identificado por lo menos 6 tipos distintos de canales de calcio voltaje dependiente y se han designado L, N, P, Q, R y T.

Los diferentes subtipos de CCVD han sido clasificados utilizando cuatro parámetros fundamentales: i) la magnitud del voltaje al cual son activados, ii) el curso temporal de su inactivación, iii) la magnitud de la conductancia de canal único y iv) la sensibilidad a diferentes fármacos y toxinas.

Así los CCVD son divididos según la clasificación de Llinás y col. (1981) en dos grandes grupos: los de bajo umbral de activación (LVA) que poseen una rápida inactivación y conductancias pequeñas (T) y los de alto umbral de activación (HVA) (L, N, P, Q y R). (Nowycky y col., 1985; Bean, 1989; Zhang y col., 1993).

Los canales LVA presentes en músculo cardíaco y neuronas, han sido denominados canales de tipo T (Nowicky y col., 1985, Tsien y col.. 1988) por ser corrientes transitorias. Estos canales sólo requieren una pequeña depolarización para activarse y llevan una corriente pequeña y transitoria a potenciales negativos y se inactivan rápidamente.

La estructura del canal de tipo T no ha sido determinada, principalmente por la falta de ligandos específicos y tampoco son sensibles a los antagonistas de canales de calcio conocidos. Sí son sensibles a bajas concentraciones de Ni^{2+}, al amiloride y al octanol, pero no son bloqueados por el ión divalente Cd^{2+} (Bertolino y Linás, 1992).

El rol funcional de los CCVD de tipo T, es el de generar una actividad marcapasos en el músculo cardíaco y en las células nerviosas en que se encuentran.

Entre los CCVD de tipo HVA se encuentran aquellos que son bloqueados por las moléculas orgánicas 1-4 dihidropiridinas (DHPs) llamados DHPs-sensibles (L); y los que no se ven afectados por las mismas, DHPs-resistentes (N, P, Q, R).

Los canales DHPs-sensibles se denominan de tipo *L* o "long lasting", llamados así por presentar una nula o escasa inactivación y una gran conductancia de canal único.

Las funciones de los canales de tipo L se relacionan principalmente con la generación de potenciales de acción, el acople excitación-contracción en el tejido muscular, la liberación de neuropéptidos en la neurohipófisis y con la liberación de adrenalina y noradrenalina en las células cromafines de la médula adrenal (Lemos y Nowycky, 1989; Artalejo y col., 1992, 1994). Los canales de tipo L, entre otros, median las corrientes de Ca^{2+} en el músculo cardíaco, músculo liso de los vasos sanguíneos y en el músculo esquelético. El rol de aquellos que se encuentran en el cuerpo neuronal aún no ha sido determinado.

Dentro de los canales DHPs-resistentes, se encuentran los de tipo N. Estos CCVD poseen una cinética de inactivación que no se asemeja ni a los de tipo T, ni a los de tipo L, de ahí su nombre (Nowycky y col., 1985, Fox y col., 1987).

En las neuronas de mamíferos la ω-Conotoxina GVIA (ω-CgTX GVIA), una toxina extraída del veneno del caracol marino *Conus geographus*, produce un bloqueo irreversible sobre los canales de tipo *N* (Regan y col.. 1991, Mogul & Fox 1991). (McCleskey, 1987; Bean, 1989, Bertlino y Llinás, 1992; Olivera y col., 1994).
Un rol prominete de los canales de tipo N es su participación en la liberación del neurotransmisor en diversos sistemas (Olivera y col., 1994; Dunlap y col., 1995).

En las células de Purkinje del cerebelo se detecto la presencia de una conductancia de Ca^{2+} insensible a las DHPs y a la ω-CgTx, pero altamente sensible a una toxina extraída del veneno de arañas, la FTX (Llinás y col. 1989). Este canal se llamó P por haber sido descripto en las células de Purkinje, en las cuales más del 90 % de las corrientes de calcio son de este tipo (Llinás y col., 1989; Usowicz y col., 1992).

El canal de tipo P, también DHPs-resistente, es un canal que no presenta inactivación y es altamente sensible a la toxina ω-Agatoxina IVA (ω-Aga IVA), la cual se obtiene del veneno de la araña americana *Agelenopsis aperta*. También es sensible, aunque en menor grado, a la toxina ω-Conotoxina MVIIC (ω-MVIIC), extraída del veneno del caracol marino *Conus magus*.

En mamíferos, estos canales están mayoritariamente involucrados en el proceso de liberación de neurotransmisor en el SNC (Llinás y col., 1992b; Wu y Saggau, 1994; Mintz y col. 1995) y en la placa neuromuscular (Uchitel y col., 1992, Protti y Uchitel, 1993, Uchitel y Protti, 1994).

Otro CCVD perteneciente al grupo DHPs-resistentes, es el de tipo Q. El mismo fue caracterizado en las células grano del cerebelo (Randall y col. 1993). Posee una farmacología diferente al canal de tipo P, pues no es afectado por bajas concentraciones de ω-Aga IVA (1-30 nM). Sus propiedades biofísicas también se diferencian de las del tipo P. Si bien el CCVD de tipo *Q* no es afectado por bajas concentraciones de ω-Aga IVA con altas concentraciones de esta toxina (i.e. 100 nM) ambos tipos de canales P y Q se encuentran inhibidos.

Por último, los canales de tipo R, también DHPs-resistentes, son los responsables de la corriente de calcio residual luego de tratar, por ejemplo, células grano en cultivo con DHPs, ω-CgTX CVIA, ω-Aga IVA y ω-MVIIC (Ellinor y col., 1993, Zhang y col., 1993).

El rol funcional de dicho canal aún es desconocido, pero se presume que regularía, junto a los canales de tipo L, N, P y Q, la compleja actividad eléctrica de las células grano del cerebelo.

Tipo de canal de Calcio	Localización	Tipo de subunidad alfa	Farmacología	Función
HVA				
L	soma y dendritas neuronales; músculo esquelético	C y D	DHP	inportante en la regulación de expresión de genes, secreción neuroendocrina
N	presinapsis SNC	B	ω cono GVIA y ω-cono MVIIC	secreción neuroendocrina presinapsis del SNC
P	presinapsis SNC y SNP	A	ω-aga IVA (baja conc.) ω-cono MVIIC	células de Purkinje en cerebelo
Q	presinapsis de SNC	A	ω-aga IVA (alta conc.) ω-cono MVIIC	Neuronas grano del cerebelo
R	somas neuronales	E	amiloride, Ni^{2+}	
LVA				
T	músculo cardíaco y somas y dendritas neuronales	G	amiloride, Ni^{2+}	actividad marcapasos en neuronas y músculo cardíaco

Canales de calcio involucrados en la transmisión sináptica

En la placa neuromuscular de mamíferos adultos, la liberación de neurotransmisor está mediada por CCVD de la familia P/Q ya que trabajos de nuestro laboratorio demostraron la liberación de neurotransmisor y las corrientes presinápticas de calcio son bloqueadas por bajas concentraciones tanto de FTX como de ω-Aga IVA (Uchitel y col, 1992, Protti y Uchitel, 1993, Katz y col, 1996).

En contraste, la transmisión sináptica no es bloqueada, en condiciones normales, por las DHP ni por la ω-CgTx (ver Randall y Tsien, 1995). Esto indica que los canales de CCVD de tipo N y L no participan de la liberación de neurotransmisor en la liberación evocada de Ach en los terminales maduros (Atchinson 1989, Bowerosox, Penner R. y Dreyer, F., 1986, Protti). Estas evidencias farmacológicas han sido reforzadas por numerosos estudios electrofisiológicos (Llinás, Bowerosox, Sugiura) e inmunocitoquímicos (Day y col., 1997).

Canales presentes en la placa en regeneración

Luego de producir un danio en los axones de MN adultas que inervan un músculo, se observaron cambios en los patrones de expresión de los CCVD de la placa y estos cambios acompañarían el proceso de crecimiento axonal y de reinervación muscular.

En la placa neuromuscular en reinervación la liberación del neurotransmisor también está mediada por canales de tipo P, ya que el efecto de la ω-AgaIVA resulta similar al observado en el músculo levator auris normal. Además, de manera concordante a lo que ocurre en la placa neuromuscular normal, la ω-CgTx no reduce significativamente el contenido cuántico en dichos músculos en reinervación (Katz y col, 1996).

Sin embargo, la nitrendipina, reduce significativamente el contenido cuántico de la liberación evocada en placa neuromuscular de ratón en estas condiciones (Katz y col, 1996) y causa un aumento considerable de la latencia del EPP. Los experimentos de corrientes perineurales realizados en el músculo levator auris en reinervación, sugieren que este efecto de la nitrendipina sobre la latencia del EPP se debe a modificaciones en la velocidad de conducción de las señales a lo largo del axón.

Canales L y su rol en distintas preparaciones

Cada vez son más numerosos los trabajos que describen la participación de más de un canal de calcio en la liberación de neurotransmisor.

Por ejemplo, en una sinapsis identificada del ganglio bucal de Aplysia, los flujos de calcio están dados por los CCVD de tipo L, P y N pero sólo los dos últimos están involucrados en la libración de Ach (Fossier y col., 1999).

Un estudio reciente detalla los diferentes canales de Ca^{2+} que participan en conjunto en la liberación de distintos neurotransmisores (Wu y Saggau, 1997).

En la placa normal adulta, el CCVD de tipo L no esta involucrado en la liberación de neurotransmisor. Sin embargo, podría estar presente en la placa normal adulta, y no participar en condiciones fisiológicas pero sí tener algún papel bajo determinadas condiciones (Miller, 1987).

Recientemente han sido descriptos otros roles para los canales de CCVD presentes en los terminales. En este sentido, en neuronas de hipocampo, el influjo de calcio a través de un CCVD de tipo L, es capaz de mediar la translocación de calmodulina del citoplasma al núcleo, y otros canales no participan en dicho mecanismo. Esta translocación de la calmodulina provee una comunicación celular que combina la especificidad de una señal de calcio local con la habilidad de producir una acción a distancia (Deisseroth y col., 1998).

Además, el CCVD de tipo L ha sido también implicado en la expresión de genes, mediando la activación sináptica de genes tempranos (Murphy y col., 1991)

Esto sugiere que el CCVD de tipo L podría participar en mecanismos complejos en los cuales las señales locales y transientes son "transformadas" en señales más duraderas (Neher 1998).

Esta hipótesis esta apoyada por datos que demuestran que los canales de tipo L están involucrados en la liberación de varios péptidos o neuromoduladores (Perney y col., 1986).

La presencia del CCVD de tipo L podría estar regulada durante el desarrollo y la reinervación de la placa nm de los vertebrados y de los anfibios.

Uno de los canales iónicos mejores estudiados en términos de cambios en el desarrollo es el receptor de acetilcolina presináptico, el cual muestra diferentes características durante el

desarrollo y durante la regeneración de la placa nm (Brehm, 1989; Steinbach, 1989).

Estudios de cambios durante el desarrollo en las poblaciones de canales de calcio en el soma neuronal han aportado descubrimientos interesantes como por ejemplo alteraciones (pasaje) del canal T al L o N (McCobb y col., 1989). Estas alteraciones pueden estar correlacionadas con la aparición de neuritas en neuronas de hipocampo de rata en cultivo(Yaari y col., 1987).

La enfermedad de MN más común: Esclerosis Lateral Amiotrófica.

Una de las enfermedades neurogénicas más conocida es la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Esta enfermedad fatal de los adultos, en la cual hay una pérdida gradual de motoneuronas espinales y craneales y una reducción en los tractos axonales corticoespinales, culmina con la muerte del paciente generalmente luego de una falla respiratoria.

Actualmente este desorden tiene una incidencia de 1-2 cada 100.000 habitantes y el lapso de tiempo entre el diagnóstico de la enfermedad y la muerte es aproximadamente de 3 a 5 años. Hasta la fecha no existe un tratamiento que evite la muerte del paciente. Los primeros síntomas que refiere el paciente son debilidad creciente e indolora de piernas o brazos (Gubbay y col., 1985). Se pierde por ejemplo la habilidad para hacer movimientos finos con las manos. Los efectos de la denervación aparecen lentamente y los músculos gradualmente se ponen débiles y atróficos. Esta debilidad está asociada con la pérdida de los pequeños músculos de las manos y pies y fasciculaciones de los músculos de brazo y antebrazo. Existen algunas variantes como por ejemplo que los primeros síntomas están restringidos a músculos que están inervados por nervios craneales, resultando en una disartria (dificultad en el habla) y/o disfagia (dificultad para tragar). Finalmente la pérdida progresiva de motoneuronas afecta a los músculos de la respiración, produciendo una disfunción pulmonar en la parte final de la enfermedad.

Diagnóstico de la enfermedad

No existen hasta el momento estudios de laboratorio que detecten marcadores de la enfermedad. Todos los ensayos realizados hasta el momento no logran detectar una alteración bioquímica o molecular diagnóstica de la enfermedad que se encuentre en todos los pacientes (Gafney y col., 1992; Li y col., 1991; Daube 1985; Eisen y McComas 1993). A pesar de ello, normalmente el cuadro sintomático y los estudios electrofisiológicos que se le realizan a los pacientes hace que los neurólogos estén de acuerdo en el diagnóstico. Por la tanto la combinación de síntomas clínicos resulta en el diagnóstico de ELA y es realizado

por los neurólogos sobre la base de un protocolo internacional acordado en la convención de "El Escorial" (1994).

La edad de comienzo de los síntomas y sitio de dichos síntomas (bulbar o craneal vs. espinal) son factores importantes de prognóstico. Existen variaciones con respecto al sitio de comienzo de la enfermedad y el grado relativo de participación de la MNs con respecto a la MNi.

Características patológicas

En la ELA, el cerebro puede parecer normal macroscópicamente aunque suele haber atrofia de las cortezas motoras y premotoras. Los cambios más importantes o prominentes son la atrofia de la médula espinal y raíces anteriores asociadas (más notablemente en las expansiones cervicales y lumbares) y una dureza palpable (gliosis) en las columnas laterales.

De hecho, el término esclerosis lateral se refiere a dicha dureza cuando la médula espinal es palpada en autopsia. Esta cicatrización o endurecimiento esta causada por la degeneración de los tractos corticoespinales que llevan los axones de las MNs desde los somas que yacen en la corteza y tallo cerebral hasta la médula espinal. El nombre de amiotrófica corresponde a la subsiguiente atrofia del músculo esquelético.

Los desórdenes de las MNi resultan en atrofia, fasciculaciones y fibrilaciones, tono muscular disminuido y pérdida del reflejo tendinoso. Las fasciculaciones y fibrilaciones aparecen cuando las fibras musculares denervadas tienden a disparar potenciales espontáneos que hacen contraer a las fibras musculares. Los desórdenes de MNs y sus axones resultan en espasticidad, hiperreflexia, y reflejo anormal del extensor (signo de Babinski).

Notablemente, la enfermedad no afecta a neuronas sensoriales o autónomas de las vísceras y por lo tanto ilustra dramáticamente la individualidad de las MN y el principio de vulnerabilidad selectiva. Tampoco se ven involucradas las MN que inervan a músculos oculares (Hughes 1982) ni las que participan en el control voluntario de esfínteres uretrales y anales (Mannen y col., 1977) (solamente a veces se ven involucradas muy tarde en el curso de la enfermedad).

En el comienzo de la muerte neuronal, las MN sobrevivientes pueden enviar brotes de terminaciones nerviosas a las fibras musculares vecinas que pierden la inervación normal. Las fibras musculares denervadas son reinervadas por otras motoneuronas comenzando una alternancia denervación/inervación (Stalberg, 1988; Bjornskov y col., 1984). Luego, tantas neuronas están afectadas que el número de fibras musculares inervadas y funcionales declina progresivamente. De hecho, en el momento que comienzan los síntomas, hasta el 50 % de la MN podrían ya estar degeneradas (Hansen y col., 1978).

Los axones de las MN sobrevivientes funcionarían normalmente mientras que aquellos que están severamente comprometidos no funcionan. Como resultado, la velocidad de conducción de los nervios periféricos de las MN que funcionan es normal o ligeramente menor. Los reflejos tendinosos se pierden, ya que los eferentes motores están afectados y los músculos denervados se reducen o se hacen atróficos en ausencia de influencias tróficas presinápticas que son esenciales para la supervivencia. Los músculos también se tornan inactivos, y esto constituye una causa adicional de atrofia por pérdida de actividad.

Vulnerabilidad selectiva

Cualquiera sea el mecanismo patogénico de ELA, ninguna hipótesis pudo explicar hasta el momento el hecho de que sea afectada la mayoría de las MN pero que algunas poblaciones de MN no lo estén (neuronas oculomotoras y del núcleo de Onuf).

Un factor que podría ser importante para la supervivencia neuronal sería la capacidad de la neurona de regular la concentración de calcio intracelular. Una entrada excesiva de calcio, en ausencia de mecanismos eficientes de control podría no ser resistida por la neurona.

Las MN tienen la rara característica, de contener una cantidad reducida de parvalbúmina y calbindina D-28K, proteínas que participan en la regulación de la concentración (buffer) del ion calcio. Llamativamente la mayoría de las neuronas que no son afectadas en ELA presentan ambas proteínas en mayor cantidad (Reiner y col. 1995). Estos datos se correlacionan con lo observado en MN de pacientes (Ince y col., 1993; Alexianu y col., 1994 a). Ha sido mostrado que las neuronas que contienen calbindina son más resistentes al estrés oxidativo.

Clasificación

La enfermedad ha sido clasificada en tres tipos: la forma esporádica, la forma familiar y la del Pacífico Occidental.

Las características clínicas, patológicas y epidemiológicas de la forma del Pacífico son suficientemente diferentes de las dos restantes y podría ser vista como una enfermedad diferente. Esta última es encontrada en una alta incidencia en un lugar geográficamente aislado como son las islas de Guam y Rota en la cadena de islas Marianas. Los pacientes que habitan dicha zona presentan además demencia y enfermedad de Parkinson sugiriendo un vínculo entre diferentes tipos de enfermedades neurodegenerativas (Hirano y col., 1961). Aparentemente las toxinas presentes en la semilla de la palma Cycas spp. utilizada en alimentos y medicina popular serían los factores causantes de la enfermedad (Spencer y col., 1987) ya que al cesar la ingesta de ese factor la incidencia cayó y sigue disminuyendo (Williams y col., 1992).

En contraste, la forma clásica de la enfermedad (tanto esporádica como familiar) tiene distribución global con pequeñas variaciones en la tasa de incidencia (Duvolman y Apperovitch, 1989).

La mayoría de los pacientes (90 %) presentan la forma esporádica de la enfermedad donde la transmisión familiar esta ausente. La forma familiar de ELA, por transmisión autosómica dominante, representa un 5-10 % del total de los pacientes. En algunos de estos casos familiares o hereditarios (20 % de los pacientes familiares) se descubrieron mutaciones en el gen de la superóxido dismutasa Cu/Zn-dependiente (Rosen y col., 1993) sugiriendo un rol potencial de los radicales libres en el daño a la MN. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes con la forma familiar, se desconoce el factor hereditario.

Mecanismos Patológicos (Hipótesis de la causa de la enfermedad esporádica)

Varias hipótesis han sido postuladas a fin de explicar la degeneración selectiva de las MN en ELA. Algunas de ellas son:

- Factores ambientales

- Mecanismos autoinmunes
- Estrés oxidativo
- Excitotoxicidad
- Infección viral
- Anormalidades del citoesqueleto
- Pérdida de factores tróficos

Sin embargo es improbable que una sola hipótesis pueda explicar completamente la patogénesis de ELA. Existe un consenso general en que la muerte selectiva de las motoneuronas es el resultado de una cascada de eventos biológicos tóxicos o una combinación de factores dañinos disparados por una variedad de factores. La ELA puede ser considerada un desorden multifactorial que incluye una población de pacientes con predisposición genética. Además, la importancia de distintos factores etiológicos pueden variar dependiendo del estadio de la enfermedad o en diferentes poblaciones de pacientes con ELA.

El desarrollo gradual y lento y en el cual la degeneración de la MN parecería difundirse a las MN vecinas puede reflejar este proceso en pasos múltiples con un factor iniciador o disparador, seguido de cascadas cíclicas propagadoras. De hecho, una forma típica de aparición de la enfermedad, es una debilidad mono o multifocal del miembro afectado, con un "contagio" progresivo local a los músculos vecinos antes de que se vean afectados los músculos más distales de dicho miembro (Brooks, 1991). Esto sugiere una población multicéntrica de MN que es afectada temprano en la enfermedad con un contagio subsecuente y progresivo a las poblaciones de MN contiguas (Brooks y col., 1991).

En todos las hipótesis actualmente en estudio resulta muy dificil saber si las alteraciones encontradas en los pacientes son efectos secundarios de la enfermedad o surgen efectivamente como la causa de la enfermedad.

A continuación se hará un breve resumen de los estudios que mundialmente se están llevando a cabo a fin de elucidar la patogénesis de la enfermedad.

Radicales libres y estrés oxidativo.

El descubrimiento de mutaciones en el gen de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en algunos pacientes con ELA familiar y el desarrollo de un ratón transgénico para la SOD, han estimulado la investigación del rol potencial de los radicales libres en la forma esporádica de la enfermedad. Sin embargo en dichos pacientes, la actividad de la SOD parece ser normal (Puymirat y col., 1994).
Sin embargo, hay evidencia reciente de daño oxidativo en corteza (Bowling y col., 1993) y médula espinal (Shaw y col., 1995) en muestras de sistema nervioso obtenidas en autopsias de pacientes con ELA. Lamentablemente, estos estudios ofrecen escasa información del proceso de muerte neuronal.

Homeostasis alterada de neurofilamentos (anormalidades del citoesqueleto)

Los neurofilamentos participan en el mantenimiento de la integridad axonal necesario en la comunicación del soma con los terminales y son de particular importancia en las MN en las cuales los axones pueden medir más de un metro de longitud.
Una de las características histológicas distintivas de ELA es la acumulación de neurofilamentos fosforilados en esferoides, en el soma y en axones proximales de las MN de la médula espinal. Estos esferoides consisten en la acumulación de filamentos intermedios de 10 nm de diámetro entremezclados con mitocondrias, vesículas pequeñas y microtúbulos. Estos esferoides no son específicos para esta enfermedad ya que también son encontrados en médula espinal de personas sanas (Delisle y col., 1984), pero existe una mayor abundancia de los mismos en los pacientes con ELA. Patrones similares de cambios en los neurofilamentos pueden ser producidos experimentalmente como resultado de un daño excitotóxico luego de la administración intratecal de ácido kainico (Hugon y col., 1990).

La sobreexpresión de proteína de neurofilamento (tanto de la cadena pesada como liviana) en ratones transgénicos llevan a una disrupción del citoesqueleto similar a la observada en ELA (Côté y col., 1993; Xu y col., 1993).

Asimismo, algunos de estos ratones también desarrollan problemas neurológicos, tales como debilidad de los miembros e hiperreflexia, similares a ELA.

Excitotoxicidad del glutamato

En los últimos años han aparecido numerosos trabajos sobre la contribución de la excitotoxicidad en la neurodegeneración. Plaitakis fue el primero en mostrar datos de niveles de glutamato en plasma, líquido cefalorraquídeo y material post-mortem de pacientes de ELA (Plaitakis y col., 1990). Recientemente trabajos de Rothstein y col. aportan una idea más precisa del daño mediado por glutamato en estos pacientes. Ellos han mostrado que la captación de ácido glutámico está reducido en preparaciones de vesículas de médula espinal y corteza motora de pacientes (Rothstein y col., 1992).
Dicho déficit podría ser explicado por la pérdida selectiva de uno de los subtipos de transportadores de ácido glutámico, el EAAT-2, el cual es expresado únicamente en células gliales (Rothstein y col., 1995). Cerca del 60 % de los pacientes de ELA tienen pérdida del transportador de glutamato astroglial (en cantidades que varían desde un 30 al 95 % del total) en corteza motora y médula espinal. Esto llevaría a un aumento del glutamato extracelular. La pérdida de este transportador se debe a que los ARN mensajeros para esta proteína son aberrantes pero se desconoce cual es la causa de esta alteración molecular (Lin y col. , 1998).

