

Tesis Doctoral

# Interacción de la inmunoglobulinas G de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica con la placa neuromuscular y su relación con los canales de calcio de tipo P/Q

González, Laura Elisabeth

2012-03-27

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

González, Laura Elisabeth. (2012-03-27). Interacción de la inmunoglobulinas G de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica con la placa neuromuscular y su relación con los canales de calcio de tipo P/Q. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

González, Laura Elisabeth. "Interacción de la inmunoglobulinas G de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica con la placa neuromuscular y su relación con los canales de calcio de tipo P/Q". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012-03-27.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología y Biología Molecular

**Interacción de las Inmunoglobulinas G de  
pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica con  
la placa neuromuscular y su relación con los  
canales de calcio de tipo P/Q**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Laura Elisabeth González

Director de Tesis: Dr. Osvaldo Daniel Uchitel.

Director Asistente: Dra. Mónica Lidia Kotler.

Consejero de Estudios: Dr. Dante Agustín Paz.

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencia,  
CONICET - UBA.

Buenos Aires, Marzo 2012.

## **Interacción de las Inmunoglobulinas G de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica con la placa neuromuscular y su relación con los canales de calcio de tipo P/ Q**

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa de motoneuronas. Se encuentra mayormente asociada a una forma esporádica de etiología desconocida. Numerosas evidencias favorecen a la auto-inmunidad como uno de los potenciales contribuyentes a esta patología.

Para estudiar los posibles antígenos que interactúan con las IgGs de pacientes con ELA esporádica (IgGs-ELA), evaluamos su inmuno-reactividad hacia la placa neuromuscular (PNM), comparando animales normales con aquellos carentes de la subunidad formadora del poro del canal de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) de tipo P/Q ( $\text{Ca}_v2.1$ ). Las IgGs-ELA mostraron una importante reactividad hacia la PNM de ratones  $\text{Ca}_v2.1^{+/+}$  e incrementaron la frecuencia de potenciales de placa miniatura (MEPPs). Ambos parámetros disminuyeron significativamente al evaluar tejido de animales  $\text{Ca}_v2.1^{-/-}$ . Ensayos de inmuno-precipitación y *western blot* indican que el blanco de los anticuerpos no sería el canal mismo sino una proteína asociada. Estudios de proteómica sugieren a la proteína BASP-1 (proteína ácida soluble de cerebro-1) como un candidato a evaluar en forma más detallada en futuros ensayos.

Nuestros resultados adicionan evidencias a favor de la auto-inmunidad como uno de los posibles mecanismos contribuyentes a la patología de ELA. También sugieren que los auto-anticuerpos en el suero de una serie de pacientes interactúan con proteínas cuya presencia en la PNM disminuye cuando los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q se encuentran ausentes.

Palabras clave: Esclerosis Lateral Amiotrófica, canales de calcio, auto-anticuerpos, placa neuromuscular, auto-inmunidad.

**Interaction of Immunoglobulins G from Amyotrophic Lateral Sclerosis patients with the neuromuscular junction and its relationship with the P/ Q-type calcium channels**

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a motoneuron neurodegenerative disease. It is primarily associated with a sporadic form of unknown etiology. Several pieces of evidence favor auto-immunity as a potential contributor to this pathology.

To gain understanding concerning possible antigens interacting with IgGs from sporadic ALS patients (ALS-IgGs), we studied immuno-reactivity against the neuromuscular junction (NMJ) of mice with and without the pore-forming subunit of the P/Q-type calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) channel ( $\text{Ca}_v2.1$ ). ALS-IgGs showed a strong reactivity against NMJs of WT diaphragms and increased the miniature end-plate potential (MEPP) frequency. Both parameters were significantly diminished when evaluating tissue from  $\text{Ca}_v2.1^{-/-}$  animals. Immuno-precipitation and western blot assays indicate that antibody target would not be the channel itself but an associated protein. Proteomic studies suggest BASP-1 (brain acid soluble protein-1) as a candidate to evaluate in more detail in future assays.

Our findings add further evidence supporting auto-immunity as one of the possible mechanisms contributing to ALS pathology. They also suggest that serum auto-antibodies in a subset of ALS patients would interact with NMJ proteins down-regulated when P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels are absent.

Keywords: Amyotrophic Lateral Sclerosis, calcium channels, auto-antibodies, neuromuscular junction, auto-immunity.