Autoinmunidad

La posibilidad de que un mecanismo autoinmune esté involucrado en la patogénesis de ELA ha sido considerada y debatida por más de 25 años.
En los pacientes con ELA se han reportado una incidencia aumentada de desórdenes autoinmunes (Appel y col., 1986; Haverkamp y col., 1995), una frecuencia aumentada de paraproteinemias (Latov y col., 1988; Younger y col., 1990) y anticuerpos monoclonales Meininger 1990). Estudios preliminares mostraron la presencia de focos inflamatorios en la médula espinal de los pacientes de ELA. Un estudio extensivo documentó la presencia de macrófagos, linfocitos T y B en la médula espinal de 38 pacientes de ELA de un total de 48

estudiados y no resultó ser un efecto secundario producto de la degeneración de tractos o muerte de las MN (Troost y col., 1989). En otros estudios realizados, se vieron infiltrados inflamatorios en 10 de 15 médulas espinales de pacientes (Engelhardt y col.,1993). En todos estos casos, los focos fueron detectados dentro de los vasos sanguíneos del asta anterior y separados de MN o tractos espinales en degeneración.

Presencia de anticuerpos en el suero de los pacientes

Ciertos grupos de investigadores postulan la presencia de autoanticuerpos contra canales de calcio en el suero de los pacientes y que los mismos serían responsables de la disfunción neuromuscular. Hay evidencias de dichos anticuerpos dirigidos contra los CCVD de tipo L y P, pero la presencia y el rol de los mismos es materia de controversia (Kimura y col., 1994; Lennon y col., 1995; Vincent y Drachman, 1996).

Un estudio reciente que intenta aportar datos sobre la interacción de los anticuerpos de pacientes con canales de calcio es el ensayo funcional in vitro realizado utilizando células PC12 (Offen y col., 1999). Estas células neuroendocrinas originadas de un feocromocitoma de rata, liberan catecolaminas en respuesta a la depolarización de la membrana y dicha liberación es dependiente exclusivamente de la entrada de calcio a través de las CCVD de tipo L. Se examinó el efecto de IgG de pacientes con ELA y aplicada externamente sobre la liberación de catecolaminas luego de evocar una depolarización. Una gran proporción de los pacientes presentó IgG que produjo un bloqueo de la liberación de catecolaminas. Al igual que en otros estudios, los autores no excluyen la posibilidad de que los anticuerpos se hayan generado secundariamente al inicio de la enfermedad. Lo interesante es de que manera ocurrió dicha aparición de anticuerpos.
Cabe mencionarse que en algunos pacientes de ELA también han sido encontrados anticuerpos dirigidos contra los neurofilamentos aunque pacientes con otras enfermedades también los presentan (Couratier y col., 1998).

El rol de las inmunoglobulinas y la participación de los canales de calcio en la degeneración neuronal en ELA es reforzado por el hallazgo de que las IgG de pacientes con esta enfermedad pueden inducir muerte neuronal (calcio dependiente) mediante apoptosis en una línea celular de motoneurona (Smith y col. 1994; Alexianu y col., 1994).
Actualmente, la presencia de anticuerpos contra canales de calcio de tipo L y P y su rol en la disfunción neuromuscular o en la muerte neuronal en cultivo son materia de controversia (Vincent y Drachman, 1996). De hecho, un grupo francés de investigadores no logró detectar anticuerpos contra canales de tipo N o L en el suero de pacientes (Arsac y col., 1996) aumentando la polémica.

Transferencia pasiva (Estudios electrofisiológicos)

Estudios previos en el laboratorio mostraron que la aplicación de immunoglobulinas de ELA sobre terminales motores de músculos esqueléticos induce una disfunción en la transmisión de la placa neuromuscular.
El primer hallazgo fue que las inmunoglobulinas G de pacientes con ELA inducen un aumento en la frecuencia de la liberación espontánea (Uchitel y col. 1988). Estudios posteriores mostraron también que las IgG eran capaces de producir cambios en el contenido cuántico de la respuesta evocada. Estos cambios se mantuvieron presentes aún varias semanas después de la aplicación de las IgG y fueron obtenidos con la mayoría de las IgG-ELA pero no con las IgG controles o de enfermedades controles. Los estudios morfológicos también demostraron degeneración axonal y terminales denervados en animales tratados con IgG-ELA (Uchitel y col. 1992). La modificación en la transmisión neuromuscular resultó ser presináptica y fue también observada luego de la aplicación in vivo de suero o IgG purificada del suero de los pacientes (O'Shaughnessy y col., 1998, Appel y col., 1991).

Captación de proteínas por terminales motores

Las MN tienen una característica anatómica única con respecto a otras neuronas. La mayor parte de los axones se encuentran fuera del sistema nervioso central y están parcialmente

exceptuados del control de la regulación de la barrera hematoencefálica.
En los terminales presinápticos existe un continuo proceso de liberación de neurotransmisor y la membrana que se fusiona para liberar dichas moléculas, es incorporada nuevamente al terminal. En dicho proceso, ocurre endocitosis del fluido extracelular, el cual está en contacto indirecto con el suero. Como consecuencia del continuo reciclado del terminal presináptico y de las membranas de las vesículas sinápticas, endocitosis del fluido extracelular ocurre en los terminales motores (Miller y Heuser, 1984). Además de ligandos específicos, todas las proteínas séricas pueden ser internalizadas no específicamente por las MN (Broadwell y Brightman, 1976).

Estudios animales han establecido que fisiológicamente ocurre una endocitosis de proteínas séricas endógenas llevada a cabo por los terminales nerviosos de la placa neuromuscular (Fabian y Ritchie 1986; Yamamoto y col. 1987). Estas proteínas pueden ser localizadas en los somas de las MN donde se acumulan luego de ser transportadas por el transporte axonal retrógrado y en cantidades suficientes como para ser detectadas por inmunocitoquímica (Yamamoto y col. 1987; Fabian and Petroff 1987). Asimismo, la presencia de proteínas séricas en neuronas preganglionares (autónomas) y neuronas oculomotoras, las cuales no son afectadas en ELA, es menor que la observada en motoneuronas somáticas (Yamamoto y col., 1987).

Además, en el caso de utilizar anticuerpos fabricados contra antígenos sinápticos, la captación de estas IgG por las MN puede ser marcadamente mayor que en el caso de IgG no específicas o normales (Fabian 1988).
La distribución de la tinción intracelular, sugiere que la mayoría de las neuronas que proyectan sus axones a la periferia, son las que poseen una fuerte inmunotinción para IgG.

La inmunoreactividad puede ser abolida si el transporte axoplásmico es interrumpido por colchicina (Yamamoto y col., 1987). Asimismo, cuando doxorubicina o lectina tóxica son inyectadas en un nervio periférico, estas sustancias que no son permeables por la barrera hematoencefálica, son retrógradamente transportadas al soma neuronal, donde ejercen también su acción tóxica (Yamamoto y col., 1984, 1985).

Ya ha sido mostrado que además, si IgG exógena es aplicada por inyección intramuscular la misma es también transportada por transporte axonal retrógrado al soma de las MN (Ritchie y col., 1985).

Las grandes MN cervicales y lumbares en la médula espinal humana, mostraron inmunoreactividad citoplasmática para IgG y otras proteínas séricas endógenas (Fishman y col., 1991). También encontraron inmunotinción en neuronas sin proyección por fuera de la barrera como las de la columna de Clarke. La inmunoreactividad también fue localizada en la luz y paredes de vasos sanguíneos.

En 13 de 15 médulas espinales de pacientes con ELA, se observó reactividad citoplasmática para IgG en gránulos irregulares en los somas de las MN. En el caso del material proveniente de pacientes controles, la marca es mucho menos intensa. Las neuronas piramidales de corteza motora de los pacientes fueron reactivas en 6 de 11 casos estudiados. En los casos de pacientes con ELA y de controles, también se observó marca débil en los astrocitos.

La presencia de IgG en motoneuronas de corteza podría ser explicada por una inflamación perivascular, con una perdida de la barrera, y el pasaje de IgG desde la circulación sistémica hacia el cerebro. Las numerosas neuritas de las células piramidales podrían captar así la IgG.

En fibras musculares esqueléticas denervadas se observó una actividad aumentada de la endocitosis en la zona de la placa de la fibra denervada (Elmquist y col., 1992). Aunque no se sabe la razón de esta actividad endocítica aumentada, podría ser relevante a fin de captar por ejemplo factores tróficos (en el paper hablan de fibras musculares denervadas y no hablan del terminal; no se si tiene relevancia ya que es la post-sinapsis). El material endocitado en las fibras se acumula en lisosomas (Tagearud y Libelius, 1984).

Mecanismo de entrada (Especificidad de la Captación)

El primer estudio en humanos describiendo la presencia de proteínas séricas en neuronas de Purkinje fue el de (Borges y Busis, 1985). Asimismo, los axones de algunas neuronas del tracto solitario, las cuales presentan inmunoreactividad para proteínas séricas, terminan en

el área postrema, un área donde la barrera hematoencefálica permite el pasaje de macromoléculas.

Aunque las membranas biológicas son en general, impermeables a material de alto peso molecular, una gran variedad de macromoléculas presentes en el medio externo pueden entrar a la célula. El proceso de incorporación de sustancias desde el medio extracelular al medio intracelular recibe el nombre de endocitosis o pinocitosis.
La pinocitosis es inespecífica y el material internalizado no difiere en composición del liquido extracelular.
En cambio, existe una captación específica y concentrante, proceso llamado endocitosis mediada por receptor. Las macromoléculas se unen a un receptor (proteína transmembrana) localizado en la membrana, se acumulan en invaginaciones cubiertas por clatrina y entran a la célula por posterior internalización del complejo ligando-receptor. En la mayoría de las células animales, las invaginaciones y las vesículas cubiertas por clatrina proveen una vía eficiente para captar selectivamente macromoléculas del fluido extracelular.
Esta es la manera utilizada por ejemplo por la proteína sérica α_2-macroglobulina, la cual es retirada del plasma y enviada a lisosomas para su degradación. Está presente en el suero en una concentración similar que la IgG pero tiene un peso molecular mucho mayor (800 kd). Dado que esta proteína no-inmune se ha encontrado en los somas de neuronas humanas, se discute si la captación de IgG por parte de los terminales es selectiva (Fishman y Drachman, 1995).
En el caso de algunas sustancias, como el factor de crecimiento nervioso, la toxina tetánica y algunas lectinas (Dumas y col., 1979; Trojanowski y col., 1982) son internalizadas también luego de la unión a receptores de membrana del terminal nervioso.

En contraste, otras macromoléculas, que no tienen una afinidad especifica por la membrana podrían ser incorporadas por endocitosis no especifica "en masa". Por ejemplo, sustancias exógenas que no tienen afinidad específica por la membrana como la peroxidasa de rábano y marcadores fluorescentes son captados por los nervios periféricos solamente cuando se mantiene una alta concentración sérica de esta sustancia (Broadwell y Brightman 1976; Van der Krans y Hoogland 1983).

La importancia de la captación de proteínas séricas por grupos específicos de neuronas no ha sido elucidada. En el caso de la miastenia gravis, anticuerpos dirigidos contra el receptor de acetilcolina, inhiben la función de estos receptores. Lo mismo ocurre en el síndrome de Eaton Lambert, en la cual existen anticuerpos circulantes contra los canales de calcio presinapticos. Estos anticuerpos reducen el nivel de calcio presináptico y la eficiencia de liberación del neurotransmisor.

Reciclado de vesículas de membrana

Si no existiera un mecanismo compensatorio de la exocitosis, la membrana del terminal se agrandaría como resultado de la estimulación nerviosa, ya que la membrana de las vesículas se sumarían continuamente al plasmalema. Este incremento no ocurre ya que la membrana agregada al terminal es retirada y reciclada.

El reciclado de la vesícula toma lugar en 30-60 segundos (Betz y Bewick, 1993; Ryan y col., 1993) luego de la secreción y ocurre a traves de dos mecanismos diferentes. El primero es simplemente lo opuesto del proceso de fusión. En este caso, un poro de fusión se abre para permitir la liberacion del nt y rápidamente se cierra para formar nuevamente una vesicula. Aunque este mecanismo es el utilizado en algunos sistemas (Monck y Fernández, 1992), el mas utilizado es un segundo mecanismo, denominado endocitosis (Robinson MS, 1994), el cual es regulado por la concentracion de calcio en la presinapsis (Robinson y col., 1994; Von Gersdorff y Matthews 1994). La endocitosis de los componentes de la vesicula sinaptica es mediado por la formacion de una vesicula recubierta por una proteina, la clatrina (Maycox y col., 1992). Cuando los componentes de membrana de la vesícula sináptica son recuperados en vesículas cubiertas por clatrina el reciclado es completado por eliminación de la clatrina y pasaje al compartimento endosomal en el terminal nervioso. Nuevas vesículas se forman directamente a partir de estas vesículas con clatrina o a traves de endosomas. Sin embargo, luego de una estimulación intensa del nervio, cisternas e invaginaciones sin cubierta de clatrina median la internalización no selectiva de membrana. Esta segunda vía sería una racaptación de membrana en vacuolas grandes y sin cubierta y parte de esta membrana sería transportada retrógradamente hasta el soma donde sería degradada en lisosomas.

OBJETIVOS

El objetivo general es investigar si la aplicación de IgG de pacientes con ELA altera el funcionamiento de los terminales motores y cuales podrían ser los mecanismos involucrados en un posible daño al terminal.

Para ello se estudiarán los mecanismos involucrados en la captación de IgG humana aplicada sobre terminales motores de ratón. Para ello se utilizará un protocolo adecuado para detectar a la proteína incorporada en los somas de las motoneuronas.

Se analizará si la captación de IgG es cuantitativamente diferente en el caso IgG de pacientes con ELA comparada a la captación observada de pacientes con otras enfermedades neurológicas o personas sanas (IgG controles).

Se investigará si la presencia de IgG en los somas altera la morfología o el número de células.

Se estudiará si en una situación de no funcionamiento normal de la placa, la captación de IgG permanece inalterada.

Se analizará si la aplicación de IgG de ELA afecta de alguna manera la transmisión sináptica y los posibles efectos de las mismas en los terminales motores.

Se investigará a los canales de calcio involucrados en la transmisión neuromuscular en los terminales tratados.

MATERIALES
Y
METODOS

Pacientes

Se trabajó en colaboración con el Area de Neurología del Hospital Francés y del Hospital Británico de Capital Federal. El Dr. Dubrovsky (H. Francés) y el Dr. Reisin y la Dra. Pardal (H. Británico) llevan a cabo la atención de pacientes con enfermedades neuromusculares y son los encargados de dar el diagnóstico de ELA de acuerdo a reglas internacionales (El Escorial, 1994).

Los pacientes con ELA esporádica no presentaron otros parientes con enfermedades neuromusculares. Todos los pacientes presentaron signos de degeneración de las mni y de la mns.

Los pacientes con otras enfermedades neuromusculares fueron tomados como controles y fueron elegidos por presentar también enfermedades en las cuales ocurre degeneración neuronal en distintas zonas del sistema nervioso y por causas conocidas.

Obtención del suero

Se contó con un grupo de pacientes con ELA, personas sanas y pacientes con otras enfermedades neuromusculares los cuales dieron su consentimiento para participar en el presente estudio de investigación. Los participantes accedieron a concurrir al Laboratorio del Hospital correspondiente donde se les extrajo a los mismos entre 30-70 ml de sangre, luego de permanecer en ayuno de 8 hs. como mínimo. La sangre se puso en un baño termostatizado a 37 °C por 30 minutos y por centrifugación (6000 rpm por 5 minutos) se obtuvo el suero. El mismo fue separado en alícuotas las cuales se congelaron a -20 °C hasta su utilización.

Se dividió a los participantes en tres grupos y se les asignó un código o denominación:

Pacientes con ELA esporádica: ELA 1-13 (8 hombres y 5 mujeres; Rango de edades: 33-78).

Control sano: C1-C7 (28-65)

Pacientes control con otras enfermedades neurológicas: EC1-EC6 (22-72)

Se obtuvieron datos de la historia clínica de cada paciente en cuanto a la fecha de inicio de

los síntomas, miembros afectados, datos bioquímicos del suero, etc. Se utilizaron los sueros de participantes con una concentración sérica de IgG dentro del rango normal, 640-1340 mg/dl. En los casos que dicho dosaje no se había realizado, se realizó una inmunodifusión radial en una alícuota de suero (Heer, E. Y Margni, R, 1971) a fin de conocer la concentración sérica de inmunoglobulinas antes de realizar la purificación de IgG.

Todos los controles se encontraron dentro del mismo rango de edades que los pacientes con ELA. En algunos casos, un familiar cercano de los pacientes con ELA accedió a participar en el estudio, formando parte del grupo control (mismo nivel socio-económico cultural).

Ninguno de los participantes tomó medicaciones con efecto inmunológico en los 6 meses previos a la toma de la muestra sanguínea.

Conformación de los distintos grupos

Para los estudios de captación de IgG:

Se purificó IgG por Cromatografía de intercambio iónico del suero de los tres grupos que se detallan a continuación:

Pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica:

2 mujeres y 5 hombres, rango de edades: 33-60 años (denominación en gráficos y texto: ELA 1-7).

Grupo control sano:

3 mujeres y 3 hombres, rango de edades, 28-65 años. Denominación: C1-C6.

Grupo de pacientes con otras enfermedades neurológicas:

1 paciente con ELA familiar (mujer, 47 años) EC 1.

1 paciente con atrofia muscular espinal, hombre, 22 años) EC 2.

1 paciente con neuropatía sensoria-motora periférica demielinizante asociada a gamopatía monoclonal, (hombre, 50 años) EC3.

Para los estudios de electrofisiología:

Estudios con IgG

Se purificó IgG por Cromatografía de intercambio iónico (ELA 8-11) y de afinidad (ELA 12, 13 y EC6) a partir del suero de los tres grupos que se detallan a continuación:

Pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica:

3 mujeres, 4 hombres, rango de edades: 35-78 años, denominación en gráficos y texto: ELA 5, 7-13).

Grupo control sano:

2 mujeres, 1 hombre, rango de edades: 35-65 años, denominación: C3, C6, C7.

Grupo de pacientes con otras enfermedades neurológicas:

1 paciente con atrofia muscular espinal, hombre, 39 años) EC4.

1 paciente con Eaton-Lambert (mujer, 50 años) EC5.

1 paciente con ELA familiar (mujer, 72 años) EC6

Estudios con suero

ELA 12: suero de un paciente con ELA esporádica

EC6: suero de un paciente con ELA familiar

Grupo control: conjunto de suero de 4 personas sanas (rango de edades: 30-48 años)

Purificación de IgG

A partir de cada suero se purificó IgG de acuerdo al siguiente protocolo:

Para enriquecer el suero en inmunoglobulinas, a un volumen determinado de suero, se le agregó una solución saturada de sulfato de amonio. El volumen de sulfato se calculó con la siguiente fórmula:

V sulfato de amonio = V suero x 45/55

El sulfato se agregó gota a gota en agitación y a 4 °C. La mezcla se agitó durante una hora y fue estacionada a 4 °C por 8 horas, para permitir una mayor precipitación de las globulinas.

Se centrifugó a 10.000 rpm por 30 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante.

El pellet se resuspendió en el menor volumen posible (1-5 ml) de solución buffer de fosfato de sodio 0.05 M, pH 7 (cromatografía de afinidad) o pH 8 (cromatografía de intercambio iónico).

Se agregó solución salina gota a gota hasta disolución total del pellet. Se dializó extensivamente en buffer fosfato durante 48 hs. En ese lapso se realizaron 6 cambios de buffer, de 500 ml cada uno. Se dializó con agitación y a 4°C. Solución buffer de fosfato (Solución A: NaH_2PO_4; Solución B: Na_2HPO_4)

Lo obtenido se pasó por una columna de afinidad o de intercambio iónico.

Purificación por Cromatografía de intercambio iónico

Se utilizó una columna de intercambio aniónico armada con dietilaminoetil celulosa, (DEAE), la cual fue activada previamente a su utilización con el siguiente protocolo:

Activación de la resina:

Hidratación en agua destilada.

Centrifugación a 3000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante.

Resuspensión de la resina en NaOH 0.5 M, 20 min. con agitación magnética (3 volúmenes de hidróxido por cada volumen de resina húmeda.)

Lavados en agua hasta que el pH de la resina fuera neutro.

Filtración en Buchner con papel de filtro grueso.

Resuspensión de la resina en HCl 0.5 M, 20 min. con agitación magnética (3 volúmenes de ácido por cada volumen de resina húmeda.)

Repetición de los lavados.

Resuspensión en el buffer fosfato 0.5 M. Luego de 20 min. en agitación se repiten los pasos de lavados y filtado y se resuspende en el buffer fosfato 0.05 M. Se controló en

conductímetro (marca Lutman) que la conductividad del efluente fuera igual a la del buffer de diálisis.

El volumen de resina activada fue introducido en la columna cromatográfica en la cantidad necesaria para el volumen de suero dializado a purificar (5 ml de resina por cada 50 mg de proteína). Se colocó la muestra y cuando esta se hubo incorporado totalmente en la resina se añadió la cantidad de buffer necesaria. A pH 8 las IgG no tienen carga neta por lo que se recogen en el eluido de la columna. El eluido se recolectó en tubos plásticos y se realizó la lectura de los mismos en un espectrofotómetro. El pico proteico que eluye a la molaridad indicada estaba constituido por IgG con un alto grado de pureza.

Se obtuvieron las fracciones, se concentraron y se dializaron contra buffer PBS (10 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, 3 mM de KCl, pH 7,4). Se congelaron las IgG a -80 C hasta su uso.

Purificación por Cromatografia de afinidad (proteína G)

La Proteína G es una proteína bacteriana del *Streptococcus* que se une específicamente a la región Fc de la inmunoglobulina G ya sea mono o policlonal. En forma de columna, la forma inmovilizada, son extremadamente útiles y de gran capacidad de adsorción en los procedimientos de purificación. El rango de IgG policlonales que se une fuertemente a la Proteína G es muy grande y se puede trabajar en un gran rango de pH. Además no se pierde ninguna subclase de todas las subclases humanas (como ocurre con la Proteína A).

El protocolo utilizado es el recomendado por los fabricantes de la columna (Pharmacia) con algunas modificaciones personales para enriquecer la muestra:

Se utilizó una columna de Proteína G de 5 ml con adaptador para jeringa. Se lavó el etanol de la misma con al menos tres volumenes (15 ml) del buffer de partida (buffer fosfato 0.05 M pH 7). Se equilibró la columna con tres volúmenes del mismo buffer. Se aplicó delicadamente la muestra (previamente enriquecida con el sulfato de amonio y dializada).

A fin de retirar lo que no quedó retenido en la columna, se pasaron al menos 25 ml de buffer o hasta que no apareciera material en el eluido (no se lavó demasiado ya que si la interacción entre el ligando y la proteína de interés es débil, esto puede disminuir la cantidad de proteína pura a obtener).

Se eluyó con 15 ml de buffer Glicina HCl 0.1 M pH 2.7. En tubos plásticos, se recolectaron 900 µl de eluido por tubo, en los cuales se había colocado previamente 100 µl de buffer de neutralización (Tris HCl 1 M pH 9).
En un espetrofotómetro de luz ultravioleta, se midió la densidad óptica de los tubos a 280 nm a fin de evaluar en que tubos se encontraba el pico de proteína. Se agruparon los tubos con alta concentración y se dializó lo obtenido en buffer PBS.
Se midió la concentración de proteínas por métodos ópticos y siempre en el rango de valores de densidad óptica (D.O.) entre 0 y 1 (parte lineal de la curva donde la D.O= f [C]).
Se obtuvo una aproximación de la concentración obtenida con la siguiente fórmula:

Concentración en mg/ml: D.O. x dilución x coeficiente de Extinción % ($E^{1\%}_{1cm}$). (Para la IgH humana en el buffer utilizado coeficiente de Extinción % es 0.812)

Una alícuota de cada muestra fue reservada para la determinación de la concentración de proteínas que se realizó por un método que emplea ácido bicinchonínico y es una modificación del método de Lowry (Smith y col., 1985).

Inmunoelectoforesis

A fin de evaluar la pureza de la IgG obtenida con ambos protocolos se realizó una inmunoelectroforesis en agar (Grabar, P. y Williams, C., 1953;) de acuerdo al siguiente protocolo:

Se lavaron portaobjetos con alcohol y se rotularon. Se utilizó uno por cada suero diferente. En cada porta se agregó suavemente 3 ml de agar líquido (1.25 % en buffer veronal sódico HCl) y fue colocado en cámara húmeda en la heladera hasta endurecimiento del agar. Se

realizó una canaleta longitudinal en el medio y dos orificios, arriba y abajo de la misma, según esquema:
Se retiró el agar de ambos orificios pero se mantuvo el de la canaleta. Se colocó en el orificio superior 15 µl de suero total y en el inferior 15 µl de IgG pura. La concentración de proteína en ambos casos fue aproximadamente 2 mg. Se colocó en una cuba electroforética y se conectó a una fuente de poder. Se aplicaron 200 Volts durante 45-50 min. para separar las distintas proteínas séricas.

Luego de la corrida electroforética, se retiró el agar de la canaleta y se colocó suero anti-humano total en una concentración aproximada de 2-3 mg/ml. Se incubó toda la noche a 4 °C en cámara húmeda para que ocurra la precipitación entre los antígenos y anticuerpos. Se lavó el exceso de anticuerpo en un baño de solución fisiológica en agitación. Se retiró del baño y se colocó encima de cada portaobjeto una tira de papel de filtro húmedo y se dejó secar a temperatura ambiente hasta sequedad. El examen de las bandas obtenidas se realizó luego de coloración del porta objetos con negro de amido previa desecación del gel de agar.
Se consideró una correcta purificación cuando se obtuvo en la parte superior del portaobjetos varias bandas correspondientes a las proteínas séricas y en la parte inferior una sola banda correspondiente a la IgG.

Animales:

Se utilizaron ratones machos adultos de la cepa Swiss, cuyo peso se encontraba entre 25-30 gr. Estos animales fueron mantenidos bajo un régimen de 12 horas luz-oscuridad, con libre disponibilidad de agua y alimento balanceado. La temperatura del bioterio fue mantenida alrededor de los 19-22 °C.

Características del músculo utilizado

Los estudios inmunohistoquímicos y electrofisiológicos llevados a cabo en esta tesis se realizaron en el levator auris longus del ratón. El mismo es el músculo elevador de la oreja.

Es un músculo esquelético plano y fino, apenas 2 capas de fibras, localizado superficialmente por debajo de la piel que cubre la parte dorsal de la cabeza y cuello del ratón. Está formado por dos porciones, una derecha y una izquierda correspondientes a cada oreja, separadas por un tendón medial. Cada porción está inervada por la rama auricular posterior del nervio facial, la cual se ramifica luego de entrar al músculo. Las placas neuromusculares pueden ser fácilmente localizadas in vitro. Debido al espesor del músculo y su patrón de inervación resulta ser muy apropiado para los estudios de electrofisiología. Debido a su localización subcutánea, es ideal para la aplicación local de sustancias in vivo la cual se logra sin dañar al músculo (Angaut-Petit, 199?).

Ubicación de los somas de las mn inervantes del músculo utilizado

Para estudiar la distribución neuronal de las IgG aplicadas en las cercanías del músculo Levator auris fue necesario conocer previamente la ubicación precisa, en el sistema nervioso central, de los somas de las motoneuronas inervantes de dicho músculo.

Se procedió en primera instancia a la detección de las mismas mediante la microinyección de un marcador fluorescente (carbocianina diI (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) el cual es liposoluble y difusible en las membranas biologicas (Honig & Hume, 1989).
Mediante una breve incisión en la base del oído externo, se separaron los músculos superficiales y se expuso el nervio antes de su entrada al músculo elevador de la oreja. Se inyectó el marcador (50 µl de una solución 2.5 mg del marcador en un ml de etanol 100%) y se suturó la incisión. A las 48 hs., el animal fue perfundido, se removió y congeló la protuberancia, y se obtuvieron cortes como se describirá más adelante (Sección ICQ).
Luego del montaje de los cortes en portaobjetos, se los cubrió con glicerina disuelta en PBS (9:1) y los mismos fueron observados en microscopio de fluorescencia marca Olympus BX50WI utilizando los filtros adecuados. longitud de onda...

Aplicación de la IgG

Se colocó a los ratones en una cámara con éter a fin de lograr una ligera anestesia de los mismos. Se aplicó Inmunoglobulina G humana purificada en la superficie del músculo Levator auris izquierdo del ratón mediante inyecciones subcutáneas de 50 µl de una solución de IgG 20 mg/ml en PBS. Las agujas utilizadas para no producir daño son de 30 G ½.

El protocolo o esquema normal tuvo una duración de 5 días, en los cuales se aplicó la IgG dos veces por día (10 veces en total) con un lapso de 9 hs como mínimo entre cada aplicación.

Estudios de captación de IgG en terminales nerviosos intactos

En estos casos la perfusión fue realizada 48 hs. luego de la última inyección.

Por lo menos 2 ratones fueron inyectados con cada IgG. Dos animales fueron tratados con el vehículo solamente.

Estudios de captación de IgG en terminales nerviosos en regeneración

A fin de estudiar si la captación de IgG requiere de la actividad sináptica, se interfirió con la actividad normal de la placa y de esta manera estudiar si el bloqueo de actividad afecta a la presencia de inmunoreactividad para IgG en las mn del núcleo del facial.

Placa Neuromuscular de ratón en regeneración: Los ratones fueron anestesiados (tribromoetanol al 2% en H_2O bidestilada, 0.15 ml/10g de peso corporal, I.P.) y luego se procedió a la desnervación del músculo levator auris izquierdo por compresión del nervio. Se realizó una pequeña incisión en la piel que cubre la parte posterior de la aurícula, se localizó el nervio bajo la lupa de disección y se realizó la desnervación mediante una fuerte compresión del nervio, con una pinza de disección, durante 20-30 s. La compresión del nervio se realizó a una distancia de aproximadamente 1 mm de su entrada al músculo. Inmediatamente luego de este procedimiento, se cerró la incisión en la piel con un punto de sutura. Los animales fueron luego mantenidos en el bioterio con el mismo régimen que el resto de los animales.

En estas condiciones a las 48 hs de la operación no se registra actividad sináptica en el

músculo. La transmisión sináptica se reanuda aproximadamente a los 6-8 días de la desnervación.

La aplicación de IgG en estos ratones se realizó 48 hs. después de la compresión del nervio y se utilizó el esquema normal con perfusión 48 hs. después de la última inyección.

Se estudiaron 2 ratones con cada una de las siguientes IgGs:
IgG de ELA: paciente ELA 7
IgG control: persona sana C7
IgG con otra enfermedad neurológica: EC4.

Botulinización

La inyección local de la toxina *Clostridum botulinum* tipo-A (BoTx-A) en músculos esqueléticos produce una profunda parálisis de los mismos, la cual es transitoria. El mecanismo de acción es a través del bloqueo de la liberación evocada de acetilcolina en los terminales motores al clivar la proteína SNAP-25, e interrumpir la exocitosis. Luego de la inyección subcutánea de BoTx-A, los ratones no pueden mover las orejas por parálisis del músculo y la actividad se recupera lentamente y se normaliza recién luego de transcurridas 4 semanas.

Bajo una ligera anestesia en una cámara con éter, se inyectaron ratones adultos con toxina botulínica tipo A, 1 IU en 50 µl de solución salina, dosis que corresponde a una dosis letal 50 para el ratón. La inyección se aplicó subcutáneamente sobre la porción izquierda del músculo. La solución fue preparada unos minutos antes de la inyección. Cuatro días después de la botulinización (cuando el músculo se bloquea en forma máxima), se comenzaron las aplicaciones de IgG. Se realizó el esquema normal: 10 dosis y perfusión 48 hs. después de la ultima inyección.

Perfusión y cortes

Los animales fueron anestesiados ligeramente con éter y perfundidos a través del corazón con buffer fosfato salino con 0.01 % de heparina como anticoagulante (5 minutos) y solución fijadora conteniendo 4% de paraformaldehido (20-25 min.). El tallo cerebral o protuberancia (y la médula cervical y lumbar en algunos casos) fueron colocados en inmersión en el mismo fijador por 4 hs. y puestos en una solución 30% sacarosa-PBS para remover el fijador y evitar la formación de cristales de agua (aproximadamente 24 hs.). Las preparaciones fueron congeladas con diclorodifluorometano y mantenidas a -20 °C.
Se realizaron cortes seriados de 15 μm del tejido nervioso en crióstato (Leitz 1720). Las secciones fueron montadas sobre portaobjetos gelatinizados, secados al aire, y mantenidos a -20 °C hasta su procesamiento por inmunohistoquímica. Sistemáticamente se separaron algunas secciones para posterior tinción con Cresil violeta a fin de observar la morfología de las neuronas y realizar conteo celular del núcleo del facial.
Los portas fueron gelatinizados luego de un extensivo lavado con detergente y una mezcla de alcohol y ácido clorhídrico (alcohol 70 % + 1 % de ClH fumante) y lavados en agua destilada. La gelatina aplicada a los portas fue preparada en 200 ml de agua destilada y 2 gr. de gelatina y 0.2 gr. de cromo alumbre).

Protocolo de Inmunocitoquímica

Las secciones se lavaron con PBS (3 lavados de 5 minutos cada uno) y la actividad de la peroxidasa endógena se eliminó con 0.3% de H_2O_2 en PBS por 30 minutos y luego se enjuagaron los cortes con PBS (2 x 5 minutos). Para saturar sitios inespecíficos las secciones se incubaron con 5% de suero normal de cabra (NGS) por 30 minutos. Se aplicó el anticuerpo contra IgG Humana biotinilado (purificado por afinidad) sobre los cortes. La dilución utilizada fue 1:400 en PBS-5% NGS. Se incubó durante toda la noche a 4 ° C. Luego de 2 lavados con PBS, las secciones fueron incubadas por 30 minutos con el complejo avidina-peroxidasa, ABC Vectastain. Para una inmunoreacción más evidente se utilizó una variante con níquel a fin de obtener precipitados de color negro. Los portas se sumergieron durante 10 minutos en la solución reveladora (0.035% 3,3' diaminobenzidina,

2.5% sulfato de níquel amonio, 0.1% H_2O_2 en buffer acetato de sodio 0.1 M, pH 6). Se detuvo la reacción luego de 15 min. con varios lavados con buffer acetato de sodio. Luego de deshidratar los cortes, se cubrió los mismos con bálsamo de Cánada y cubreobjetos.
Siempre se procesaron simultáneamente secciones de animales tratados con IgG control e IgG de ELA. Para el control de la secuencia de inmunotinción, algunas secciones fueron procesadas con la omisión del anticuerpo contra IgG humana o del ABC Vectastain.

Análisis y cuantificación computarizado de los datos

Los portaobjetos fueron rotulados con un código y todo el proceso de cuantificación fue realizado sin tener acceso a dicho código a fin de realizar una evaluación objetiva.
Las observaciones obtenidas en el microscopio óptico (Zeiss Axiophot) fueron transferidas a una cámara de video conectada a un sistema interactivo de análisis de imágenes en línea (KONTRON-ZEISS VIDAS 2.0).
Las imágenes fueron digitalizadas en un arreglo de 1024 x 1024 que corresponden a 280 x 280 μm. La resolución de cada pixel es de 256 niveles de grises siendo 0 el valor correspondiente al color blanco y 256 el valor de negro.
La inmunotinción de las motoneuronas del núcleo del facial (ipsi y contralateral, con respecto al sitio de la inyección) se determinó de la siguiente manera:
Se seleccionaron 20 secciones al azar de cada animal.
En cada sección se cuantificó el grado de tinción de las motoneuronas del lado ipsilateral y contralateral.
En cada motoneurona se midió la inmunomarcación (grises) de por lo menos 15 puntos del citoplasma.
Se promediaron los valores de inmunomarcación de las neuronas de cada lado y luego se promediaron los valores de los tres ratones inyectados con cada IgG.

Las diferencias entre medias y error estandart del lado ipsilateral y contralateral del núcleo del facial del grupo experimental y control fueron analizadas estadísticamente usando el test *t* de Student considerando significativo un valor $p <$ de 0.05.

Conteos neuronales

Para cada protuberancia estudiada, tres secciones teñidas con la técnica de Nissl (una en la mitad del núcleo del facial y dos correspondientes a planos equidistantes anterior y posterior del nivel medio) fueron separadas para el conteo neuronal. Las motoneuronas fueron identificadas por la presencia de un gran núcleo, con nucléolo evidente y presencia citoplasmática de gránulos basófilos de Nissl. Se realizó un conteo de las neuronas presentes en el núcleo a una magnificación de 200 x.

Tinción de Nissl:

Los portaobjetos se sumergieron por 5 minutos en agua destilada y en la solución de cresil-violeta 10-15 minutos. Se diferenciaron en agua por 3-5 minutos y luego fueron deshidratados a través de pasajes por alcoholes crecientes (70-96-100 %). Luego de dos pasajes por Xilol, se puso bálsamo de Canadá y cubreobjetos.

Protocolo de preparación de Cresil-violeta 0.5 %
Mezclar 2.5 g de cresil-violeta (Chroma Gesellschaft), 300 ml de agua, 30 ml de 1 M de acetato de sodio y 170 ml de ácido acético glacial 1 M.
Mezclar la solución en agitador magnético por lo menos durante 96 hs. y filtrar.

Estudios electrofisiológicos

Experimentos con IgG

Disección y montaje del músculo
Luego de la aplicación de IgG humana con el protocolo de 10 aplicaciones en 5 días, los ratones tratados se sacrificaron a dos tiempos distintos y se estudió el contenido cuántico del músculo elevador de la oreja mediante el empleo de técnicas electrofisiológicas

La disección fue realizada:
A) una semana después de la última inyección (protocolo de corto plazo)

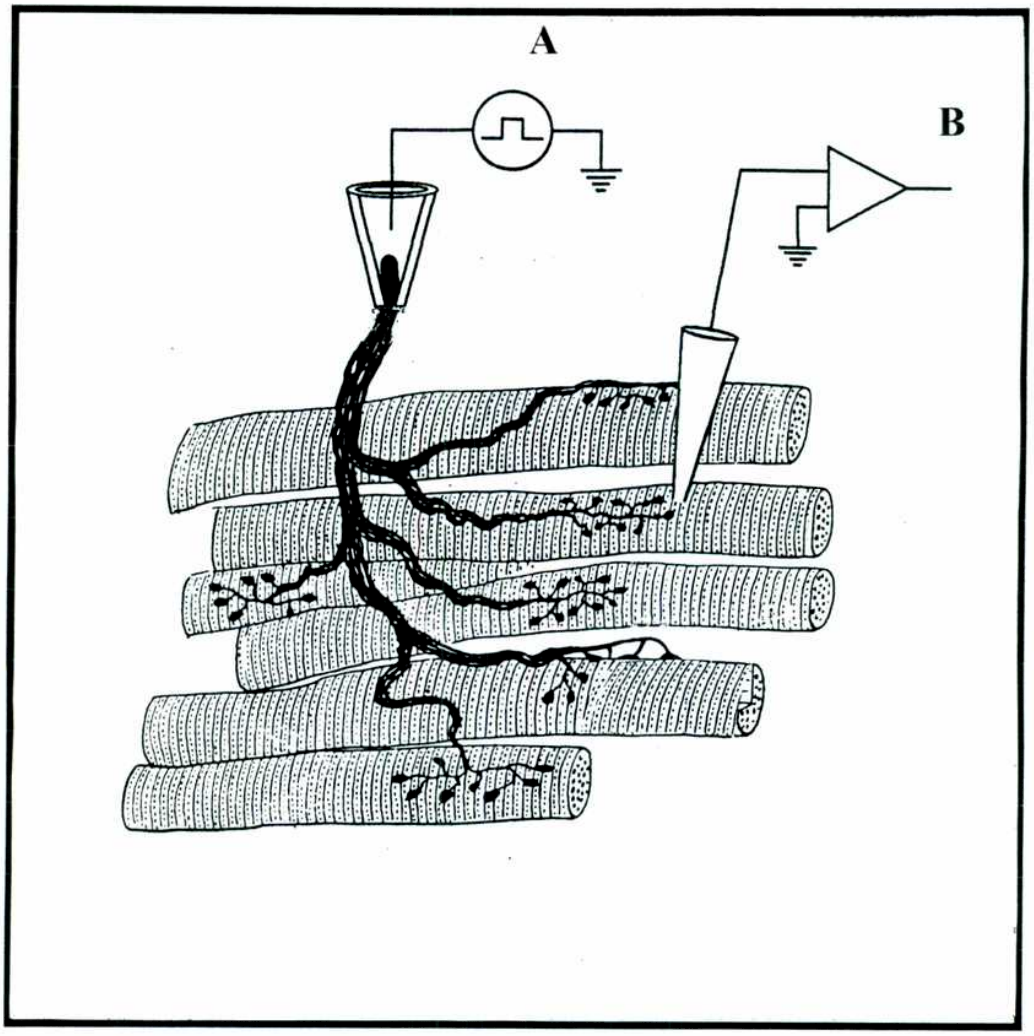
B) 4 semanas después de la última inyección (protocolo de largo plazo)

Para ello, en el día correspondiente a cada protocolo, los animales fueron sacrificados por medio de una sobredosis de anestesia (tribromoetanol al 2 % en H2O destilada, 0.3 ml/10 g de peso corporal, I.P) y posterior desangrado. Se removió el músculo levator auris con el nervio motor que lo inerva. El músculo fue disecado en solución Ringer normal para ratón con la siguiente composición (en mM): 137 NaCl; 5 KCl; 2 $CaCl_2$; 1 $MgSO_4$; 12 $NaHCO_3$; 1 NaH_2PO_4; 11 glucosa; y se la mantuvo bajo burbujeo constante con carbógeno (95%O_2, 5% CO_2), pH 7,4.
En los casos en que además del experimento de electrofisiología se realizó ICQ de la protuberancia, los animales fueron anestesiados ligeramente con éter y luego de una rápida remoción del músculo con el nervio motor que lo inerva, se realizó la perfusión del animal como fue descripta para los estudios de captación de IgG.

Se realizó la disección fina del músculo dentro de una cámara (de acrílico o vidrio con base de Sylgard®) donde se lo sujetó y estiró, mediante el uso de agujas de entomología.

Una vez que el músculo se encontraba en la cámara para registro electrofisiológicos, se lo estiró al máximo de su extensión con el objeto de obtener una buena separación entre los fascículos que lo conforman. Se disecó el nervio del tejido conectivo circundante para luego poder estimularlo eléctricamente. En dicha cámara se aplicaron todas las soluciones y bloqueantes.
La cámara de registros, con el músculo a estudiar, se colocó sobre la platina de un microscopio con un objetivo 10 x. A ambos costados del microscopio, se ubican los micromanipuladores que permitieron el correcto posicionamiento de los microelectrodos de registro en la región de las placas neuromusculares, identificadas mediante seguimiento visual en el microscopio óptico.
Tanto los micromanipuladores como el microscopio, se encontraban apoyados sobre una mesada aislada en forma mecánica por el uso de un colchón de aire, y todo en su conjunto (mesada, microscopio y manipuladores) dentro de una jaula de Faraday para su aislamiento

ESQUEMA DE UNA PREPARACION NERVIO-MUSCULO DE RATON



El músculo se ubica en una cámara de acrílico en la cual se colocan todas las soluciones continuamente oxigenadas. En A, se muestra el electrodo de succión utilizado para estimular al nervio. En B, se esquematiza al electrodo de registro, el cual se inserta en la fibra muscular en las cercanías de una placa.

eléctrico. Durante todo el experimento el músculo estuvo bajo burbujeo superficial con carbógeno.

Las soluciones en la cámara de registro, fueron renovadas cada media hora por soluciones oxigenadas. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (20-25° C).

Estimulación del nervio:

Se utilizaron dos formas para la estimulación del nervio del levator auris longus:

Estimulación directa

Estimulación mediante un electrodo de succión.

Estimulación directa: La cámara de registro donde se colocó el músculo cuenta con una región especial en la cual se colocó el nervio sobre dos electrodos de platino. Se cubrió el mismo con una gruesa capa de grasa y se lo presionó con un cubreobjetos para evitar filtraciones de la solución desde la cámara de registro donde se encuentra el músculo, evitando fugas de corriente.

Estimulación mediante un electrodo de succión: Se succionó el nervio con una pipeta de vidrio de tamaño adecuado al grosor del cabo del nervio a fin de que este quedara firmemente succionado, evitándose así fugas de corriente. Dicha pipeta se conectó a una jeringa plástica con émbolo. Dicha pipeta se conectó a un electrodo de estimulación.

Con ambas formas de estimulación del nervio, el mismo recibió pulsos de 0.01-0.02 ms de duración, variándose la amplitud del estímulo hasta encontrar el umbral para la contracción del músculo. Luego de determinar el umbral, se trabajó con una amplitud de estímulo supramáxima (3-10 veces el umbral).

Potenciales evocados

Para el registro de los potenciales evocados de placa (EPPs) se utilizó la técnica convencional de registro intracelular con microelectrodos. Los mismos se construyeron utilizando capilares de vidrio duro (borosilicato de aluminio, Corning #6030) con microfilamento, mediante un estirador marca David Kopf modelo 700-C, y se llenaron con

una solución conductora (3 M KCl). Los electrodos utilizados poseían una resistencia de 10-20 MΩ. El microelectrodo de registro fue conectado al cabezal de un amplificador Axoclamp 2 A. El cabezal estaba sujeto a un micromanipulador, mediante el cual se posicionó el electrodo en la región de las placas neuromusculares.

La salida del amplificador del cabezal fue conectada a un amplificador Axoclamp 2-A y la señal de salida de éste (X10) fue amplificada 100 veces mediante un amplificador Axon Instruments modelo AI 2020. Los potenciales fueron visualizados utilizando un osciloscopio con memoria Tektronix modelo 5313 y al mismo tiempo enviada, vía una interfase analógico digital a una computadora para su posterior análisis. Como referencia se utilizó un electrodo de plata clorurado distante, conectado a la solución del baño vía un puente de agar (agar 3.5 % en una solución salina).

La contracción muscular fue suprimida con d-tubocurarina (d-Tc, 0.6-2 μM), antagonista del receptor nicotínico de acetilcolina (Ach). Se buscó una concentración de d-Tc adecuada de manera tal que las amplitudes de los potenciales de placa evocados (EPPs) fluctuaran entre los 0.5 y 4 mV. Este rango de amplitudes proporciona una adecuada relación señal-ruido y asimismo evita tener que corregir la amplitud de los potenciales de placa por sumación no lineal (McLachlan y Martin, 1981).

En todos los casos, se comenzaron los registros de potenciales de placa luego de 30 minutos de incubación de la preparación en la solución de trabajo correspondiente.

El microelectrodo de registro se insertó en las fibras musculares en las regiones de las placas, identificadas mediante el seguimiento visual de las ramificaciones finas del nervio motor.

La correcta ubicación del microelectrodo respecto de la placa neuromuscular, se evaluó por el tiempo que tarda el EPP en alcanzar su amplitud máxima (tiempo de subida). Para ello se midió el tiempo desde el pie al pico del potencial de placa (contabilizado entre el 10 y el 90 % de la excursión temporal total). Se descartaron todos aquellos registros en los cuales dicho tiempo fuese mayor que 1 ms. Todos aquellos registros en los cuales el potencial de reposo (Vm) de la fibra muscular estuviese por debajo de < -50 mV fueron descartados.

Cada experimento se realizó por lo menos dos veces y se registraron por lo menos los

EPPs de 15 fibras en ausencia de bloqueantes de CCVD (consideradas fibras controles). Luego de cambió la solución del baño por una solución con el bloqueante y luego de una incubación de 45 minutos, se registraron por lo menos 15 fibras en presencia de dicho bloqueante.