*A mis padres*

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que  
el vapor, la electricidad y la energía atómica:  
la voluntad”*

*Albert Einstein*

*“Pero, a pesar de todo, no cambiaría mi suerte por la de ningún médico  
porteño. La gran ciudad no puede brindar la serenidad, la paz, el contento  
que ofrece la cordillera. ¿Puede esta pálida mole de piedras ofrecerme algo  
comparable a mis montañas, a mis picos coronados de nieves eternas, a mis  
arroyos caudalosos, a mis pobres araucanos?”*

*Dr. Rodolfo Kössler*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres y a mi hermano, por haberme enseñado que vale la pena esforzarse y sacrificarse por lo que uno cree, por haberme inculcado valores tan importantes como la honestidad, la sinceridad y el respeto. Gracias Pa por haber sido un Gran Hombre que siempre procuró por su familia y sus amigos. A pesar de tu ausencia me reconforta saber que, de estar con nosotros ahora, te sentirías muy orgulloso de tus hijos. Siempre serás la luz que ilumina mi camino.

A mi Director, Osvaldo Uchitel, por haberme recibido en su laboratorio y haberme permitido llevar adelante esta tesis bajo su constante supervisión, guía y apoyo.

A mi co-Directora, Mónica Kotler, por seguir colaborando con mi desarrollo profesional y humano; y por haber realizado un constante aporte de conocimientos y experiencia para concretar este trabajo de tesis.

A Francisco Urbano, por su gran calidez humana y por haber sido una fuente inagotable de conocimientos, sentido del humor, apoyo moral y consejos.

A Euge y Hernán Martín, Cari Weissmann, Mariano Di Guilmi y Pauli Felman, por su invaluable amistad, que estoy segura va a durar toda la vida, y por las incontables tardes de mates y bizcochitos.

A mis amigos del alma, por estar siempre para compartir momentos buenos y no tan buenos: Pau, Shir, Marti, Maru, Vivi, Ro, Martín, Mariana, Lu, Vero, Gus.

A la gente linda del labo con la cual tuve el privilegio de compartir estos años, por haber hecho que fuera un placer para mí ir a trabajar todos los días: Cari, Euge, Lucas, FU, Marian, Pau, Hernán, Vero, Joaco, Bel, Carlota, Mauricio, Ayelén, Nati, Fernando, Augusto, Noelia, Dani, Roberto, Ramona.

A Terry Snutch y su grupo (Esperanza, Kirk, Stuart, Karen, John, Lawrence, Cynthia), no solo por haberme ayudado enormemente con algunos resultados de esta tesis, sino por haber hecho mi estadía en Vancouver una experiencia tan enriquecedora como memorable.

A las personas que han pasado por el labo y con las cuales tuve la suerte de compartir muy agradables momentos: Paula, Elisa, Andrés, Barbi, Yani, Itatí, Eugecita, Karen, Antonella.

Al Dr. Reisin y su grupo de colaboradores en el Hospital Británico, por haberme provisto de las muestras de suero, pero más importante, por la incansable lucha que emprenden todos los días contra una enfermedad tan devastadora y cruel como es la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

Al grupo de la Unidad de Proteómica y Bioquímica Analítica del Instituto Pasteur de Montevideo (Carlos Cerveñansky, Rosario Durán y Analía Lima), por haberme permitido realizar los experimentos de espectrometría de masa gracias a su colaboración.

A Rafa Pagani y Elisa Filevich, por haberme ayudado enormemente con el comienzo de mis experimentos.

A todas las personas que desinteresadamente colaboraron para poder llevar adelante este trabajo, ya sea con sus conocimientos o con préstamo de reactivos o equipos.

A Viviana Sánchez por haberme ayudado con la purificación de sinaptosomas.

Al CONICET y a la ANPCyT, por haber aportado el financiamiento que me permitió desarrollar mis tareas de investigación.

A la IBRO, SfN y EMBO, por haberme posibilitado participar de cursos y congresos que no solo representaron un crecimiento profesional sino también personal, donde pude conocer gente increíble y lugares extraordinarios.

A mi abuela Oma, por haber sido una inspiración en vida y seguir guiando mi camino desde donde sea que esté. Gracias por haberme transmitido tu amor por los libros y haberme convertido en una *ratita de biblioteca*.

A mis dos solcitos, Pepa y Chiki, por alegrar cada día de mi existencia y hacerme recordar qué cosas son realmente importantes en la vida (esas cosas que solemos olvidar con tanta frecuencia..).

A todos aquellos seres que me inspiran día a día a ser una mejor persona, y me ayudan a valorar las cosas simples y hermosas que nos ofrece la vida.