Registros de fibra única

En el caso de los animales inyectados con IgG de ELA 12, ELA 13 y EC6, el efecto de la aplicación de los bloqueantes sobre el contenido cuántico fue evaluado en una misma fibra. Para ello, se colocó en la cámara de registro un volumen determinado de Ringer (con d-Tc) y se buscó una fibra muscular con un Vm estable. Se registraron los potenciales de placa de dicha fibra y sin retirar el microelectrodo de registro de la misma, se agregó en la cámara el volumen necesario del bloqueante a estudiar (usualmente unos pocos microlitros). Cada 5 minutos, se estimuló el nervio y se obtuvo un registro a lo largo de 45-60 minutos de la acción del bloqueante sobre el contenido cuántico. Luego se cambió varias veces la solución de la cámara y se registraron el resto de las fibras en presencia del bloqueante en cuestión.
En algunos casos, la fibra fue identificada por sus características morfológicas, lo cual hizo posible que se pudiera volver a impalar la misma fibra luego del agregado del bloqueante.

Evaluación del contenido cuántico de la liberación

Para la evaluación del contenido cuántico de la respuesta evocada (*m*, número medio de cuantos liberados por impulso nervioso), se utilizó el método de la varianza (Martin, 1966). Como el número de cuantos en el potencial de placa fluctúa de acuerdo a la ley de Poisson, bajo condiciones constantes, se puede derivar *m* a partir de la varianza de las amplitudes de los EPPs y de la media de las amplitudes de los mismos:

$$m = (V_{EPP})^2 / ((\sigma_{EPP})^2-(\sigma_{ruido})^2)$$

donde V_{EPP} es la amplitud media de 50 potenciales de placa sucesivos y σ_{EPP} y σ_{ruido} son la desviación estándar de las amplitudes de los potenciales de placa y del ruido, respectivamente.

La varianza del ruido se midió utilizando intervalos de tiempo iguales a los utilizados para obtener la media y la varianza de las amplitudes de los EPPs.

Luego de haber incubado la preparación en solución de Ringer normal con la concentración adecuada de d-Tc, se procedió de la siguiente manera: una vez impalada la fibra muscular en la zona de placa, se estimuló el nervio a una frecuencia de 0.5 Hz y se registraron 50-100 EPPs. Se descartaron los primeros 20-30 potenciales previos a la adquisición de los 50 potenciales que se utilizaron para el análisis. Este descarte se realizó debido a que los primeros potenciales del tren de estimulación van disminuyendo su amplitud, ya sea por variaciones en el tamaño del cuanto o por fluctuaciones en el *m* (Hubbard y col., 1969). Este es un requerimiento importante para la utilización del método de la varianza, ya que la varianza medida solo debe reflejar las fluctuaciones debidas a la naturaleza estadística del proceso de liberación. Además, se descontó la varianza producida por el ruido (σ_{ruido}) en cada registro.

En el resto de los casos, se mantuvo la misma concentración de d-Tc durante todo el experimento.

Bloqueantes utilizados

Se utilizaron las toxinas polipeptídicas ω-CgTX-GVIA y ω-Aga-IVA para bloquear los CCVD de tipo P/Q y N respectivamente. En estos casos, los experimentos fueron realizados en presencia de 0.01% de albúmina bovina en la solución de registro. En el caso de la aplicación de la ω-Aga-IVA, la amplitud del EPP fue disminuyendo con el tiempo de incubación hasta hacerse nula por lo que en esos casos, se eliminó el d-Tc luego del agregado del bloqueante.

La DHP, Nitrendipina, fue utilizada para bloquear los CCVD de tipo L. Para ello, se incubó el músculo con la DHP por 45 minutos y a partir de ese momento todas las fibras estuvieron en presencia del bloqueante y en oscuridad excepto por el tiempo requerido para el posicionamiento del electrodo de registro.

La solución de nitrendipina fue preparada unos minutos antes de su uso a partir de un stock

50 mM en DMSO (solvente del antagonista) 100%, guardada a 4 ° C y protegida de la luz. La concentración de DMSO en la solución final fue de 0.1-0.3% (v/v) y en experimentos control (no se muestran), esta concentración de DMSO no afectó los parámetros a estudiar.

Experimentos con suero:

El objetivo de estos experimentos es el de definir la acción o efectos tempranos de la aplicación de suero sobre la transmisión neuromuscular. En esta sección no se busca ver el efecto de las IgG. El foco esta puesto en los efectos a corto plazo in vivo de factores humorales sobre los EPPs evocados neuralmente y sobre el contenido cuántico. Utilizando el modelo de transferencia pasiva en ratón, hemos testeado la habilidad de ciertos sueros de alterar los parametros pre y postsinápticos de la transmisión neuromuscular y los resultados comparados con aquellos producidos por sueros controles de sujetos sanos.
El estudio se realizó en el músculo esquelético diafragma de los ratones tratados y se estudió la frecuencia de potenciales miniaturas y EPPs. Para ello, se inyectaron ratones intraperitonealmente con 1 ml de suero humano durante tres días (1 ml/día). La inyección fue realizada luego de ser anestesiados muy ligeramente en una cámara con halotano.

Los sueros utilizados fueron:

ELA 12: suero de un paciente con ELA esporádica
EC6: suero de un paciente con ELA familiar
Grupo control: conjunto de suero de 4 personas sanas (rango de edades: 30-48 años)

Al cuarto día, los mismos fueron sacrificados por una sobredosis de anestesia (2 % tribromoetanol en H_2O bidestilada, 0.3 ml/10g de peso corporal, I.P.) y posterior desangrado extrayéndoseles el músculo diafragma junto con el nervio frénico. Apenas extraído, el diafragma fue inmediatamente colocado en una caja de Petri con base de Sylgard® conteniendo solución Ringer normal para ratón con la siguiente composición (en mM): 137 NaCl; 5 KCl; 2 $CaCl_2$; 1 $MgSO_4$; 12 $NaHCO_3$; 1 NaH_2PO_4; 11 glucosa; y bajo burbujeo constante con carbógeno (95%O2, 5% CO2), pH 7,4.

El músculo fue sometido a una limpieza de los huesos de las costillas y del tejido conectivo para facilitar el registro electrofisiológico. Dado que el diafragma se encuentra dividido en dos hemidiafragmas, se separaron para obtener dos porciones y una de ellas se utilizó para el registro de MEPPs y el otro para EPPs. El hemidiafragma fue cortado siguiendo la dirección de las fibras musculares.
Tanto para el registro de los potenciales miniaturas (MEPPs) como para los potenciales de placa, se utilizó la técnica convencional de registro intracelular con microelectrodos ya descripta. El microelectrodo de registro se insertó en las fibras musculares en las regiones de las placas identificadas mediante seguimiento visual mediante microscopio óptico.

Liberación espontánea del neurotransmisor

No se succionó el nervio motor ni se agregó d-Tc para inhibir la contracción muscular. Se utilizaron las soluciones de Ringer normal ya descriptas. Una vez impalada la fibra muscular en la zona de placas en las cercanías del nervio, se registraron los potenciales miniaturas durante un minuto como mínimo.
La correcta ubicación del microelectrodo respecto de la placa neuromuscular, fue constatada por el tiempo de subida de los MEPPs; considerándose como tiempo de subida la excursión temporal entre el 10 y el 90% de la amplitud total del miniatura.
La salida del amplificador del cabezal fue conectada a un amplificador Axoclamp 2-A y la señal de salida de este (X10) fue amplificada 100 veces mediante un amplificador Axon Instruments modelo AI 2020. Los potenciales fueron visualizados utilizando un osciloscopio con memoria Tektronix modelo 5313 y al mismo tiempo enviada, vía una interfase analógico digital a una computadora para su posterior análisis.

En algunos casos, se procedió a una digitalización de la señal por un sistema PCM (Medical System Corp.), la cual fue almacenada en una cinta de video para su posterior análisis.
El análisis consistió en la medición de la frecuencia de MEPPs/min. Los valores obtenidos para las diferentes condiciones experimentales, son los promedios y los errores estándar, de por los menos 15 fibras musculares. Cada suero fue estudiado en por lo menos dos

ratones.

Las soluciones en la cámara de registro, fueron renovadas cada media hora por soluciones oxigenadas.

Potenciales evocados

Se utilizó el hemidiafragma disecado con una porción del nervio frénico, el cual se liberó de tejido conectivo y grasa. Se colocó el músculo de la misma manera que para el registro de MEPPs pero en este caso, la cámara de registro cuenta con una región especial en la cual se coloca el nervio sobre dos electrodos de platino. Se cubrió el mismo con una gruesa capa de grasa y se la presionó con un cubreobjetos para evitar filtraciones de la solución de la región donde se encuentra el músculo, evitando fugas de corriente. La generación de pulsos de estimulación y adquisición de señales se realizaron por computadora, a través de un conversor A/D-D/A Tecmar Labmaster, con el programa Pclamp 5.5.

Se estimuló el nervio con pulsos de 0.01-0.02 milisegundos de duración, variándose la amplitud del estímulo hasta encontrar el umbral para la contracción del músculo. Luego de determinar el umbral, se eligió una amplitud supramáxima del estímulo (10 veces el umbral).

Antes de comenzar los registros se incubó el músculo por lapso de una hora en una solución de bajo calcio- alto magnesio (1.2- 8 mM respectivamente) en la cual el músculo no se contrae. El resto de los componentes y su concentración en la solución del baño fueron los mismos que los utilizados para preparar la solución de Ringer normal.

En estas condiciones no siempre que se da un estímulo se obtiene un potencial de placa debido a la baja concentración de calcio y por lo tanto se obtiene una falla en la liberación de neurotransmisor ante un estímulo.

Evaluación del contenido cuántico

Para la evaluación del contenido cuántico en soluciones de bajo calcio se utilizó el método de fallas (m_f) (Martin, 1966).

$$m_f = \ln (N/N_f)$$

donde N_f es el número de fallas observadas durante un número de estímulos (N).

Una vez impalada la fibra muscular en la zona de la placa, se dieron 100-150 estímulos sucesivos a una frecuencia de 0.5 Hz y se contó el número de fallas.

Análisis estadístico

Las diferencias entre medias y error estandart del lado ipsilateral y contralateral del núcleo del facial del grupo experimental y control fueron analizadas estadísticamente usando el test *t* de Student considerando significativo un valor $p <$ de 0.05.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Instat 2.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) con el cual se sometió a los datos a un *t*-student de dos colas.

Se utilizó un test no paramétrico en los casos en que los desvíos eran muy diferentes. (*t* test Welch de dos colas para datos no apareados y no asumiendo varianzas iguales).

En los estudios de electrofisiología, las comparaciones entre contenidos cuánticos obtenidos antes y despúes de la aplicación de los antagonistas fueron realizados por el método de análisis de la varianza, Anova de dos factores (Zar, 1996). Los valores son expresados como media ± S.E.M, a menos que se indique lo contrario.

Reactivos, drogas y toxinas

La toxina ω-AgaIVA fue provista por Nicholas Saccomano (Pfitzer Inc., Easter Point Rd., Grotton, CT 06340). La toxina polipeptídica sintética ω-conotoxina GVIA (ω-CgTx GVIA) fue comprada a Alomone Labs. (Jerusalem, Israel). La Nitrendipina se compró en Research Biochemicals International, RBI (Natick, MA, USA). El tribromoetanol se compró en Aldrich (Milwakee, WI, USA). La d-Tubocurarina (d-Tc), la albúmina de suero

bovino (BSA) y todos los otros reactivos utilizados fueron de grado de pureza analítico y se compraron a Sigma Chemicals Co. (St. Louis, Mo, USA).

La toxina botulínica tipo A fue generosamente provista por Allergan Laboratories (Buenos Aires, Argentina).

La Heparina sódica fue comprada en el Lab. Abbott.

El sulfato de amonio y níquel utilizado fue de marca Mallinckrodt.

El aerosol con diclorodifluorometano fue comprado en Philips.

La columna de Proteína G utilizada fue la HiTrap affinity column de 5 ml, de Pharmacia Biotech.

La DEAE 23 Cellulose SS fue obtenida de Serva (Heidelberg, Germany).

El DiI fue compardo a Molecular Probes.

Se utilizaron agujas 30 G1/2 de B-D Precision Glide Needles, by Becton Dickinson, NJ USA.

RESULTADOS

Captación de IgG humana por terminales motores normales

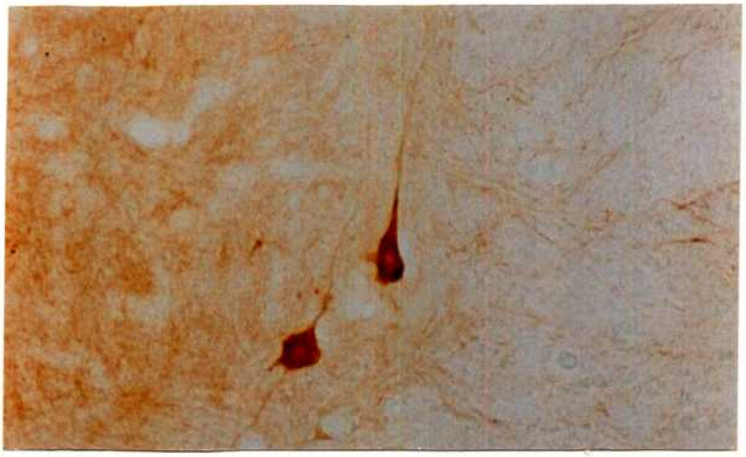
Como una primera aproximación al tema de captación de IgG exógena por terminales motores de ratón, se procedió a la aplicación de IgG humana en distintas preparaciones. Posteriormente, utilizando técnicas de ICQ, se detectó la misma en los somas de motoneuronas.

En un primer estudio se utilizó un músculo inervado por motoneuronas ubicadas en la médula espinal lumbar.

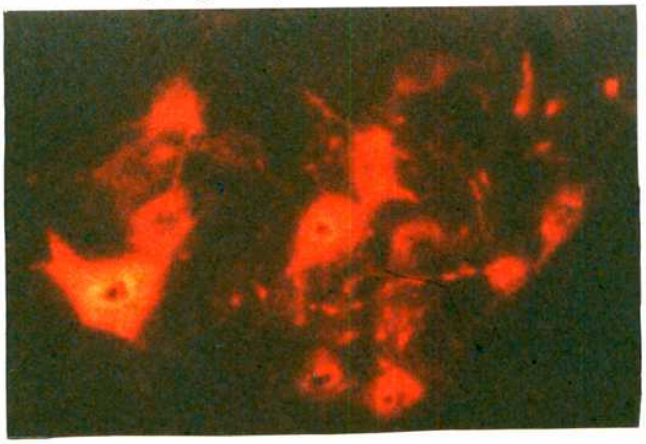
Para ello distintas IgGs humanas fueron inyectadas en el músculo extensor del muslo posterior de la pata izquierda del ratón. Las inyecciones fueron aplicadas una vez por día y repetidas durante 3 a 5 días. Luego de 24 hs. de la última inyección se perfundieron los animales y se disecó la médula lumbar. Se hicieron cortes transversales en crióstato y mediante la aplicación de anticuerpos específicos se logró la detección de la IgG.

Las motoneuronas del asta anterior de la médula lumbar mostraron una tinción intracitoplasmática perinuclear del lado ipsilateral a la inyección (Figura 1).

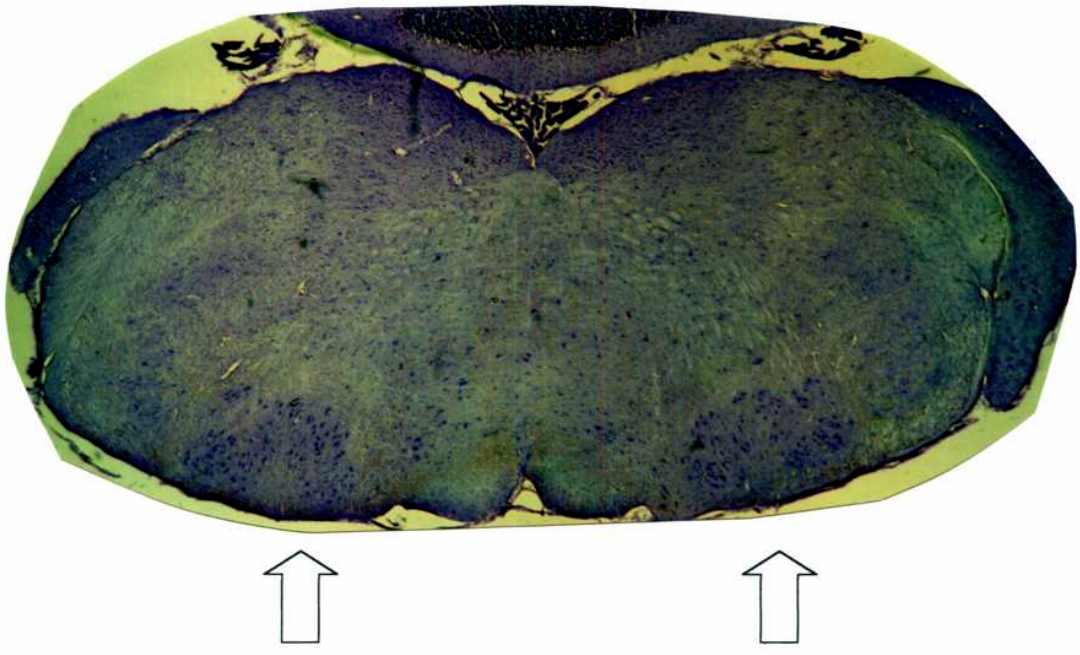
La marca resultó ser selectiva para las motoneuronas con una tinción leve del neuropilo alrededor de las mismas. Las meninges se tiñeron positivamente (Figura 2). La manera de aplicación de IgG no resulta conveniente ya que resulta dañado el músculo.



Por esta razón (y como ya fue comentado en M&M), el siguiente paso fue localizar los somas de las motoneuronas inervantes del músculo elevador de las orejas del ratón, levator auris longus. Mediante la aplicación de un marcador fluorescente, el DiI, se localizaron los somas de las motoneuronas inervantes del músculo levator auris en el núcleo del facial del ratón. Para ello se colocó el marcador en el nervio antes de la entrada del mismo al músculo y luego de esperar el tiempo necesario para permitir el transporte axonal retrógrado hasta los somas de las MN, se obtuvieron cortes transversales del tallo cerebral. La observación de los cortes obtenidos de la protuberancia del ratón tratado en un microscopio de fluorescencia evidenció los somas neuronales en el parte ventral del tallo cerebral ipsilateral al sitio de la inyección del marcador (núcleo del facial) (Figura 3).



Dichas motoneuronas son además fácilmente reconocibles en cortes teñidos con la técnica de Nissl, la cual evidencia las moléculas basófilas de las células. Para ello se realizaron cortes de la protuberancia de ratones normales, los cuales fueron teñidos con dicha técnica. Por observación de dichos cortes en un microscopio óptico de campo claro se detectaron a las motoneuronas presentes en el núcleo del facial, las cuales conforman una zona bien delimitada y presentan una basofilia intensa en el pericarion, con el núcleo localizado centralmente (Figura 4).



Núcleo del facial

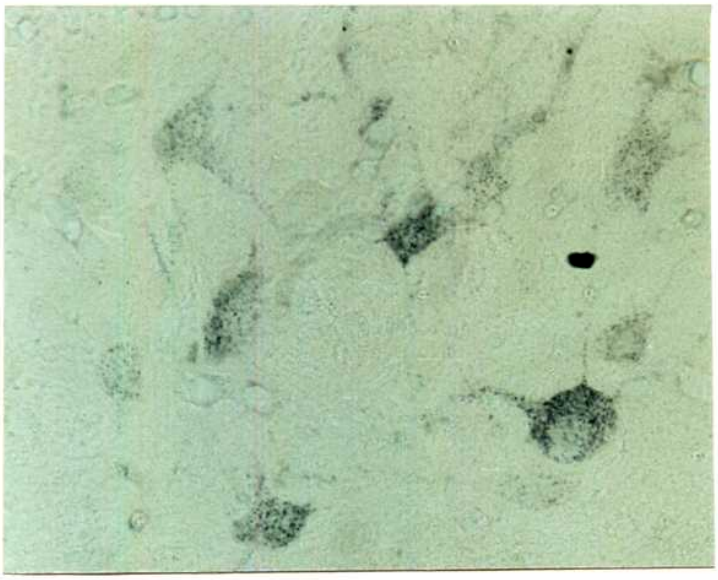
A fin de estudiar si la IgG humana, aplicada en las cercanías de los terminales motores del levator auris, podía ser detectada en los somas neuronales, se realizaron estudios preliminares. Para ello, en un principio se inyectó la solución de IgG, subcutáneamente una vez por día durante 4 días y se perfundieron los animales 48 hs. después de la última inyección. La marca obtenida fue muy tenue y difusa con una leve tinción en meninges, vasos y tinción ausente en los somas neuronales.

Se aplicó IgG un mayor número de veces (6 inyecciones, 2 veces por día) y se realizó la perfusión de los animales 48 hs. después de la última inyección. En estos casos, la tinción obtenida, aunque tenue, fue más evidente pudiéndose localizar la misma en los somas neuronales.

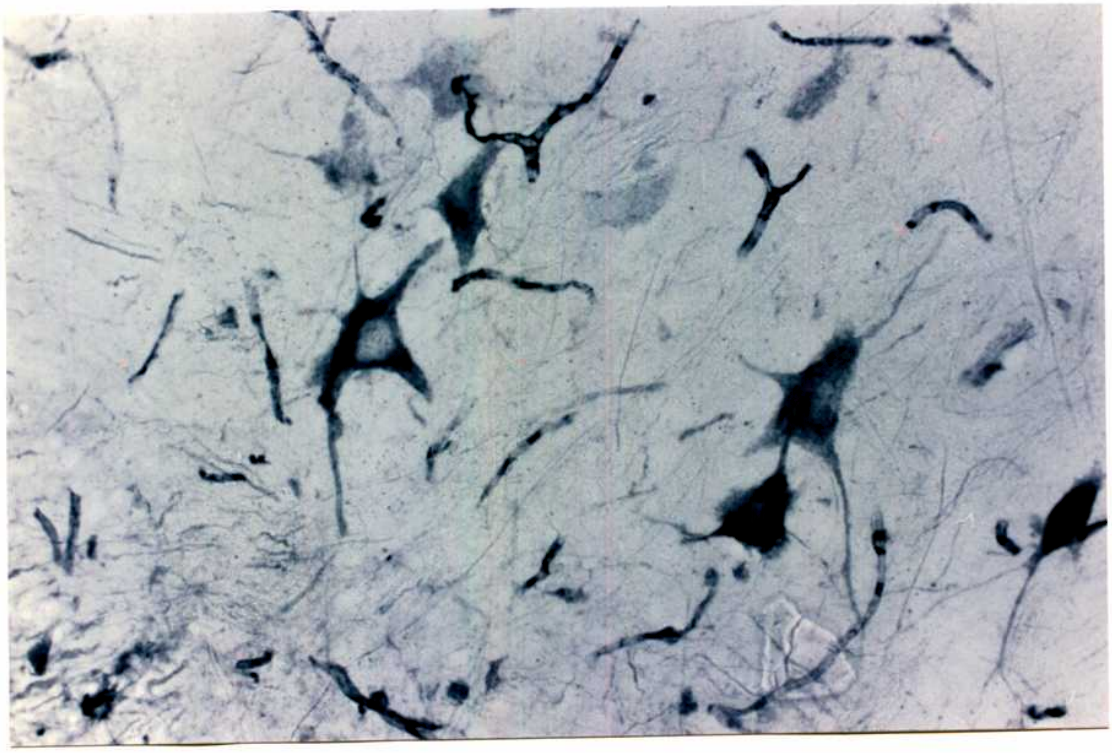
Finalmente, se eligió un protocolo de 10 aplicaciones de IgG en total, con perfusión de los animales 48 hs. después de la ultima inyección. Utilizando este protocolo, en los cortes obtenidos e independientemente de la IgG considerada, se observaron distintos grados de inmunorreactividad en las motoneuronas positivamente marcadas. La inmunotinción fue muy intensa en las meninges y vasculatura asociada. En algunos animales, fue observada una tinción difusa del neuropilo en áreas discretas alrededor de capilares y vasos pequeños. Aunque la actividad de la peroxidasa endógena de los glóbulos rojos fue bloqueada, en muchos casos el endotelio de los vasos se tiñó positivamente con el anticuerpo específico contra la IgG humana (Figura 5).

Esta marca de los vasos fue más intensa en los casos de los ratones tratados con la IgG de ELA, como se aprecia en la foto. La mayoría de las dendritas proximales también contenían material inmunorreactivo. Los astrocitos y oligodendrocitos no fueron teñidos.

Las motoneuronas, independientemente de la IgG considerada, mostraron los gránulos específicos de tinción distribuidos en el citoplasma mientras que el núcleo no presentó inmunoreacción (Figura 6).



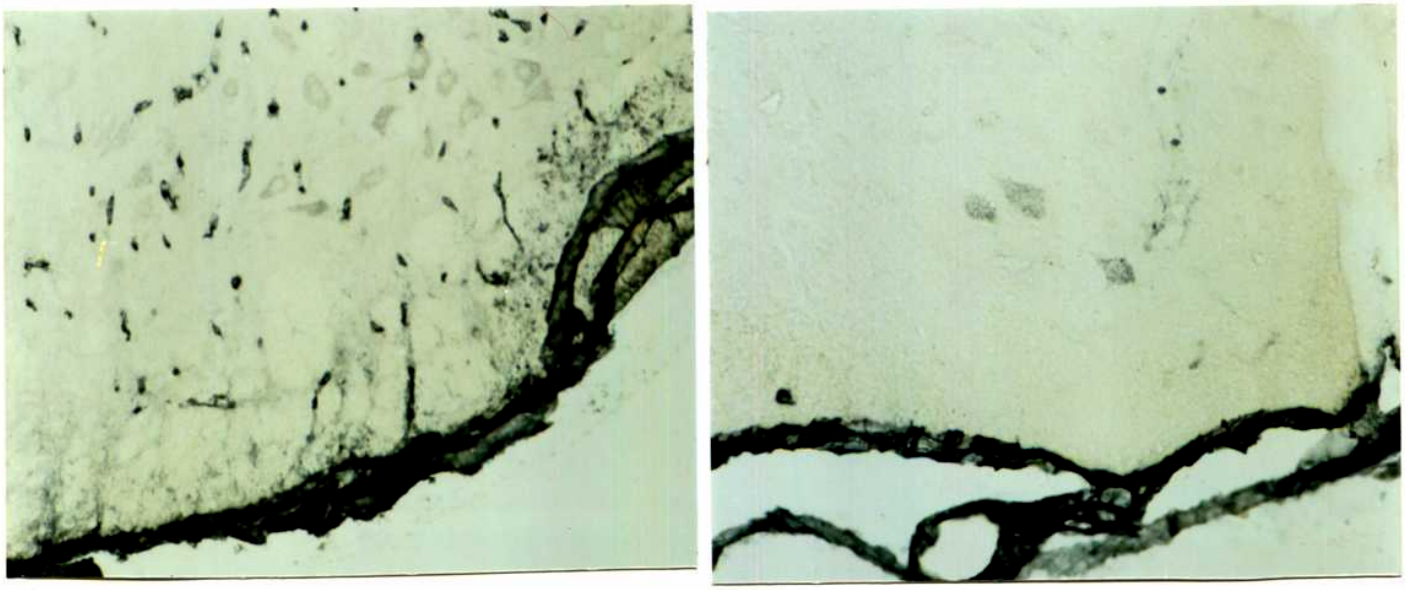
Asimismo en todos los casos, la inmunorreactividad fue siempre más intensa en el núcleo del facial del lado ipsilateral al sitio de la inyección con respecto al lado contralateral (Figura 7, LADO IPSILATERAL).



Diferentes grados de inmunorreactividad fueron encontrados en las neuronas ipsilaterales de los animales tratados con las diferentes IgG de ELA. En todos los casos, la tinción fue más evidente en el caso de los ratones tratados con la IgG de ELA con respecto a los animales inyectados con IgG control. Asimismo, la inmunorreactividad de las neuronas ipsilaterales fue siempre mayor que la encontrada en cualquiera de los dos lados de los animales controles.

Esta foto corresponde a un animal inyectado con IgG control. Se observan pocas neuronas en ambos lados, de tinción similar. Del lado ipsilateral se observan más neuronas y la tinción de los vasos es mayor en el lado ipsilateral.

Ipsilateral Contralateral



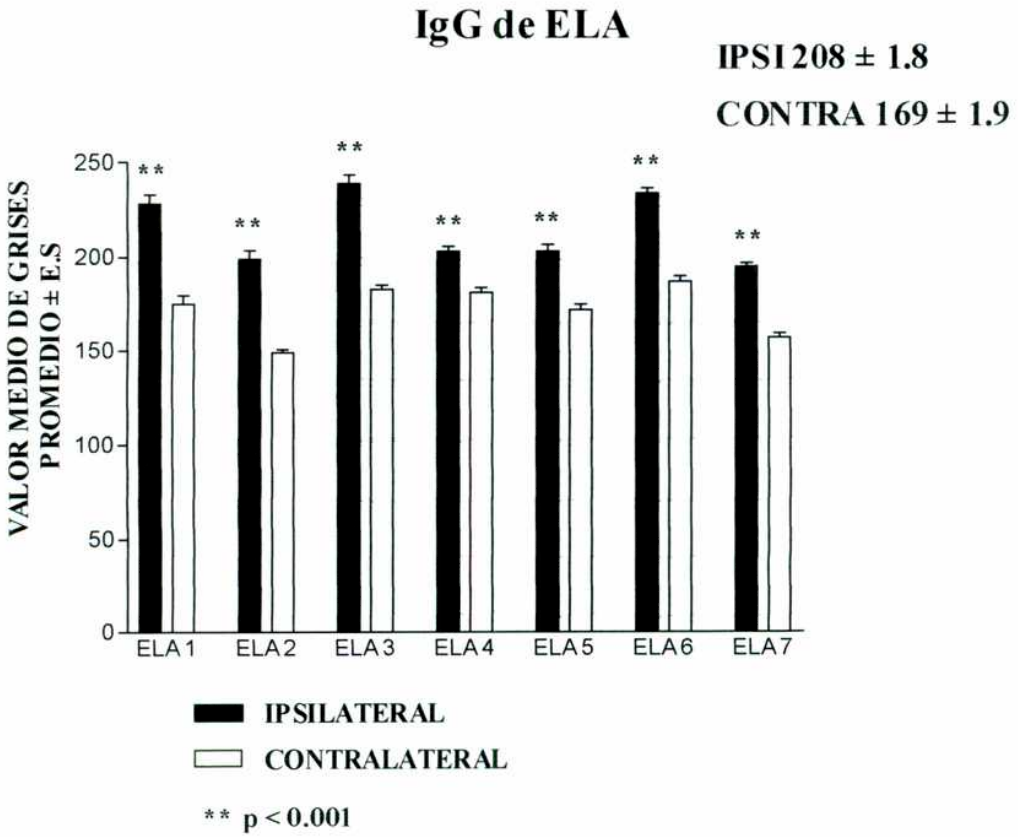
En los animales tratados con IgG de individuos sanos o con enfermedades controles se observa una tinción similar en ambos lados en la mayoría de los casos, siendo algunas veces significativamente mayor del lado ipsilateral (Figura 9). Sin embargo la tinción ipsilateral y contralateral en estos animales fue en todos los casos claramente inferior a la observada en el lado ipisilateral de los animales tratados con IgG de ELA.

En los histogramas de la figura 10 se grafican los valores medios de grises de los somas neuronales de los animales tratados con IgG de pacientes con ELA.

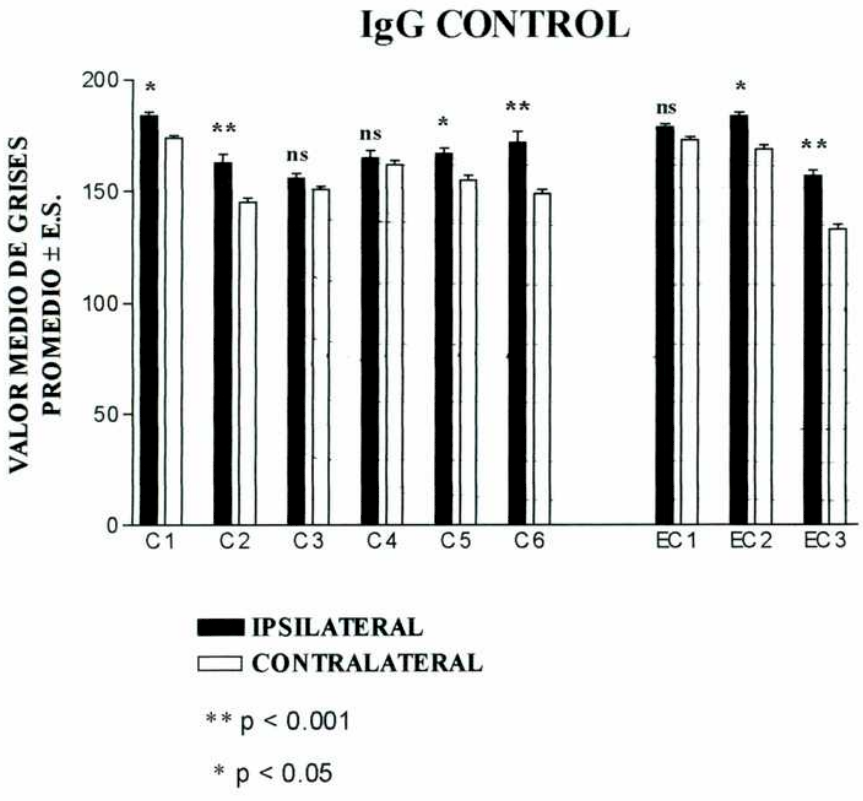
La tinción del lado ipsilateral siempre resultó ser significativamente mayor que la obtenida en el lado contralateral.

Además, la marca es mayor que la obtenida en los animales inyectados con IgG de ELA

Los valores de 208 ±1.8 y 169 ±1.9 corresponden a valores medios de grises con el error estandar lado ipsilateral y contralateral respectivamente,del onjunto de los animales inyectados.



La inmunorreactividad presente en las motoneuronas del núcleo del facial fue cuantificada como se describió en materiales y métodos. La tabla 1 muestra que de acuerdo a las observaciones cualitativas, en todos los animales tratados con IgG de ELA, la tinción del lado ipsilateral fue siempre significativamente mayor que la encontrada en el lado contralateral, y más fuerte que la de ambos lados del grupo control.



Los valores de grises obtenidos de las motoneuronas, en los casos de IgG controles no superaron el valor de 200 de intensidad de tinción. El promedio para todos los animales fue de 175 ± 2.9 para el caso de la IgG control sano, lado ipsilateral y de 166 ± 2.6 para los animales inyectados con IgG de pacientes con otras enfermedades neuromusculares.

Los mismos datos están presentados en la página siguiente en forma de tabla.

Tabla 1

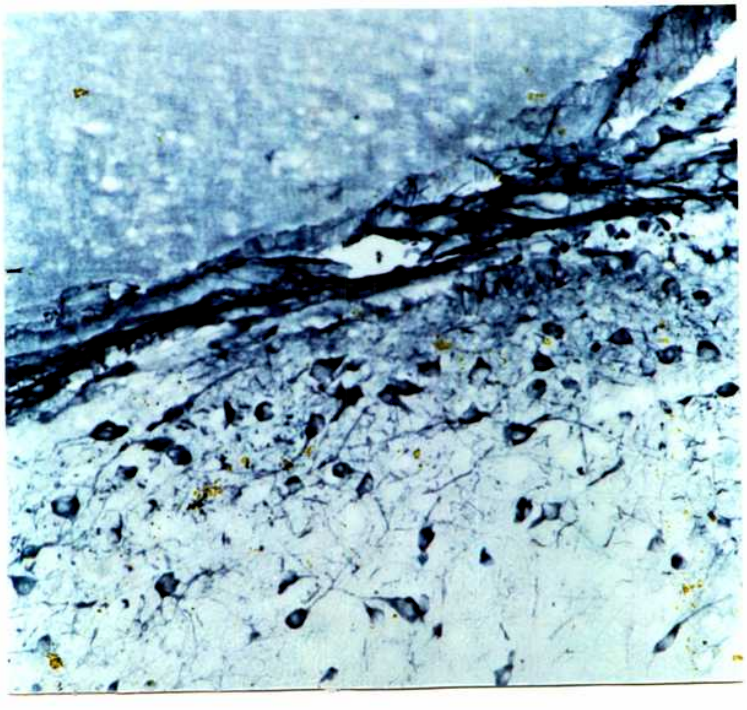
Cuantificación de la intensidad de inmunotinción obtenida en las MN del facial

Los valores medios de grises son promedio ± E.S de marca obtenida por inmunocitoquímica en las MN del núcleo del facial. La escala del analizador de imágenes utilizado varía entre 0 y 256 siendo 0, blanco y 256, negro. ELA 1-7, pacientes con ELA; C1-6, individuos sanos; EC 1-3, individuos con enfermedades neurológicas controles. El número de neuronas evaluadas se encuentra entre paréntesis.

	IPSILATERAL			CONTRALATERAL			
ELA							
ELA 1	228 ± 5.0	*(29)*		175 ± 4.4	*(27)*	* *
ELA 2	199 ± 4.7	*(24)*		149 ± 1.7	*(23)*	* *
ELA 3	239 ± 4.4	*(32)*		183 ± 2.2	*(29)*	* *
ELA 4	203 ± 2.7	*(25)*		181 ± 2.9	*(23)*	* *
ELA 5	203 ± 3.6	*(26)*		172 ± 2.9	*(24)*	* *
ELA 6	234 ± 2.5	*(32)*		187 ± 3.1	*(23)*	* *
ELA 7	195 ± 2.0	*(34)*		157 ± 2.4	*(25)*	* *
	208 ± 1.8			**169 ± 1.9**		* *
CONTROL							
C 1	184 ± 1.5	*(15)*		174 ± 1.1	*(14)*	*
C 2	163 ± 3.7	*(16)*		145 ± 2.2	*(15)*	* *
C 3	156 ± 2.2	*(18)*		151 ± 1.3	*(15)*	*ns*
C 4	165 ± 3.4	*(18)*		162 ± 2.1	*(15)*	*ns*
C 5	167 ± 2.5	*(16)*		155 ± 2.3	*(14)*	*
C 6	172 ± 5.0	*(20)*		149 ± 2.0	*(17)*	* *
	175 ± 2.9			**162 ± 2.2**		
EC							
EC 1	179 ± 1.3	*(14)*		173 ± 1.5	*(14)*	*ns*
EC 2	184 ± 1.5	*(14)*		169 ± 2.0	*(13)*	*
EC 3	157 ± 2.7	*(21)*		133 ± 2.2	*(19)*	* *
	166 ± 2.6			**146 ± 3.0**		* *

El numero de MN en cada núcleo fue determinado por conteo, para ver si la aplicación de IgG alteraba el numero de MN en los mismos. Para ello, ciertos cortes del tallo cerebral de todos los animales tratados, fueron teñidos con la técnica de cresil violeta. El número de motoneuronas en el núcleo ipsi y contralateral de los animales inyectados con IgG humana permanecieron constantes en número (entre 63 y 80 motoneuronas por sección por lado, $p>0.05$) al igual que en los animales inyectados con vehículo.

En la mayoría de los casos, la IgG humana fue también detectada en algunas células de Purkinje, en neuronas de área postrema (figura 13) y en plexos coroideos (regiones fuera de la barrera hematoencefálica).



Aunque hubo variabilidad entre animales, tanto en la intensidad como en el número de células positivas, hubo una diferencia más llamativa entre los animales tratados con IgG de ELA e IgG controles. Las células de Purkinje localizadas en los lóbulos adyacentes al cuarto ventrículo fueron muy inmunoreactivas en el 95 % de los ratones tratados con IgG de ELA. Contrariamente, en los animales controles, sólo el 30 % de las neuronas fueron positivas. Lo mismo ocurrió con el área postrema. La tinción en los animales controles fue difusa y no siempre localizada específicamente en los somas neuronales.

Inmunorreactividad de las MN con terminales motores afectados

En algunos animales, se alteró la transmisión neuromuscular por 2 mecanismos diferentes. En un caso, se aplicó localmente toxina botulínica en los terminales nerviosos del músculo elevador de la oreja. Esto produce en los mismos un bloqueo de la liberación de Ach lo cual produce una parálisis temporaria en el músculo (Angaut-petit y col., 1990; Duchen 1970, 1971; Molgo y col., 1990). Al cuarto día luego de la botulinización, cuando se sabe que la parálisis es máxima, se aplicó la IgG humana utilizando el esquema normal.

Se estudiaron 2 ratones con cada una de las siguientes IgGs:
IgG de ELA: paciente ELA 7
IgG control: persona sana C7
IgG con otra enfermedad neurológica: EC4.
La perfusión se realizó 48 hs. después de la última inyección de IgG y se procedió a la detección de la IgG en los somas de las motoneuronas por métodos de inmunocitoquímica.
Se observó en todos los casos, independientemente de la IgG considerada, una tinción positiva en los vasos sanguíneos, en la piamadre y plexos coroideos. Sin embargo, no se observaron neuronas del núcleo del facial marcadas positivamente en el lado ipsilateral a la inyección. En algunos casos, se vio un marca tenue del lado contralateral a la aplicación de la IgG.

En el caso de los animales en los cuales se desnervó el músculo elevador de la oreja por compresión del nervio, la aplicación de las IgGs se realizó 48 hs. después de la compresión (maniobra?). Se estudiaron 2 ratones con cada una de las siguientes IgGs, utilizando el protocolo normal de aplicación de la misma.
IgG de ELA: paciente ELA 7
IgG control: persona sana C7
IgG control: persona sana C3
IgG con otra enfermedad neurológica: EC4.

Al igual que lo observado en los animales botulinizados, se ven marcados positivamente los vasos sanguíneos, el área postrema, los plexos coroideos y algunas neuronas de Purkinje en el cerebelo. La zona del núcleo del facial del lado ipsilateral al sitio de la inyección, muestra una notable falta de inmunoreactividad en las MN. En algunos casos se observan tramas pero sin somas positivos. En el lado contralateral se observan neuronas positivas en todos los casos, lo cual indica que el lado no denervado pudo captar y transportar retrógradamente la IgG.

Decaimiento en la inmunotinción obtenida en MN de animales perfundidos a distintos tiempos

En esta sección se comparará el efecto de realizar la perfusión del animal tratado con IgG humana, 48 hs. o 1 semana después de la última inyección. Se utilizaron las mismas IgGs en ambos casos.

Para ello se analizó la inmunoreactividad de ratones tratados con distintas IgGs y que fueron estudiados sus músculos por técnicas de electrofisiología.

Para los estudios de electrofisiología, protocolo de corto plazo, los animales inyectados con IgG humana fueron sacrificados una semana después de la última inyección de IgG. Después de la remoción del músculo para estudiar el contenido cuántico del mismo, los animales fueron perfundidos inmediatamente y se removió el tallo cerebral a fin de estudiar la presencia de IgG en los somas de las motoneuronas. Para ello se realizaron cortes en crióstato, los cuales fueron procesados como se describió anteriormente en M&M.

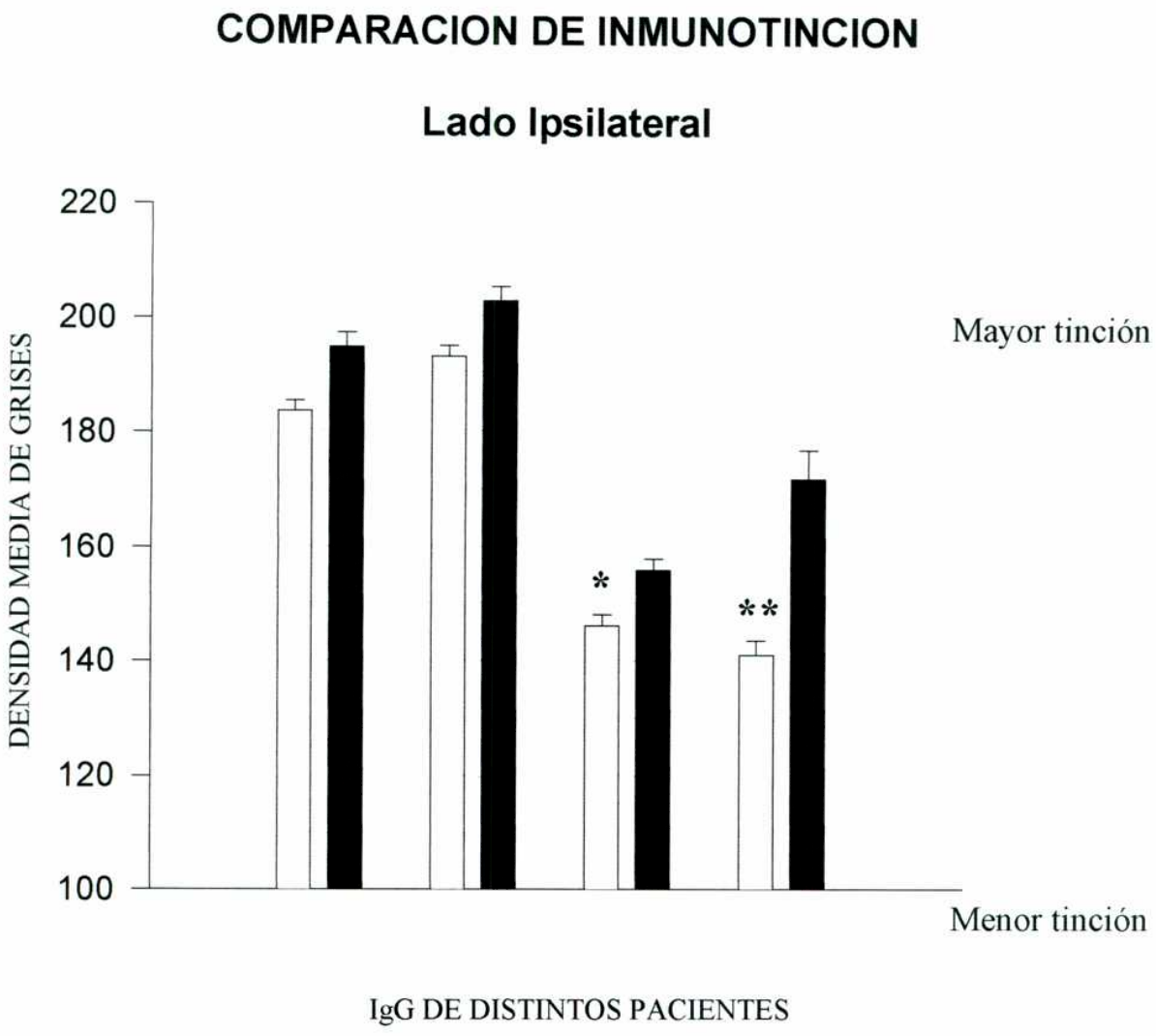
Los inmunotinción de dichos portaobjetos fue digitalizada, cuantificada y comparada con la obtenida en los animales inyectados con las mismas IgGs y perfundidos 48 hs. después de la última inyección. La marca en los somas neuronales pudo ser observada aunque fue de muy baja intensidad. Las MN del lado ipsilateral a la inyección se pudieron individualizar y cuantificar la tinción de las mismas. En el lado contralateral esto ya no fue posible debido a la prácticamente ausencia total de marca. Es más, no se podían distinguir los límites de los somas por lo que no se lograron datos en número suficiente.