# ÍNDICE

<b>1 - Abreviaturas.....</b>	<b>2</b>
<b>2 - Introducción.....</b>	<b>5</b>
2.1 - Esclerosis Lateral Amiotrófica .....	5
2.1.1 - Características clínicas y diagnóstico .....	5
2.1.2 - Etiología .....	7
2.1.3 - Tratamiento .....	9
2.1.4 - Mecanismos auto-inmunes .....	9
2.2 - Sistema motor .....	11
2.2.1 - Médula espinal .....	12
2.2.2 - Corteza cerebral .....	15
2.2.3 - Cerebelo y ganglios basales.....	17
2.3 - Unión neuromuscular.....	18
2.3.1 - Estructura de la unión neuromuscular.....	18
2.3.2 - Transmisión sináptica neuromuscular.....	21
2.3.3 - Liberación espontánea de neurotransmisor.....	22
2.4 - Canales de Ca <sup>2+</sup> dependientes de voltaje .....	23
<b>3 - Objetivos.....</b>	<b>30</b>
<b>4 - Materiales y Métodos.....</b>	<b>32</b>
4.1 - Materiales .....	32
4.1.1 - Reactivos.....	32

4.1.2 - Líneas de ratones.....	32
4.1.3 - Muestras de suero humano .....	33
4.2 - Métodos.....	34
4.2.1 - Manejo de animales.....	34
4.2.2 - Genotipado de ratones .....	35
4.2.3 - Purificación de Inmunoglobulinas G.....	36
4.2.4 - Ensayo de ELISA .....	37
4.2.5 - Registros intracelulares.....	38
4.2.6 - Inmuno-fluorescencia de PNM.....	39
4.2.7 - Inmuno-fluorescencia de médula espinal, corteza cerebral y cerebelo .....	40
4.2.8 - Análisis de inmuno-fluorescencia y procesado de imágenes.....	42
4.2.9 - Preparación de sinaptosomas.....	43
4.2.10 - Obtención de extractos totales de cerebelo y músculo.....	44
4.2.11 - Purificación de <i>rafts</i> .....	44
4.2.12 - Cultivo de células y transfección/inducción .....	45
4.2.13 - Determinación de la concentración de proteínas.....	47
4.2.14 - Ensayo de inmuno-precipitación .....	47
4.2.15 - Electroforesis en gel de una dimensión y <i>western blot</i> .....	48
4.2.16 - Electroforesis en gel de dos dimensiones.....	48
4.2.17 - Espectrometría de masa e identificación por mapeo peptídico.....	49
4.2.18 - Análisis estadístico .....	50

<b>5 - Resultados.....</b>	<b>52</b>
5.1 - Los anticuerpos de ELA aumentan la actividad sináptica espontánea e interactúan con la PNM de ratón .....	52
5.2 - Reactividad de las IgGs-ELA contra la PNM de los ratones Cav2.1 <sup>-/-</sup> y Cav2.2 <sup>-/-</sup> .....	59
5.3 - Funcionalidad de las IgGs-ELA en la actividad espontánea de la PNM de los ratones Cav2.1 <sup>-/-</sup> .....	61
5.4 - Estudio de la inmuno-marcación de las IgGs-ELA en cerebelo, corteza cerebral y médula espinal.....	64
5.5 - Correlación entre la modulación sináptica y la inmuno-reactividad tisular.....	75
5.6 - Efecto de la delección de Cav2.1 sobre la reactividad de las IgGs-ELA hacia el sistema nervioso central.....	75
5.7 - Análisis de la interacción de las IgGs-ELA con la subunidad $\alpha_1$ del canal de Ca <sup>2+</sup> de tipo P/Q y otras proteínas presinápticas .....	80
5.8 - Análisis comparativo de la interacción de las IgGs-ELA con las proteínas sinápticas de los ratones Cav2.1 <sup>+/+</sup> y Cav2.1 <sup>-/-</sup> .....	84
5.9 - Proteómica comparativa de las proteínas sinápticas de los ratones Cav2.1 <sup>+/+</sup> y Cav2.1 <sup>-/-</sup> .....	86
5.10 - Interacción de las IgGs-ELA con la proteína BASP-1.....	93
<b>6 - Discusión.....</b>	<b>97</b>
6.1 - Placa neuromuscular.....	97
6.2 - Sistema nervioso central.....	99
6.2.1 - Médula espinal.....	100