Se estudiaron los siguientes casos:
IgG de pacientes con ELA: ELA 5 y 7
IgG de personas sanas: C3 yC6

En la Figura 14, en la siguiente página, se grafica en diagrama de barras la inmunotinción obtenida en las MN del lado ipsilateral a la inyección. Las barras negras y las barras blancas ilustran la inmunoreactividad obtenida en los somas cuando la perfusión es realizada 48 hs. o 1 semana después de la última inyección, respectivamente. Como se observa allí, la marca obtenida, independientemente de la IgG considerada, es menor en los somas luego de un lapso mayor entre la última aplicación y la perfusión. Asimismo, la marca de las MN de los animales tratados con IgG de ELA sigue siendo mayor que la de los animales inyectados con IgG de personas sanas.

En las neuronas de animales tratados con IgG de ELA, la marca disminuye pero no significativamente. Esto no es así en los animales tratados con IgG controles, donde la marca disminuyó significativamente cuando la perfusión fue realizada a un plazo mayor de 48 hs.

Esto parecería indicar que la IgG de ELA permanecería más tiempo en los somas o que debido a su mayor cantidad, tarda más en ser degradada.
En barras blancas, la inmunotinción obtenida en los cortes de los animales perfundidos a las 48 hs. luego de la última inyección.



En barras negras, la inmunotinción obtenida en los cortes de los animales perfundidos a las 48 hs. luego de la última inyección. La marca obtenida es mayor en las barras blancas, que corresponde a los animales inyectados una semana después de la última inyección. En los animales inyectados con IgG control, la marca desparecemás rápidamente. Los dos primeros set de barras corresponden a ELA 7 y ELA 5. Los segundos set de barras corresponden a C3 y C6.

Estudios electrofisiológicos

Experimentos con IgG

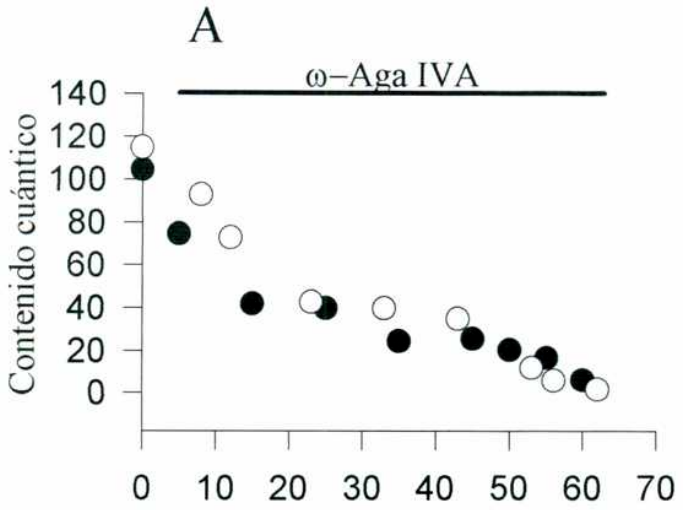
Los experimentos de electrofisiología se realizaron una semana o un mes después de la última inyección de IgG humana en el músculo Levator Auris del ratón.
La viabilidad de la preparación nervio-músculo fue evaluada por la estimulación del nervio en la ausencia de solución de d-tubocurarina. No encontramos evidencia de falla de los nervios motores en la generación y conducción de potenciales de acción hacia los terminales. Esto indica que la aplicación de las IgG de ELA o las controles no produjeron un cese de la transmisión sináptica. Se registraron potenciales evocados en por lo menos 15 fibras luego del agregado de d-tubocurarina (0.6-2 μM) en el baño. El contenido cuántico de 24 músculos tratados con IgG de 8 pacientes distintos (protocolo de corto y largo plazo) fue 65.4 ± 6, muy similar al contenido cuántico observado en 16 músculos tratados con IgG de 5 pacientes controles, el cual fue 74.1 ± 8. Estos valores se encuentran en el mismo rango que los obtenidos en nuestro laboratorio en 14 músculos no tratados (73 ± 4, Katz et al., 1997).

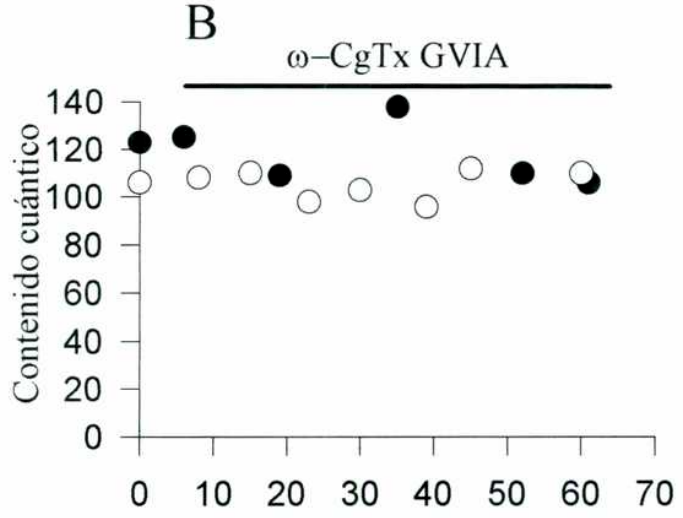
Efecto de distintos bloqueantes de CCVD sobre el contenido cuántico de la liberación evocada.

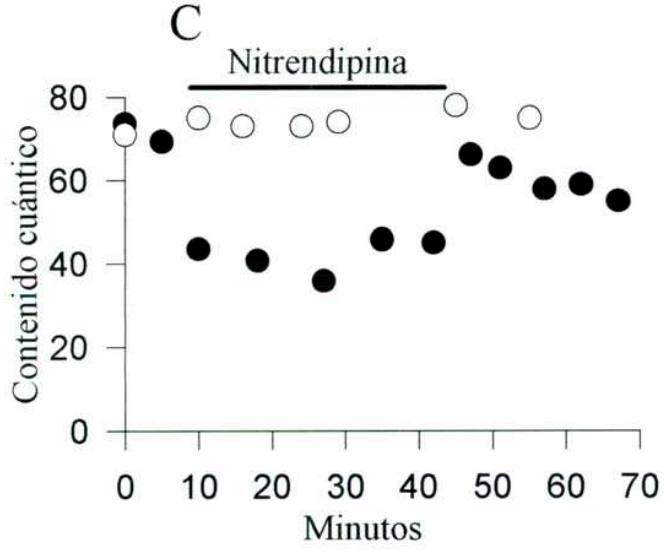
En una serie preliminar de experimentos, la sensibilidad de la liberación de neurotransmisor a diferentes bloqueantes de CCVD fue probada sobre una preparación nervio-músculo que fueron tratados in vivo con distintas IgGs. Así se investigó el efecto de los bloqueantes de CCVD de tipo N (5 μM ω-CgTx GVIA), tipo P (100 nM ω-Aga IVA) y tipo L (1 μM Nitrendipina).
Se utilizaron IgGs purificadas por cromatografía de afinidad provenientes de dos pacientes con ELA esporádica (ELA 12 y 13) y un paciente con ELA de tipo familiar (EC 6).

El efecto de cada uno de los bloqueantes de CCVD sobre el contenido cuántico fue evaluado en terminales motores identificados por métodos ópticos (registro en fibras únicas). Cuando se obtuvo un registro estable de una placa neuromuscular, se aplicó uno de los bloqueantes de CCVD y se dieron 50 estimulos a 0.5 Hz y se registraron 50 EPPs cada 5-10 minutos durante el período de la incubación. En todos los músculos estudiados, ω-Aga IVA produjo una gran inhibición de la amplitud del potencial de placa y del contenido cuántico. La respuesta evocada fue abolida casi por completo luego de 50 minutos de incubación con la toxina como fue reportado anteriormente (Protti y Uchitel, 1993).

En contraste, la ω-CgTx GVIA no tuvo efecto sobre el contenido cuantico de las preparaciones tratadas tanto con la IgG de ELA esporádica o familiar. La sensibilidad a la Nitrendipina no varió en los músculos tratados con IgG del paciente con ELA familiar. Por lo contrario, cuatro fibras musculares estudiadas una semana después del tratamiento con la IgG del paciente ELA 12, mostró un descenso reversible del contenido cuantico luego de la aplicación del antagonista. En una de estas fibras, el decremento del m luego de la aplicación de nitren. Fue de 52 ± 4 % y la inhibición fue reversible luego de lavar al antagonista. Otras dos fibras musculares estudiadas un mes despues del tratamiento, mostraron un decremento de 53 % y 64 % respectivamente. En el caso de los músculos tratados con IgG de ELA 13, el descenso en el contenido cuántico varió entre 38 y 48 % en cuatro fibras musculares diferentes.


A
ω−Aga IVA
Contenido cuántico
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70


B
ω−CgTx GVIA
Contenido cuántico
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70


C
Nitrendipina
Contenido cuántico
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Minutos

Cambios en la sensibilidad al bloqueante de CCVD de tipo L

En una nueva serie de experimentos con un mayor número de IgGs de pacientes, investigamos el efecto de la nitrendipina en los músculos tratados con dichas IgGs. En estos experimentos la IgG fue purificada por cromatografía de intercambio iónico.

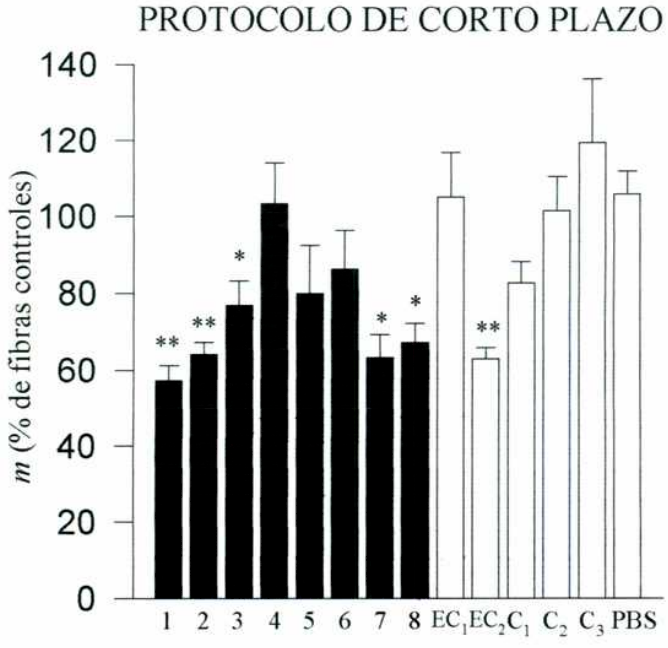
Los EPPs fueron registrados luego de 45 minutos de incubación con Nitrendipina 1 μM. El contenido cuántico de por lo menos 15 fibras musculares diferentes fue comparado al resultado obtenido en una población similar de fibras musculares del mismo músculo antes de la incubación.

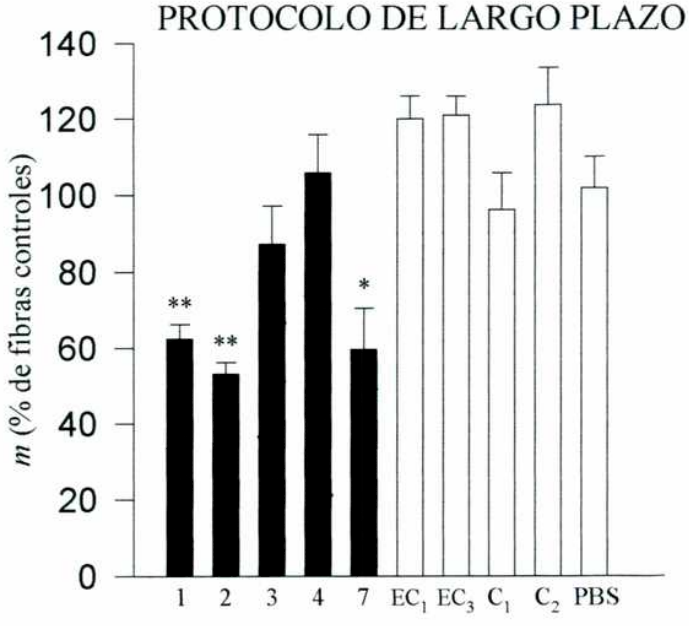
Protocolo de corto plazo

En este grupo de experimentos, los ratones fueron inyectados con IgG de 8 pacientes con ELA (ELA 5, 7, 8-13) y los músculos fueron removidos una semana luego de la última inyección.

Registramos los potenciales evocados de cuatro animales inyectados con IgG del paciente ELA 7, y en tres casos se observó una disminución significativa del contenido cuántico luego de la incubación con Nitrendipina. El porcentaje de inhibición promedio con esta IgG fue de 43 %, el cual representa una disminución significativa con respecto a las fibras controles (con un $p<0.001$). Además en uno de los ratones tratados con esta IgG, se observó un aumento de la latencia de la respuesta evocada luego de la aplicación de la Nitrendipina ($p<0.0001$) y la disminución del contenido cuántico fue 37 %.

En los músculos tratados con IgG de pacientes ELA 5, 8, 12 y 13, el contenido cuántico disminuyó significativamente entre 23 y 37 % luego de la incubación con el antagonista.


PROTOCOLO DE CORTO PLAZO
m (% de fibras controles)
140
120
100
80
60
40
20
0
**
**
*
*
*
**
1 2 3 4 5 6 7 8 EC1 EC2 C1 C2 C3 PBS


PROTOCOLO DE LARGO PLAZO
m (% de fibras controles)
140
120
100
80
60
40
20
0
**
**
*
1 2 3 4 7 EC1 EC3 C1 C2 PBS

En resumen, los músculos de los animales tratados con 5 de las 8 IgG de pacientes con ELA mostraron una disminución significativa del contenido cuántico de la liberación evocada luego de la aplicación de la Nitrendipina.

En todos los músculos de los animales tratados con IgG control y en los animales tratados con vehículo (PBS), no se observaron cambios significativos en el contenido cuántico luego de la incubación con la Nitrendipina. Tanto la amplitud como la latencia de los potenciales evocados no variaron luego de la aplicación del antagonista. Similarmente, los músculos tratados con la IgG del paciente EC 4 no mostraron alteración alguna en la transmisión neuromuscular per se o en la sensibilidad a la Nitrendipina. En contraste, los músculos tratados con la IgG del paciente EC5, con el síndrome de Eaton-Lambert, mostraron un contenido cuántico reducido, el cual fue inhibido significativamente luego de la incubación con la Nitrendipina.

En la figura X se muestran EPPs representativos de músculos tratados con IgG de pacientes con ELA y de individuos sanos antes y después del agregado del bloqueante.

Protocolo de largo plazo

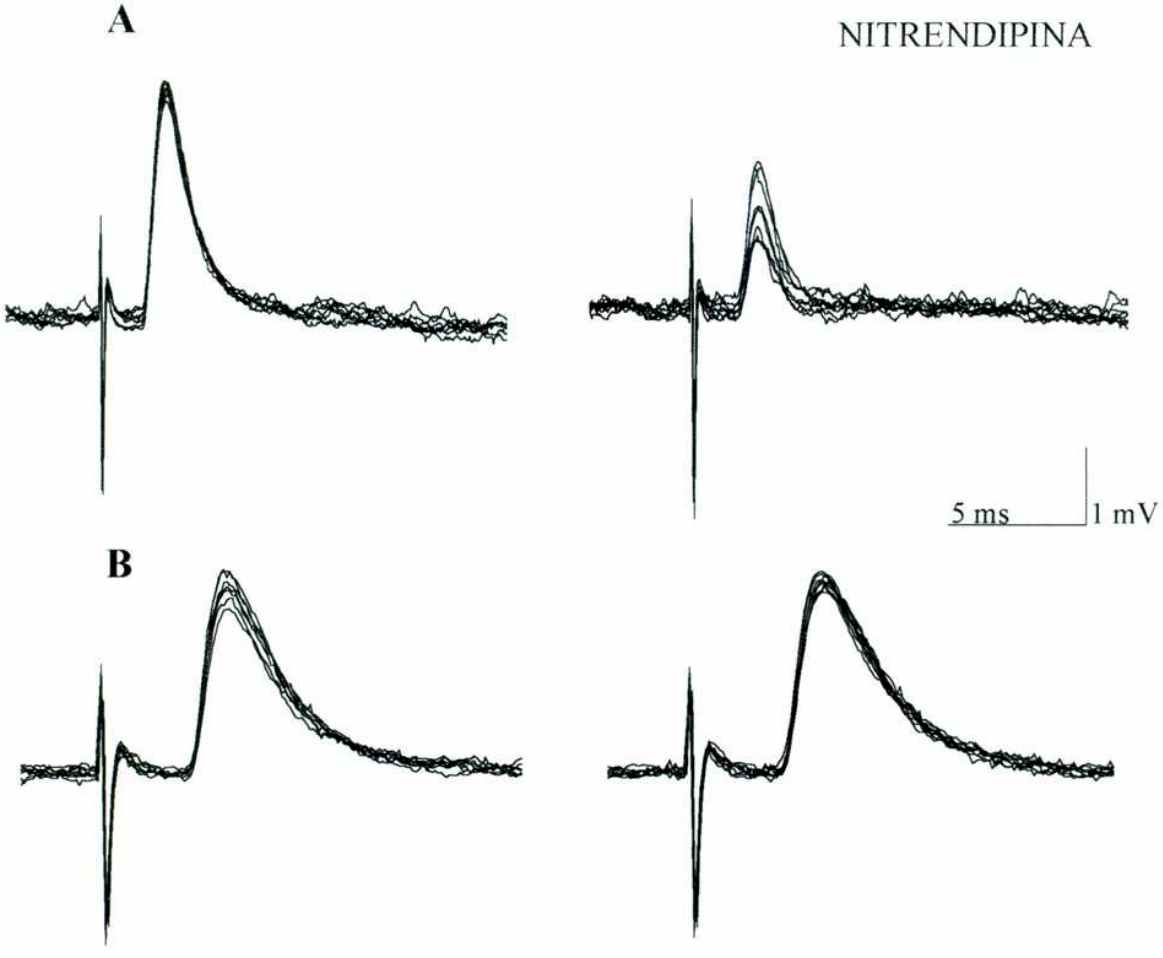
En este grupo de experimentos, la sensibilidad a la Nitrendipina fue investigada en los ratones inyectados con IgG de algunos de los pacientes que participaron en los estudios de corto plazo (ELA 5, 7, 8, 9, 12) y los músculos fueron removidos un mes después de la última inyección.
En los músculos tratados con IgG de los pacientes ELA 5, 7 y 12, observamos una disminución entre 38 y 47 % en el contenido cuántico luego de la aplicación de la Nitrendipina, similar al efecto observado en el protocolo de corto término. En los músculos tratados con IgG del paciente ELA 5, el contenido cuántico diminuyó 47 % luego del agregado de la Nitrendipina, efecto marcadamente mayor que en los estudios de corto plazo (Fig.X).

En los animales tratados con IgG de los pacientes ELA 8 y 9, no se observó ningún efecto de la Nitrendipina sobre el contenido cuántico.

Nuevamente los resultados muestran que el tratamiento con algunas de las IgG de ELA produce un cambio en los terminales nerviosos y que el agregado de la toxina Nitrendipina produce una inhibición del contenido cuántico.

Coincidentemente con lo obtenido en el estudio de corto plazo, en los animales tratados con las IgG controles y en los animales inyectados con vehículo no se observaron cambios significativos en el contenido cuántico, la amplitud o la latencia de la respuesta evocada luego de la aplicación de la Nitrendipina.

Potenciales de placa representativos de los animales tratados
con IgG de ELA e IgG control



Experimentos con suero

Se estudiaron los efectos a corto plazo de la aplicación de suero de pacientes en la transmisión neuromuscular del diafragma de ratón. (confuso?). Para ello, se inyectó intraperitonealmente suero de un paciente con ELA forma esporádica (ELA 14) y un paciente con ELA forma familiar (EC 6). También se realizaron experimentos agudos con IgG purificada por Proteína G.

En ninguno de los ratones inyectados para el presente estudio se observaron evidencias de problemas de las motoneuronas para generar y/o transmitir potenciales de acción hasta las terminales neuromusculares. En todas las fibras se pudo observar la presencia de MEPPs y se pudo generar EPPs mediante estimulación eléctrica supraumbral del nervio frénico. Esto nos permite afirmar que ninguno de los sueros utilizados y siguiendo el protocolo elegido causó cambios fisiológicos importantes sobre las placas neuromusculares ni causó la degeneración o muerte de las motoneuronas que inervan el músculo estudiado.

Frecuencia y amplitud de MEPPs:

El suero del paciente con sELA provocó un aumento muy significativo en la frequencia de MEPPs de 49.14 ± 4 / min ($n = 29$, $p<0.01$) respecto al valor medio de 34.4 ± 2.3/ min ($n = 36$) encontrado en los animales inyectados con el suero del fELA.

Este aumento está de acuerdo a lo observado en otros trabajos.

Contenido cuántico y EPPs

Para determinar el número medio de cuantos o paquetes de acetilcolina liberados por cada impulso nervioso, se expuso el diafragma a una solución de Ringer con alta concentración de Magnesio. De esta manera se bloquea parcialmente al canal de calcio que participa de la liberación del neurotransmisor y se obtienen fallas en la transmisión.

Esto significa que cuando se da un estímulo en el nervio pero siempre se liberan vesículas y por lo tanto en algunos casos, no se registran EPPs. Contando el número de fallas y de no fallas se puede calcular el contenido cuántico.
Se observó una disminución significativa del contenido cuántico para los ratones inyectados con el suero de s ELA de 0.71 ± 0.03 (n = 22) frente al valor medio control 1.20 ± 0.08 (n = 23, $p<0.01$).

Experimentos de Incubación de IgG en forma aguda

Se expusieron porciones de diafragma en una solución de IgG 4 mg/ml durante 4 hs. y luego se registró la frecuencia de MEPPs.

Se realizaron distintos experimentos por duplicado:

ELA familiar	frecuencia de MEPPs control (sin IgG)	17.11 ± 1.4/ min.
	frecuencia de MEPPs con IgG	13.5 ± 1.3/ min.

Hay una disminución no significativa en la frecuencia de MEPPs.

ELA esporádica	frecuencia de MEPPs control (sin IgG)	18.5 ± 1.9/ min.
	frecuencia de MEPPs con IgG	25.9 ± 3/ min.

Hay un aumento que no es significativo pero que muestra una tendencia ($p<0.07$).

DISCUSION

DISCUSION

Es ELA una enfermedad autoinmune ?

Las enfermedades autoinmunes presentan como característica la presencia de autoanticuerpos, de linfocitos T sensibilizados o de ambos contra distintas macromoléculas del organismo, que individuos normales reconocen como propias.
El reconocimiento de lo propio es un principio central en el funcionamiento del sistema inmune que no se contrapone al desarrollo de enfermedades autoinmunes, sino que permite explicar su aparición a través de disturbios en el equilibrio inmune, el cual se ajusta constantemente en respuesta a señales internas y externas.
Debe diferenciarse claramente respuesta autoinmune de enfermedad autoinmune. La respuesta autoinmune es la demostración de autoanticuerpos a antígenos propios o la reactividad de linfocitos sensibilizados contra un antígeno propio; esta respuesta puede estar o no asociada con una enfermedad autoinmune. En medicina clínica hay numerosos ejemplos de producción de autoanticuerpos sin que estén relacionados con una enfermedad autoinmune.
En las enfermedades autoinmunes, además de autoanticuerpos o linfocitos T sensibilizados se observa lesión tisular producida como consecuencia de la presencia de estos elementos.

Etiología

Los desordenes autoinmunes han sido ampliamente estudiados en seres humanos y en modelos animales. Estas enfermedades son multifactoriales y en cada una de ellas puede estar comprendido mas de un mecanismo de inducción. Varios factores contribuyen a la eclosión de las enfermedades autoinmunes: genéticos, hormonales, virales, edad, nutrición, como también, alteraciones de la regulación inmune, psiconeurológicos o ambientales.

Patogenia

Los mecanismos inmunológicos relacionados con la patogenia de las enfermedades autoinmunes son mediados por anticuerpos, por células T o por ambos. La interacción antígeno-anticuerpo puede producir diferentes tipos de lesión tisular según la molécula de anticuerpo que participa en el proceso. Los anticuerpos IgG e IgM se combinan con el antígeno y forman complejos inmunes que fijan complemento y esto produce lesiones y daño celular. En otras ocasiones el daño tisular es producido por anticuerpos que median la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.
Sin embargo existen otras situaciones donde la combinación del antígeno (ligado a la célula) y el anticuerpo no produce daño de la membrana celular sino "estimulación "o modificación de la célula. Por ejemplo en la miastenia gravis los anticuerpos contra receptores de acetilcolina bloquean la transmisión neuromuscular normal.

En los estudios de **captación de inmunoglobulinas**, hemos investigado la presencia de inmunorreactividad a la IgG humana en los somas de las motoneuronas. Dichas neuronas tienen sus terminales en contacto con las fibras musculares por fuera de la barrera hematoencefálica. Los terminales nerviosos de las mismas han sido expuestos a la IgG obtenida del suero de pacientes con ELA, personas sanas y pacientes con otras enfermedades neuromusculares distintas de ELA (EC).

La inmunorreactividad fue mayormente localizada en las MN del núcleo del facial, las cuales inervan el músculo donde se aplicaron las IgG. La captación de IgG por los terminales nerviosos y el transporte retrógrado de la IgG hacia el soma de la MN puede explicar la presencia de la misma en los ratones tratados. La distribución asimétrica de la IgG intraneuronal, con una mayor concentración en las MN cuyos axones proyectan hacia el músculo inyectado, provee una fuerte evidencia de la captación en los terminales y transporte axonal retrógrado hacia los somas. Independientemente de la IgG considerada, la inmunotinción tuvo una distribución puntacta en el citoplasma y dendritas proximales de todas las MN positivas. Estudios previos de microscopía electrónica ya habían demostrado la presencia de IgG endógenas de ratón en lisosomas de las motoneuronas.

Gracias a la cuantificación de la inmunotinción se pudo observar que la cantidad de IgG presente en los cuerpos neuronales es diferente para las IgG de pacientes con ELA, con respecto a la de individuos sanos o pacientes EC. Esto podría deberse a uno o varios mecanismos:

- una mayor captación de IgG de ELA
- un transporte retrógrado diferencial
- una mayor acumulación en el soma
- una menor eliminación de las IgG de pacientes con ELA.

Esto no se daría en los animales tratados con las IgG de pacientes con enfermedades controles o de personas sanas. Sin embargo, dichas IgG fueron también captadas por los terminales nerviosos y transportadas retrógradamente y acumuladas en el soma neuronal, aunque en menor medida.

Una posible explicación para la mayor presencia de IgG-ELA en los somas sería que las mismas podrían ser endocitadas en mayor medida que las IgG controles a través de un mayor reciclado de vesículas sinápticas. Este mayor reciclado podría deberse a una interacción de las IgG-ELA con canales de calcio de la presinapsis.
La via de entrada de las IgGs podría darse en el momento posterior a la liberación de neurotransmisor, cuando la membrana del terminal es reciclada. De ser así, la neurotransmisión sería requisito necesario para permitir la entrada de IgG a los terminales. Es por ello, que la falta de marca en los animales que se alteró el contacto nervio-músculo por desnervación o por botulinización, apoya la idea de que la entrada de IgG podría darse en general de manera inespecífica. Esto explicaría la presencia de distintas proteínas séricas en los somas pero no explica la presencia diferencial de la IgG de ELA.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que el modelo utilizado fue apropiado para determinar diferencias en la acumulación de IgG en el cuerpo neuronal

presumiblemente debido a diferencias en la captación de IgG por terminales nerviosos de ratón.

No se conoce hasta el momento cual de los mecanismos anteriormente mencionados serían los responsables de la mayor inmunotinción observada y su posible rol en la etiopatogenia de la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

Discusión de los resultados electrofisiológicos

Estudios anteriores del laboratorio han demostrado que la aplicación repetitiva de IgG de ELA in vivo sobre el músculo levator auris induce luego de 8-12 semanas una disfunción en la placa neuromuscular y en algunos casos denervación de terminales (Uchitel y col., 1992).

En el presente trabajo, utilizando un protocolo más corto que el anteriormente mencionado, se han investigado más tempranamente los cambios inducidos por las IgG de ELA. No se han encontrado diferencias en el contenido cuántico de la liberación de neurotransmisor en los músculos tratados con las IgG de pacientes con ELA o de sujetos controles. Sin embargo, hemos encontrado que con 5 de las 8 IgG de ELA estudiadas, se indujeron cambios en el perfil farmacológico de la liberación de neurotransmisor de la placa neuromuscular.

La novedad de estos estudios es que en los terminales motores de los músculos tratados, el CCVD de tipo L (pero no el N) se suma (o participa) al proceso de liberación del neurotransmisor, junto al canal P/Q normalmente presente, como una consecuencia específica de la aplicación de la IgG de pacientes con ELA esporádica.

Este efecto no es observado cuando se aplica IgG de personas sanas o de pacientes con otras enfermedades neurológicas como la atrofia muscular espinal o ELA de tipo familiar. En nuestros estudios, los músculos tratados con IgG del paciente con síndrome de Eaton-Lambert, mostraron sensibilidad a la Nitrendipina, resultado que concuerda con estudios

anteriores (Smith y col., 1995). Se sabe que en el suero de estos pacientes existen (están presentes) anticuerpos contra CCVD de tipo P/Q, los cuales producen una disrupción de los sitios activos de la placa neuromuscular (Fukunaga y col., 1983). Por lo tanto, es posible que la alteración producida por estos anticuerpos es también capaz de inducir un aumento en la sensibilidad a la Nitrendipina similar a la encontrada en placas neuromusculares en regeneración (Katz y col., 1996; Santa Fé y Uchitel 1997).

Corto plazo vs largo plazo

En el caso de los animales tratados con IgG y estudiados los músculos a un plazo mayor, en un caso el efecto resulta mayor que en el corto plazo (ELA 5). Por el momento no podemos saber si el hecho de estudiar el músculo a tiempos más lejanos hace más evidentes los efectos de la aplicación de la IgG.

Recientemente se ha cuestionado la pureza de las muestras de IgG obtenidas por cromatografía de intercambio iónico y se postuló que las alteraciones inducidas por las IgGs de ELA podrían ser el resultado de una contaminación con proteasas (Nyormoi 1996). Esto parece ser muy improbable en nuestros estudios, ya que efectos similares fueron observados en músculos tratados con IgG purificadas por cromatografía de afinidad o de intercambio iónico.

La entrada de calcio a través de canales voltaje dependientes (CCVD) dispara la liberación de neurotransmisor desde los terminales nerviosos (Augustine et al., 1987). En la placa neuromuscular de mamífero adulto, la liberación de neurotransmisor está disparada por la entrada de calcio a través de canales del tipo P/Q (Uchitel et al., 1992; Protti y Uchitel, 1993; Protti et al., 1996) mientras que el canal de tipo L no participa en dicha liberación cita (Atchinson, 1989; Katz et al., 1996).

El mecanismo de aparición de sensibilidad al antagonista del canal L no es conocido. Es posible que las IgG de ELA activen canales ya presentes en el terminal y sean reclutados para participar en el proceso de liberación del neurotransmisor.

Sin embargo, como dichas IgG producen alteraciones en la morfología y fisiología de la placa (Uchitel et al., 1988; Appel et al., 1991; Uchitel et al., 1992) podría ser que induzcan cambios regenerativos. Durante la regeneración y recuperación funcional los canales de calcio de tipo L participan en la conducción de la señal y en la liberación de transmisor (Katz et al., 1996; Santa Fé y Uchitel 1997. Asimismo, los canales de tipo L parecen estar involucrados en la transducción de señales desde el terminal nervioso hacia el soma, como ha sido demostrado en neuronas de hipocampo (Deisseroth et al., 1998).

Una característica muy clara en pacientes con ELA es la evidencia electrofisiológica de denervación y reinervación en músculos de dos o más segmentos (Schwartz y Swash, 1995). Maselli y colaboradores han encontrado en biopsias de músculos de pacientes con esta enfermedad un patrón distintivo de liberación de neurotransmisor en los terminales de dichos pacientes (Maselli et al., 1993). Ellos también encontraron placas inmaduras que sugieren que son placas en proceso de reinervación. Sería interesante determinar si los músculos de los pacientes con ELA presentan sensibilidad a las dihidropiridinas.

Las formas familiar y esporádica de la enfermedad son clínicamente y patológicamente indistinguibles. Aunque comparten los mismos síntomas, los mecanismos de la muerte celular podrían ser diferentes. Por lo tanto resulta importante comparar los resultados de los efectos de las IgG de ambos pacientes.

Las IgG del paciente con la forma familiar de la enfermedad así como también las del paciente con atrofia muscular espinal, no produjeron cambios en la sensibilidad farmacológica a la dihidropiridina, sugiriendo que en estos casos, la muerte de la motoneurona en sí misma, no generó los anticuerpos capaces de inducir la disfunción en los terminales motores.

En un estudio reciente en el cual participaron 30 pacientes de ELA, se ha demostrado que solo la mitad de ellos tienen factores séricos que afectaron la transmisión neuromuscular (O'Shaughnessy et al., 1998). La falta de efecto en algunos pacientes pareciera indicar que el o los factores séricos podrían ser solo una de las diferentes causas de este desorden. De

hecho, ya existen formas múltiples de la enfermedad dado que la forma esporádica y familiar de ELA indican múltiples causas de la enfermedad.

La ELA podría no ser una enfermedad en sí misma, sino un grupo heterogéneo de enfermedades que comparten los síntomas pero difieren en su patogénesis. Alternativamente, es posible que los anticuerpos patogénicos de estos pacientes no se expresen de la misma manera a lo largo de diferentes fases de la enfermedad, dando diferentes resultados (IgG negativas o positivas) en nuestra manera de evaluación.
Finalmente, la presencia de anticuerpos contra el terminal motor en el suero de pacientes podría ser la causa o la consecuencia de la disfunción de los terminales motores. Esto podría llevar a la expresión de nuevos canales de calcio que podrían funcionar como autoantígenos con la subsecuente producción de anticuerpos patogénicos.
La remodelación sináptica de la placa NM ocurre bajo condiciones normales. Y en mayor grado en condiciones experimentales o patológicas. De hecho, los axones motores son capaces de formar "sprouts"o brotes colaterales o terminales en respuesta a la desnervación parcial o luego del bloqueo de la actividad neuromuscular pre o postsináptico (citas del Angaut petit 1990). En los pacientes con ELA, se sabe con certeza que la debilidad muscular que manifiestan los pacientes como primer síntoma resulta de la muerte de las MN. Pero lo que se desconoce hasta el momento es si el terminal motor degenera y en consecuencia lo hace también el soma o si ocurre al revés.
En modelos animales, la desnervación producida por compresión del nervio que llega a un músculo, produce una alteración en los CCVD, tal que no sólo los canales de tipo P/Q sino también los de tipo L son responsables de la liberación de neurotransmisor.

Con respecto al estudio desarrollado en el tema 2, los resultados obtenidos muestran que con un protocolo corto y mediante la aplicación se suero hubo una transferencia pasiva de disfunción en la transmisión neuromuscular. Esto está de acuerdo con resultados previos en los cuales también se observa una alteración de la transmisión neuromuscular que no parece depender del protocolo utilizado y da resultados similares ya sea que se trate de suero o de IgG pura de pacientes de ELA. Aunque queda por determinar la naturaleza de

la interacción entre factor sérico y placa, no queda duda que la IgG es una buena candidata para ser el factor nocivo ya que el efecto se obtiene luego de la incubación con suero y perdura al purificar de dicho suero la IgG.

Silvia Trabucchi

Osvaldo D. Uchitel

BIBLIOGRAFIA

Adams, M.E. and Swanson G. Neurotoxins, Trends in Neurosciences, Supplement April 1994.

Agustine, G.J., Charlton, M.P., Smith S.J. (1987). Calcium action in synaptic transmitter release. Annual Review of Neuroscience 10, 633-693.

Aidley, D.J. (1989). The Physiology of Excitable Cells. Cambridge University Press. Great Britain.

Alexianu ME, Ho BK, Mohamed AH, La BELA V, Smith RG, Appel SH. The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 1994 Dec;36(6):846-858.

Alexianu ME, Mohamed AH, Smith RG, Colom LV, Appel SH. Apoptotic cell death of a hybrid motoneuron cell line induced by immunoglobulins from patients with amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem 1994 Dec;63(6):2365-2368.

Angaut-Petit, D., Molgo, J. , Connnold, A. L. , Faille, L. (1987) The levator auris longus muscle of the mouse: a convenient preparation for studies of short- and long term presynaptic effects of drugs and toxins Neurosci Lett. 82, 83-88

Angaut-Petit, D., Molgó, J., Comella, J. X. & Faille, L., (1990). Terminal sprouting in mouse neuromuscular junctions poisoned with botulinum type A toxin: morphological and electrophysiological features. Neuroscience. 37, 799-808.

Appel S.H., Stefani E. Amyotrophics lateral sclerosis; etiology and pathogenesis. In Appel S.H.,ed Current Neurology ,10:.St. Louis :Mosby-Year Book :1991; 287-310.

Appel, S.H., V Stockton-Appel, S. Stewart, R. Kerman (1986) Amyotrophic lateral sclerosis: associated clinical disorders and inmunologic evaluations. Arch. Neurol., 43: 234-238.

Argentieri, T.M.; Aiken, S.P.; Laxminarayan S. & McArdle J.J (1992). Characteristics of synaptic transmission in reinnervating rat skeletal muscle. Pflugers Arch 421: 256-261

Artalejo CR, Adams ME, Fox AP. Three types of Ca2+ channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. Nature 1994 Jan 6;367(6458):72-6

Artalejo, C.R.; Rossie, S.; Perlman, R.L. and Fox, A.P. Voltage-dependent phosphorylation may recruit Ca2' current facilitation in chromaffin cells. Nature (1992) 358: 63-66.

Artalejo, C.R.; Rossie, S.; Perlman, R.L. and Fox, A.P. Voltage-dependent phosphorylation may recruit Ca2' current facilitation in chromaffin cells. Nature (1992) 358: 63-66.

Atchinson, W. D., & O'Learly, S.M., (1987). BAY K 8644 increases release of acetilcholine at the murine neuromuscular junction. Brain Research, 419, 315-319.

Atchinson, W. D., (1989). Dihydropyridine-sensitive and insensitive components of acetylcholine release from rat motor nerve terminals. The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics 251, 672-678.

Baraban, J.M.; Snyder, S.H. and Alger, B.E. Protein kinase C regulates ionic conductance in hippocampal pyramidal neurons: Electrophysiological effects of phorbol esters Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1985) 82: 2538-2542.

Bean BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. Annu Rev Physiol 1989;51:367-84

Bertolino, M and Llinas R. (1992) The central rol of voltage activated and receptor operated calcium channels in neuronal cells. Annu Rev Pharmacol. Toxicol 32,399-421

Betz, W.J., Fei Mao, G. Bewick (1992) Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. J. of Neuroscience, 12(2): 363-375.

Bjornskov EK, Norris FH Jr, Mower-Kuby J. Quantitative axon terminal and end-plate morphology in amyotrophic lateral sclerosis. Arch Neurol 1984 May;41(5):527-30.

Borges, L.F. and N.A. Busis (1985) Intraneuronal accumulation of myeloma proteins. Arch. Neurol., 42: 690-694.

Bowersox, SS., Miljanich, G.P., Sugiura, Y., Li, C., Nadasdi, L., Hoffman, B.B., Ramachandran, J. & Ko, C. (1995). Differential blockade of voltage-sensitive calcium channels at the mouse neuromuscular junction by novel ω-conopeptides and ω-Agatoxin-IVA. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 273, 248-256.

Bowling AC, Schulz JB, Brown RH Jr, Beal MF.Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem 1993 Dec;61(6):2322-2325.

Brehm P. Resolving the structural basis for developmental changes in muscle ACh receptor function: it takes nerve. *Trends Neurosci* 1989 May;12(5):174-7

Brooks BR. The role of axonal transport in neurodegenerative disease spread: a meta-analysis of experimental and clinical poliomyelitis cmpares with amyotrophic lateral sclerosis. Can J Neurol Sci 1991 Aug;18(3 Suppl):435-438.

Brown, M.C. Jnasen, J.K.S. and Van Essen, D. (1976) Polyneuronal innervation of skeletal muscle in newborn rats and its elimination during maturation . J Physiol 261 387-422

Castagna, M.; Takai, Y.; Kaibushi, K.; Kimihiko, S.; Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumour promoting phorbol esters. J. Biol. Chem. (1982) 257: 7847-7851.

Catterall WA. Structure and function of voltage-gated ion channels. Annu Rev Biochem 1995;64:493-531

Ceccarelli, B.; Fesce, R.; Grohovaz, F. and Haimann, C. The effect of Potassium on exocitosis of transmitter at the frog neuromuscular junction. J. Physiol. (Lond.) (1988) 401: 163-183.

Côte F, Collard JF, Julien JP. Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Cell 1993 Apr 9;73(1):35-46.

Couteaux R. Remarks on the organization of axon terminals in relation to secretory processes at synapses. Adv Cytopharmacol 1974;2:369-79.

Couteaux, R. and Pecot-Déchavassine, M. C. R. Vesicules synaptiques et poches au niveau des zones actives de la jonction neuromusculaire. Acad. Sci. (Paris) (1970) 271: 2346-2349.

Cull-Candy, S.G., Miledi R., Trautmann, A. & Uchitel, O.D. (1980) On the release of transmitter at normal myasthenia gravis and myasthenic syndrome affected human endplates. J.Physiol., 299:621-638.

Day, N.C., Wood, S.J., Ince, P.G., Volsen, S.G., Smith, W., Slater, C.R. & Shaw, P.J. (1997). Differential localisation of voltage-dependent calcium channel α_1 subunits at the human and rat neuromuscular junction. Journal of Neuroscience 17, 6226-6235.

De Riemer, S.; Strong, J.; Albert, K.; Greengard, P. and Kaczmarek, L. Enhancement of calcium currents in Aplysia neurones by protein kinase C. Nature (1985) 313: 313-316.

De Robertis E. Ultrastructure and cytochemistry of the synaptic region. The macromolecular components involved in nerve transmission are being studied. Science 1967 May 19;156(777):907-14.

Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW. Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. Nature 1998;392:198-202.

Del Castillo, J., Katz, B. (1954a). Changes in end-plate activity produced by presynaptic polarization. Journal of Physiology 124, 586-604.

Del Castillo, J., Katz, B. (1954b). Quantal components of the end-plate potential. Journal of Physiology 124, 560-573.

Delbono O., Garcia J., Appel S. & Stefani E.(1991). IgG from ALS affects tubular calcium channels of skeletal muscle.American Journal of Physiology,260 (Cell Physiol. 29), C1347-1351.

Delbono, O., J. Garcia, S.H. Appel and E. Stefani (1991) Calcium current and charge movement of mammalian muscle: action of amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins. J. Physiol., 444: 723-742.

Delisle MB, Carpenter S. Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci 1984 Feb;63(2):241-50

Dennis, M.J., Ziskind-conhaim, L. & Harris A.J. (1981). Development of neuromuscular junctions in rat embryos. Developmental Biology 81, 266-279.

Dolphin, A.C. Facilitation of $Ca2^{+}$ current in excitable cells. TINS (1996) 19: 35-43.

Duarte F, Binet S, Lacomblez L, Bouche P, Preud'homme JL, Meininger V. Quantitative analysis of monoclonal immunoglobulins in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci 1991 Jul;104(1):88-91

Dumas M, Schwab ME, Baumann R, Thoenen H. Retrograde transport of tetanus toxin through a chain of two neurons. Brain Res 1979 Apr 13;165(2):354-7

Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ. Exocytotic Ca2+ channels in mammalian central neurons. Trends Neurosci 1995 Feb;18(2):89-98

El Escorial World Federation of Neurologia criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. World Federation of Neurology Research group on Neuromuscular Diseases. J Neurol Sci 1994;124 (Suppl):96-107.

Ellinor, P.T.; Zhang, J.F.; Randall, A.D.; Zhou, M.; Schwarz, T.L.; et al. Functional expression of a rapidly inactivating neuronal calcium channel. Nature (1993) 363: 455-458.

Engelhardt J.,Appel S.,Killian J.Motoneuron destruction in guinea pigs immunized with bovine spinal cord gray matter experimental autoinmune gray disease. J. Neuroimmunol.1990;96:333-352.

Engelhardt J.L. Appel SH , Killian J.M.(1989) Experimental autoimmune motoneuron disease. Ann Neurol 26: 368-376

Engelhart J., Joo F.An immune-mediated guinea pig model for lower motor neuron disease.J. Neuroimmunol.1986;12: 279-290.

Fabian R.H. Uptake of plasma IgG by CNS motoneurons: comparison of antineuronal and normal IgG. Neurology.1988;38:1775-1780.

Fabian, R.H. and G. Petroff (1987) Intraneuronal IgG in the CNS: uptake by retrograde axonal transport. Neurology, 37: 1780-1784.

Fabian, R.H. and T. Ritchie (1986) Intraneuronal IgG in the CNS. J. Neurol. Sci., 73: 257-267.

Farley, J. and Auerbach, S. Protein kinase C induces conductance changes in Hermissenda photoreceptors like those seen in associative learning. Nature (1986) 319: 220-223.

Fatt, P. & Katz, B. An analysis of the end-plate potencial recorded with an intra-celular electrode. J. Physiol. (1951) 115: 320-370.

Fatt, P. & Katz, B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. J. Physiol. (1952) 117: 109-128.

Fertuck HC, Salpeter MM. Localization of acetylcholine receptor by 125I-labeled alpha-bungarotoxin binding at mouse motor endplates. Proc Natl Acad Sci U S A 1974 Apr;71(4):1376-8.

Fishman, P.S., D.A. Farrand, D.A. Kristt (1991) Penetration and internalization of plasma proteins in the human spinal cord. J. Neurol. Sci., 104: 166-175.

Fossier P, Tauc L, Baux G. Calcium transients and neurotransmitter release at an identified synapse. Trends Neurosci 1999 Apr;22(4):161-6

Fox, A.P., Nowicky, M.C., Tsien R.W. (1987) Kinetic and Pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurons J. Phsyiol (London) 394: 149-172

Fu, W. M. & Huang F. L. (1994). L-type $Ca^{2\cdot}$ channel is involved in the regulation of spontaneous transmitter release at developing neuromuscular synapses. Neuroscience 58, 131-140.

Fu, W.M. & Huang, F.L. (1993) L-type Ca^{2+} channel is involved in the regulation of spontaneous transmitter release at developing neuromuscular synapses. Soc fro Neurosc Abstracts 19: 1716

Fumiharu, K; Smith, G. Delbono, O. et. al. Amyotrophic Lateral Sclerosis patient antibodies label Ca2+ channel $\alpha 1$ subunit. Annals of Neurology, 37:164-171, 1994.

Ghosh A, Greenberg ME. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. Science 1995 Apr 14;268(5208):239-47.

Gray, D.B. Bruses, J.L. and Pilar G.R. (1992) Developmental switch in the pharmacology of Ca^{2+} channels coupled to acetylcholine release. Neuron 8 :1-20

Gray, R. and Johnston, D. Noradrenaline and (-receptor agonists increase activity of voltage-dependent calcium channels in hippocampal neurones. Nature (1987) 327: 620-622.

Gubbay SS, Kahana E, Zilber N, Cooper G, Pintov S, Leibowitz Y. Amyotrophic lateral sclerosis. A study of its presentation and prognosis. J Neurol 1985;232(5):295-300.

Haimann, C.; Meldolesi, J. and Ceccarelli, B. The phorbol ester, 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, enhances the evoked quanta release of acetylcholine at the frog neuromuscular junction. Pflügers Archiv. European. Journal of Physiology (1987) 408: 27-31.

Hansen S, Ballantyne JP. A quantitative electrophysiological study of motor neurone disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1978 Sep;41(9):773-783.

Haverkamp LJ, Appel V, Appel SH. Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population. Validation of a scoring system and a model for survival prediction. Brain 1995 Jun;118 (Pt 3):707-19

Heuser J.E., Reese T.S. (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during tranmitter release at the frog neuromuscular junction. J. Cell Biol. 88:564-580.