6.2.2 - Cerebelo.....	102
6.2.3 - Corteza cerebral.....	104
6.2.4 - Astrocitos.....	105
6.3 - Canales de Ca <sup>2+</sup> de tipo P/Q y N.....	107
6.4 - Otras proteínas presinápticas.....	111
6.5 - Proteómica comparativa de la sinapsis Ca <sub>v</sub> 2.1 <sup>+/+</sup> y Ca <sub>v</sub> 2.1 <sup>-/-</sup> .....	113
6.5.1 - Metabolismo energético.....	115
6.5.2 - Citoesqueleto.....	117
6.5.3 - Señalización de Ca <sup>2+</sup> .....	118
6.5.4 - Exocitosis.....	118
6.5.5 - BASP-1.....	119
6.6 - Perspectivas futuras.....	121
6.7 - Conclusiones generales.....	122

**7 - Referencias Bibliográficas..... 125**

# Abreviaturas



## 1 - ABREVIATURAS

---

2D-DIGE	<i>Two-dimensional difference gel electrophoresis</i> (electroforesis bidimensional diferencial en gel)
ADN	Ácido desoxi-ribonucleico
ALS	<i>Amyotrophic Lateral Sclerosis</i> (Esclerosis Lateral Amiotrónica)
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
BASP	<i>Brain acid soluble protein</i> (proteína ácida soluble de cerebro)
BSA	<i>Bovine seroalbumin</i> (seroalbúmina bovina)
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CAP	<i>Cytoskeleton-associated protein</i> (proteína asociada al citoesqueleto)
CCDV	Canal de Ca <sup>2+</sup> dependiente de voltaje
CE	Control enfermo
CS	Control sano
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (medio modificado <i>Dulbecco's Eagle's</i> )
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilendiamintetraacético)
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrónica
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (isotiocianato de fluoresceína)
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> (proteína glial fibrilar ácida)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (peroxidasa de rábano)
IgG	Inmunoglobulina G/ <i>Immunoglobulin G</i>
IgGs-ELA	IgGs de pacientes con ELA esporádica
ITRAQ	<i>Isobaric peptide tags for relative and absolute quantification</i> (marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta)

## 1 - ABREVIATURAS

---

MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization</i> (ionización por desorción laser asistida por matriz)
MARCKS	<i>Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate</i> (sustrato de quinasa C rico en alanina, miristoilado)
MEPP	<i>Miniature end-plate potentials</i> (potenciales de placa miniatura)
MS	<i>Mass spectrometry</i> (espectrometría de masa)
NAP	<i>Neuronal axonal membrane protein</i> (proteína neuronal axonal de membrana)
NeuN	<i>Neuronal nuclei</i> (antígeno neuronal nuclear)
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMJ	<i>Neuromuscular junction</i> (placa neuromuscular)
OPD	<i>O-phenylenediamine</i> (o-fenilendiamina)
P	Edad post-natal de animales (en días)
<i>p</i>	Probabilidad estadística
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (buffer fosfato salino)
PNM	Placa neuromuscular
RIPA	<i>Radio-immuno-precipitation assay</i> (ensayo de radio-inmuno-precipitación)
RN	<i>Ringer's normal solution</i> (solución normal de Ringer)
SFB	Suero fetal bovino
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor</i> (receptor del factor de la proteína de fusión sensible a N-etilmaleimida soluble)
TME	Tris-MgCl <sub>2</sub> -EGTA
TMR	Tetrametilrodamina
TOF	<i>Time of flight</i> (tiempo de vuelo)
WT	<i>Wild-type</i> (salvaje)

# Introducción



### 2.1 - Esclerosis Lateral Amiotrófica

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una de las enfermedades de motoneurona más comunes en la edad adulta y desafortunadamente, una de las más devastadoras.

#### 2.1.1 - Características clínicas y diagnóstico

La primera descripción de ELA como un síndrome de pérdida muscular progresiva fue realizada por Charcot en 1874 (Rowland 2001) mediante el análisis de las características clínicas y patológicas de la enfermedad. De esta contribución se desprende que uno de los rasgos más destacados de ELA -y que en parte da origen a su nombre- es la degeneración del tracto corticoespinal como resultado de la muerte neuronal. Otra particularidad de esta enfermedad es que afecta mayormente al subtipo neuronal responsable de llevar a cabo los movimientos, las motoneuronas o neuronas motoras.

En términos generales, la manifestación clínica de ELA se produce a mediados de la vida adulta, alrededor de los 45-60 años de edad. La sintomatología incluye una serie de manifestaciones que se presentan en diferentes regiones del cuerpo según el sitio de iniciación de la neurodegeneración, el grado de compromiso del eje neural y el estadio de la enfermedad. Al momento de realizar el diagnóstico, el paciente debe presentar síntomas que evidencien tanto compromiso de las motoneuronas superiores (espasticidad, hiper-reflexia) como de las inferiores (fasciculaciones, hipotonía, debilidad y atrofia muscular; Rowland 1998). La latencia entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico se debe en gran

## 2 - INTRODUCCIÓN

---

medida al aumento en la certeza de este último al comprobar el avance de la enfermedad hacia regiones más distales.