Heuser, J.E.; Reese, T.S. and Landis, D.M. Functional changes in frog neuromuscular junctions studied with freeze fracture. Journal of Neurocytology (1974) 371: 513-515.

Hirano A, Donnenfeld H, Sasaki S, Nakano I. Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol 1984 Sep;43(5):461-470.

Hirano A, Malamud N, Elizan TS, Kurland LT. Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinsonism-dementia complex on Guam. Further pathologic studies. Arch Neurol 1966 Jul;15(1):35-51.

Hochachka, P.W. Temperature: the ectothermy option. Phylogenetic and biochemical perspectives. Elsevier (1991), Vol. 1, Cap. 12: 313-322.

Holtzman E., Freeman A.R., Kashner L.A. (1971) Stimulation-dependent alteration in peroxidase uptake at lobster neuromuscular junctions. Science 173: 733-736.

Hong, S.J. and Chang, C.C. Inhibition of acetylcholina release from mouse motor nerve by a P-type calcium channel blocker, (-agatoxina IVA. J. Physiol (1995) 482.2: 283-290.

Honig M.& Hume R. (1989) DiI and DiO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. Trends in Neurosciences ,12(9), 333-341.

Honig M.& Hume R.(1986). Fluorescent Carbocyanine Dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures.The Journal of Cell Biology,103,171-187.

Hubbard, J., I., Llinás, R. & Quastel, D., M., J., (1969). Electrophysiological analysis of synaptic transmission. Edward Arnold (Publishers) LTD., London.

Hughes JT. Pathology of amyotrophic lateral sclerosis. Adv Neurol 1982;36:61-74

Hugon J, Vallat JM. Abnormal distribution of phosphorylated neurofilaments in neuronal degeneration induced by kainic acid. Neurosci Lett 1990 Oct 30;119(1):45-48.

Ince P, Stout N, Shaw P, Slade J, Hunziker W, Heizmann CW, Baimbridge KG. Parvalbumin and calbindin D-28k in the human motor system and in motor neuron disease. Neuropathol Appl Neurobiol 1993 Aug;19(4):291-299.

Kamath, A.; Larson, K.; Shibata, E.F. and Hoshi, T. Mechanisms of dihydropyridine block of Shaker potassium channels. Abs. Neurosci. (1995) 21: 720.8.

Kandel, E.R.; Schwartz, J.H. and Jessel, T.M. Principles of neural sciences (1991) Elsevier. Sci. Publ. pag: 209.

Katz B, Miledi R Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer. J Physiol (Lond) 1969 Aug;203(3):689-706. Año?

Katz B. (1969)The Release of Neurotransmitter Substances. Liverpool: Univ.Press. Liverpool.

Katz E, Protti DA, Ferro PA, Rosato Siri MD, Uchitel OD. Effects of Ca^{2+} channel blocker neurotoxins on transmitter release and presynaptic currents at the mouse neuromuscular junction. Br J Pharmacol 1997;121:1531-1540.

Katz, B. & Miledi, R (1970). Further study of the role of calcium in synaptic transmission. Journal of Physiology 207, 789-801.

Katz, B. (1978). The release of neuromuscular transmitter and the present state of the vesicular hypothesis. Studies in Neurophysiology, Cambridge University Press.

Katz, B. The release of the neuromuscular transmitter and the present state of the vesicular hypothesis. Cambridge University Press (1978).

Katz, E., Ferro, P.A., Weisz, G. & Uchitel, O. D. (1996). Calcium channels involved in synaptic transmission at the mature and regenerating mouse neuromuscular junction. Journal of Physiology 497, 687-697.

Katz, E., Protti, D.A., Ferro, P.A., Rosato Siri, M.D & Uchitel, O. D. (1997). Effects of Ca^{2+} channel blocker neurotoxins on transmitter release and presynaptic currents at the mouse neuromuscular junction. British Journal of Pharmacology 121, 1531-1540.

Kimura, F., R.G. Smith, O. Delbono, et al. (1994) Amyotrophic Lateral Sclerosis patient antibodies label Ca^{2+} channel α_1 subunit. Ann. Neurol, 35: 164-171.

Klatzo, I. (1967) Neuropathological aspects of brain edema. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 26: 1-14.

Knox, R.J.; Quattrocki, E.A.; Connor, J.A. and Kaczmarek, L.K. Recruitment of Ca2 channels by Protein Kinase C during rapid formation of putative neuropeptide release site in isolated Aplysia neurons. Neuron (1992) 8: 883-889.

Kuffler SW, Yoshikami D The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. J Physiol (Lond) 1975 Oct;251(2):465-82.

Latov N, Hays AP, Donofrio PD, Liao J, Ito H, McGinnis S, Konstadoulakis M, Freddo L, Shy ME, et al. Monoclonal IgM with unique specificity to gangliosides GM1 and GD1b and to lacto-N-tetraose associated with human motor neuron disease. Neurology 1988 May;38(5):763-8

Latov N, Hays AP, Yu RK, Ito H, Thomas FP. Antibodies to glycoconjugates in human motor neuron disease. Neurochem Pathol 1988 Jun;8(3):181-7

Lemos JR, Nowycky MC. Two types of calcium channels coexist in peptide-releasing vertebrate nerve terminals. Neuron 1989 May;2(5):1419-26

Lichtman J.W., Wilkinson R.S. (1987) Properties of motor units in the transversus abdominis mescle of the garter snake. J. Physiol. 393: 355-374.

Lichtman J.W., Wilkinson R.S., Rich M.M. (1985) Multiple innervation of tonic endplates revealed by activity-dependent uptake of fluorescent probes. Nature 314: 357-359.

Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein JD. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. Neuron 1998 Mar;20(3):589-602

Luebke, J.I., Dunlap,K. and Turner,T.J.Multiple calcium channels types control glutanatergic synaptic transmission in the hipocampus.Neuron,11:895-902;1993

Llinas R, Sugimori M, Hillman DE, Cherksey B. Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca2+ channels in the mammalian central nervous system. Trends Neurosci 1992 Sep;15(9):351-5

Llinás RR, Sugimori M, Lin JW. and Cherksey, B. (1989). Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1689 -1693

Llinás, R. R. (1977). Calcium and transmitter release in squid synapse. Society for Neuroscience Symposium 2, 139-160.

Llinás, R. Sugimori, M. Cherskey, B. et al (1993) IgG from amyotrophics lateral sclerosis patients increases currents trhought P-type calcium channels in mammalian cerebellar Purkinje cells and in isolated channel protein Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11743-11747.

Llinás, R.R.; McGuinness, T.L.; Leonard, C.S.; Sugimori, M. and Greengard, P. Intraterminal injection of synapsin I or calcium / calmodulin-dependent protein kinase II alters neurotrasnmitter release at the squid giant synapse. Proc Nalt. Acad. Sci. (USA) (1985) 82: 3035-3039.

Llinás, R.R.; Sugimori, M. and Simon, S.M. Transmission by presynaptic spike-like depolarization in the squid giant synapse. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1982) 79: 2415-2419.

Llinás, R.R.; Sugimori, M.; Lin, J.W.; Cherksey, B. Blocking and isolation of calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1989) 86: 1689-1693.

Llinás, R.R.; Yarom, Y. J. Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. Physiol. (1981) 315: 549-567.

Mallart, A. (1985) Electric current flow inside perineurial sheaths of mouse motor nerves J. Physiol (London) 368:, 565-575

Mannen T, Iwata M, Toyokura Y, Nagashima K. Preservation of a certain motoneurone group of the sacral cord in amyotrophic lateral sclerosis: its clinical significance. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1977 May;40(5):464-9.

Martin , A.R. Quantal nature of synaptic transmission.(1966) Physiol Rev 46:51-66

Maselli, R., Wollman R., Mass D. et al. (1989) Electrophysiologic and morphologic studies of the neuromuscular junction in patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. Neurology 39 Supl 1 :400.

McCleskey EW, Fox AP, Feldman DH, Cruz LJ, Olivera BM, Tsien RW, Yoshikami D. Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. Proc Natl Acad Sci U S A 1987 Jun;84(12):4327-31

McCobb DP, Best PM, Beam KG. Development alters the expression of calcium currents in chick limb motoneurons. *Neuron* 1989 Jun;2(6):1633-43

Mintz, I.M. and Bean, B.P. Block of calcium channels in rat neurons by synthetic ω-Aga IVA. Neuropharmacology (1993) 32: 1161-1169.

Mintz, I.M. Venema ,V.J. Swiderek, K, et al (1992) P-type caclium channels blocked by the spider toxin omega -Aga IVA. Nature 355: 827-829

Mintz, I.M.; Sabatini, B.L. and Regehr, W.G. Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. Neuron (1995) 15: 675-688.

Mogul, D.J. and Fox A.P. J. Evidence for multiple types of Ca^{2+} channels in acutely isolated hippocampal CA3 neurones of the guinea-pig. Physiol. (1991) 433: 259-281.

Momiyama, A. & Takahashi, T. (1994). Calcium channels responsible for potassium-induced transmitter release at rat cerebellar synapses. Journal of Physiology 476, 197-202.

Monje V.D., Haack J.A., Naisbitt, S.R. et al .(1993) A new conus peptide ligand for Ca^{2+} channel subtypes. Neuropharmacology 32: 1141-1149.

Mosier D.R., Smith R.G., Delbono O., Appel S.H. and Stefani E. (1993) Effect of ALS immunoglobulins on calcium currents in hybrid neuroblastoma cells. Soc.for Neuroscience Abstracts 19: 703.

Muniak, C.G., Kriebel, M.E. and Carlson, C.G. (1982) Changes in MEPP and EPP amplitude distributions in the mouse diaphragm during synapse formation and degeneration. Developmental Brain Research 5: 123-138.

Murphy T.H., Worley P.F. and Baraban J.M. (1991) L-type voltage-sensitive channels mediate synaptic activation of immediate early genes. *Neuron* 7(4), 625-635

Neher E. (1998) Vesicle pools and Ca^{2+} microdomains: New tools for understanding their roles in neurotransmitter release. Neuron 20, 389-399

Nicholls, J. G., Martin, A. R., Wallace, B. G. (1992) From Neuron to Brain. Tercera Edición. Sinauer Assoc. Inc.

Nishizuka, Y. Studies and perspectives of Protein Kinase C. Science (1986) 233: 305-312.

Nowycky, M.C.; Fox, A.P.; Tsien, R.W. Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. Nature (1985) 316: 440-443.

O'Connor, V.; Agustine, G.J. and Betz, H. Synaptic vesicle exocytosis: molecules and models. Cell (1994) 76: 785-787.

Olivera, B.M.; Miljanich, G.P.; Ramachandran, J. and Adams, M.E. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: The ω-Conotoxins and ω-Agatoxins. Annu. Rev. Biochem. (1994) 63: 823-867.

O'Shaughnessy T, Viglione M.P. and Kim Y. I (1993) Effect of amyotrophic lateral sclerosis plasma on calcium currents in bovine adrenal chromaffin cells. Soc. for Neuroscience Abstracts 19:703

Pancrazio J.J., Viglione M.P. and Kim Y.I. (1989) Effects of Bay K 8644 on spontaneous and evoked transmitter release at the mouse neuromuscular junction. Nueroscience 30: 215-221

Passafaro, M.; Clementi, F.; Pollo, A.; Carbone, E. and Sher, E. (-Conotoxin and Cd2' stimulate the recruitment to the plasmamembrane of an intracelular pool of voltage-operated Ca2' channels. Neu_ron (1994) 12: 317-326.

Penner,R. and Dreyer, F. Two different presynaptic calcium currents in mouse motor nerve terminals. Pflügers Arch. (1986) 406: 190-197.

Peper, K.; Dreyer, F.; Sandri, C.; Akert, K. and Moore, H. Structure and ultrastructure of the frog motor end-plate: A freeze-etching study. Cell Tiss. Res. (1974) 149: 437-455.

Perney TM, Hirning LD, Leeman SE, Miller RJ. Multiple calcium channels mediate neurotransmitter release from peripheral neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 1986 Sep;83(17):6656-9.

Phei- Hong Zhu & Vrbova G.(1992) The role of Ca^{2+} in the elimination of polyneuronal innervation of rat soleus muscle fibres. Europ. J. of Neuroscience 4: 433-437,

Protti D.A., Szczupak L., Scornik F, Uchitel O.D. (1991). Effect of ω-conotoxin GVIA on neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. Brain Research 557, 336-339.

Protti, D.A. and Uchitel, O.D. Transmitter release and presynaptic Ca2+ currents blocked by the spider toxin ω-Aga IVA. NeuroReport (1993) 5: 333-336.

Protti, D.A., R. Reisin, T.A. Mackinley, O.D. Uchitel Calcium channel blockers and transmitter release at the normal human neuromuscular junction. Neurology 1996 May;46(5):1391-6.

Protti, D.A.; Szczupak, L.; Scornik F.S. and Uchitel, O.D. (1991) Effect of ω-Conotoxina GVIA on neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. Brain Research 557: 336-339.

Pumplin DW, Reese TS, Llinas R Are the presynaptic membrane particles the calcium channels? Proc Natl Acad Sci U S A 1981 Nov;78(11):7210-3

Puymirat J, Cossette L, Gosselin F, Bouchard JP. Red blood cell Cu/Zn superoxide dismutase activity in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci 1994 Dec 1;127(1):121-123.

Randall A.D. and Tsien R.W. (1997) Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. Neuropharmacology 36(7), 879-893.

Randall, A.D. and Tsien, R.W. Pharmacological Dissection of Multiple Types of Ca^{2+} Channel Currents in Rat Cerebellar Granule Neurons. J. Neurosci. (1995) 15(4): 2995-3012.

Randall, A.D.; Wendland, B.; Scheweizer, F.; Miljanich, G.; Adams, M.E.; Tsien, R.W. Block of calcium channels in central and peripheral rat neurons by ω-conotoxin-MVIIC. Soc. Neurosci. Abstr. (1993) 19: 1478.

Rane, S.G. & Dunlap, K. Kinase C activator 1,2-oleoylacetylglycerol attenuates voltage-dependent calcium currents in sensory neurones. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1986) 83: 184-188.

Redfern, P.A. (1970) Neuromuscular transmission in newborn rats. J. Physiol. 209: 571-582

Regan, L.J.; Sah, D.W.; Bean, B.P. Ca^{2+} channels in rat central and peripherial neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and ω-conotoxin. Neuron (1991) 6: 269-280.

Reiner A, Medina L, Figueredo-Cardenas G, Anfinson S. Brainstem motoneuron pools that are selectively resistant in amyotrophic lateral sclerosis are preferentially enriched in parvalbumin: evidence from monkey brainstem for a calcium-mediated mechanism in sporadic ALS. Exp Neurol 1995 Feb;131(2):239-250.

Reuter H. Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain. Curr Opin Neurobiol 1996 Jun;6(3):331-7

Rodbell, M. The role of hormone receptor and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. Nature (1980) 284: 17-22.

Roisen FJ, Bartfeld H, Donnenfeld H, Baxter J. Neuron specific in vitro cytotoxicity of sera from patients with amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve 1982 Jan;5(1):48-53

Rossoni, G.; Berti, F.; La Maestra, L.; Clementi F. ω-Conotoxin GVIA binds to and blocks rat neuromuscular junction. Neurosci. Letters (1994) 176: 185-188.

Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 1995 Jul;38(1):73-84

Santa Fe, M. M & Uchitel, O. D. (1997). L and P type calcium channels mediate transmitter release in botulinum toxin treated neuromuscular junction. Society for Neuroscience, 23 (470.2), 1180.

Sather, W.A.; Tanabe, T.; Zhang, J.F.; Mori, Y.; Adams, M.E.; Tsien, R.W. Neuron (1993) 11: 291-303.

Scornik, F.; Szczupak, L.; Nicola Siri, L. and Uchitel, O.D. Ca2+ role on the effect of phorbol esters on the spontaneous quantal release of neurotransmitter at the mouse neuromuscular junction. Brain Research (1990) 525: 280-284.

Scott, R.H.; Pearson, H.A. and Dolphin, A.C. Aspects of vertebrate neuronal voltage-activated calcium currents and their regulation. Progress in Neurobiology (1991) 36: 485-520.

Shapira, R.; Silberberg, S.D.; Ginsburg, S. and Rahamimoff, R. Activation of protein Kinase C augments evoked transmitter release. Nature (1987) 325: 58-60.

Shaw IC, Fitzmaurice PS, Mitchell JD, Lynch PG. Studies on cellular free radical protection mechanisms in the anterior horn from patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurodegeneration 1995 Dec;4(4):391-396.

Shy, M.E., L. P. Rowland, T. Smith et al. (1986) Motor neuron disease and plasma cell dyscrasia. Neurology, 36:1429-1436.

Smith, R. G., M. E. Alexianu, G. Crawford, O. Nyormoi, E. Stefani and S.H. Appel (1994) The cytotoxicity of immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis on a hybrid motoneuron cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 3393-3397.

Smith, R.G., S. Hamilton, F. Hofmann, T. Schneider, W. Nastainczyk, L. Hofmann et al.(1992) Serum antibodies to L-type calcium channels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. N. Engl. J. Med., 327: 1721-1728.

Smith, S.J. and Augustine, G.J. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. Trends in Neurosciences. (1988) 11: 458-464.

Snuth, T.P.; Leonard, J.P.; Gilbert, M.M.; Lester, H.A.; Davidson, N. Rat brain expresses a heterogeneous family of calcium channels. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1990) 87: 3391-3395.

Spencer PS, Ohta M, Palmer VS. Cycad use and motor neurone disease in Kii peninsula of Japan. Lancet 1987 Dec 19;2 (8573):1462-1463.

Steinbach JH. Structural and functional diversity in vertebrate skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Physiol* 1989;51:353-65

Strong, S.A.; Fox, A.P.; Tsien, R.W. and Kaczmarek, L.K. Stimulation of protein kinase C recruits covers calcium channels in Aplysia bag cell neurones. Nature (1987) 325: 714-717.

Sugiura, Y. & Ko, C.P., (1997). Novel modulatory effect of L-type calcium channels at newly formed neuromuscular junctions. The J. of Neuroscience, 17 (3), 1101-1111.

Takahashi, T. & Momiyama A. (1993). Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. Nature. 366 (6451), 156-158.

The ion channel Facts Book IV, Voltage-gated channels, E. Conley & W. Brammar, Academic Press, 1999.

Trojanowski JQ, Gonatas JO, Gonatas NK. Horseradish peroxidase (HRP) conjugates of cholera toxin and lectins are more sensitive retrogradely transported markers than free HRP. Brain Res 1982 Jan 7;231(1):33-50

Troost, D., J.J. van den Oord, J.M.B.V. de Jong and D.F. Swaab (1989) Lymphocytic infiltration in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Clin. Neuropathol., 8: 289-294.

Tsien, R. W., Lipscombe, D., Madison , et al. (1988) Multiple types of neuronal calcium and their selective modulation Trends in Neurosci.11, 431- 438 .

Tsien, R. W.; Ellinor, P. T. & Horne, A. W. (1991). Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} channels. Trends in Pharmacological Science 12, 349-354.

Tsien, R.W.; Lipscombe, D.; Madison, D.V.; Bley, K.R.; Fox, A.P. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. Trends Neurosci. (1988) 11: 413-438.

Uchitel, O. D. (1997) Toxins affecting calcium channels in neurons. Toxicon 35, 1161-1191.

Uchitel, O.D. and D.A. Protti (1994) P-type calcium channels and transmitter release from nerve terminals. News in Physiol. Sci., 9: 101-105.

Uchitel, O.D. Scornik ,F.S.; Protti, D.A.; Fumberg,C.G.; Alvarez V.A. & Appel S.H. (1992) Long term neuromuscular dysfunction produced by passive transfer of Amyotorphic Lateral Sclerosis (ALS) immunoglobulins. Neurology 42 (11): 2175-2180.

Uchitel, O.D., Protti, D.A., Sánchez, V., Cherksey, B.D., Sugimori, M. & Llinás, R. (1992). P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 89, 3330-3333.

Uchitel, O.D., S.H Appel, F. Crawford, L. Sczupak (1988) Immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients enhance spontaneous transmitter release from motor-nerve terminals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 7371-7374.

Uchitel, O.D.; Protti, D.A.; Sanchez, V.; Cherksey, B.D, Sugimori, M.; and Llinas, R.R. (1992). P- type voltage dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. Procc. Natl. Acad. Sci. USA.87:3330-3333

Usowicz MM, Sugimori M, Cherksey B, Llinas R. P-type calcium channels in the somata and dendrites of adult cerebellar Purkinje cells. Neuron 1992 Dec;9(6):1185-99.

Valtorta, F., R. Jahn, R. Fesce, P. Greengard and B. Ceccarelli (1988) Synaptophysin (p38) at the frog neuromuscular junction: its incorporation into the axolemma and recycling after intense quantal secretion. J. Cell Biol., 107: 2717-2727.

van der Krans A, Hoogland PV. Labeling of neurons following intravenous injections of fluorescent tracers in mice. J Neurosci Methods 1983 Oct;9(2):95-103

Wessler, I,; Dooley, D. J.; Wehand, J. and Schlemmer, F. Differential effects of calcium channel antagonists (omega-conotoxina GVIA, nifedipine, verapamil) on the electrically-

evoked release of [^{3}H] acetylcholine from the myenteric plexus, phrenic nerve, and neocortex of rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. (1990b) 341: 288-294.

Westenbroek RE, Hoskins L, Catterall WA. Localization of Ca2+ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. J Neurosci 1998 Aug 15;18(16):6319-30

Whittaker VP. Molecular organization of the cholinergic vesicle. Adv Cytopharmacol 1974;2:311-7.

Williams, M.E.; Brust, P.F.; Feldman, D.H.; Patthi, S.; Simerson, S.; et al. Structure and functional expression of an ω-Conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. Science (1992) 257: 389-395.

Williams, M.E.; Feldman, D.H.; McCue, A.F.; Brenner, R.; Velicelebi, G.; et al. Structure and functional expression of α_1, α_2 and β subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. Neuron (1992) 8: 71-84.

Wu LG, Saggau P. Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3-CA1 synapses of the hippocampus. J Neurosci 1994 Sep;14(9):5613-22

Xu Z, Cork LC, Griffin JW, Cleveland DW. Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. Cell 1993 Apr 9;73(1):23-33.

Yaari Y, Hamon B, Lux HD. Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science* 1987 Feb 6;235(4789):680-2

Yamamoto T, Iwasaki Y, Konno H, Kudo H. Primary degeneration of motor neurons by toxic lectins conveyed from the peripheral nerve. J Neurol Sci 1985 Oct;70(3):327-37

Yamamoto T, Iwasaki Y, Konno H. Retrograde axoplasmic transport of adriamycin: an experimental form of motor neuron disease? Neurology 1984 Oct;34(10):1299-304

Yamamoto, T., Y. Iwasaki , H. Konno, H. Iizuka and J. Zhao (1987) Retrograde transport and differential accumulation of serum proteins in motoneurons: Implications for motor neurons diseases. Neurology, 37: 843-846.

Younger DS, Rowland LP, Latov N, Sherman W, Pesce M, Lange DJ, Trojaborg W, Miller JR, Lovelace RE, Hays AP, et al. Motor neuron disease and amyotrophic lateral sclerosis: relation of high CSF protein content to paraproteinemia and clinical syndromes. Neurology 1990 Apr;40(4):595-9

Zar JH. Biostatistical Analysis, 3er edition, Prentice Hall edit. 1996.

Zengel J. E. , Sosa M.A. and Poage, R.E. (1993) W-Conotoxin reduces facilitation of transmitter release at the frog neuromuscular junction. Brain Research 611: 25-30

Zhang, J.F.; Randall, A.D.; Ellinor, P.T.; Horne, W.A.; Sather, W.A.; et al. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca2+ channels and their possible counterparts in mammalian SNC neurons. Neuropharmacology (1993) 32: 1075-1088.

Zimmermann H. (1979) Vesicle recycling and transmitter release. Neuroscience 4: 1773-1804.