Uno de los criterios más ampliamente utilizados para el diagnóstico de ELA es el establecido por la Federación Mundial de Neurología, conocido como el criterio de El Escorial (Brooks 1994). En base a este criterio los pacientes son diagnosticados y clasificados en diferentes categorías de acuerdo a niveles crecientes de certeza (ELA sospechada, posible, probable y definida). En esta guía el diagnóstico de ELA se define a partir de signos de compromiso de motoneuronas inferiores (por medio de exámenes clínicos y evaluaciones electrofisiológicas o neuropatológicas) asociados a evidencias clínicas de daño a motoneuronas superiores. También resulta necesario descartar (por análisis electrofisiológicos, bioquímicos y patológicos) la posibilidad de ocurrencia de otras enfermedades neurológicas que puedan explicar la degeneración de las neuronas motoras, como la atrofia muscular progresiva, la neuropatía motora multifocal o la amiotrofia post-polio.

La patología presenta un desarrollo progresivo pero relativamente rápido y culmina con la parálisis muscular debida a la degeneración motoneuronal. En los Estados Unidos, su incidencia en la población es de alrededor de 2 casos por cada 100.000 personas por año, y dada su alta letalidad, su prevalencia es de 4-6 casos por cada 100.000 habitantes (Mitchell y Borasio 2007). Sin embargo, estas cifras claramente subestiman el impacto que puede llegar a tener la enfermedad, ya que se ha calculado que el riesgo de padecer ELA es de aproximadamente 1 en 400 (Johnson *et al.* 2006). En la mayoría de los pacientes, el compromiso de los músculos respiratorios lleva al deceso del individuo afectado, con una supervivencia

## 2 - INTRODUCCIÓN

---

media de entre 2 y 5 años posteriores al diagnóstico (Williams y Windebank 1991).

### 2.1.2 - Etiología

La sintomatología que se presenta en los pacientes con ELA se debe principalmente a la degeneración de las células de Betz residentes en la corteza motora primaria y las motoneuronas inferiores del tallo cerebral y el asta ventral espinal (Bruijn *et al.* 2004).

A nivel patológico, es frecuente observar en muestras de médula espinal provenientes de autopsias, la ocurrencia de atrofia motoneuronal, junto con un ensanchamiento del pericarion y de los axones proximales. También es posible detectar en el soma y axones de células en proceso de degeneración la presencia de cuerpos de Bunina, esferoides y fibras de material ubiquitinado (Brown *et al.* 2000).

Dado que la degeneración y muerte de las motoneuronas es tanto un evento central como determinante en cuanto al punto final de la enfermedad, siempre se ha hipotetizado que los mecanismos responsables de todo el proceso patológico de ELA deberían originarse en estas células. Sin embargo, estudios recientes han postulado que otros tipos celulares, además de las motoneuronas, podrían estar involucrados en el inicio de la enfermedad (Di Giorgio *et al.* 2007; Nagai *et al.* 2007). Dichos trabajos destacan el rol de las células gliales (y en particular, de los astrocitos) en el proceso de degeneración motoneuronal en ELA, sugiriendo una posible contribución de tipos celulares no neuronales a la patología.

La mayoría de los casos de ELA (90 %) se presenta de una manera esporádica no asociada a una historia familiar de la enfermedad, y cuya

## 2 - INTRODUCCIÓN

---

etiología permanece hasta el momento desconocida. Sin embargo, varios mecanismos han sido propuestos como potenciales agentes contribuyentes a la patogénesis de ELA. Entre ellos se puede mencionar el daño oxidativo (Bowling *et al.* 1993; Niebroj-Dobosz *et al.* 2004), la disfunción mitocondrial (Menzies *et al.* 2002), los mecanismos auto-inmunes (Appel *et al.* 1993; Pagani *et al.* 2006), las anormalidades en el citoesqueleto, el agregado de neurofilamentos (Xu *et al.* 1993; Mendonca *et al.* 2005), la alteración en el transporte axonal y la excitotoxicidad por desregulación del transporte de glutamato (Rothstein *et al.* 1992; Bruijn *et al.* 2004; Van Den Bosch *et al.* 2006). Es importante destacar que los fenómenos arriba mencionados no son mutuamente excluyentes. De hecho, es cada vez más común la visión de ELA no como una patología de causa única, sino como un síndrome con varios mecanismos moleculares potencialmente contribuyentes a la neurodegeneración. Otro aspecto que podría aumentar esta complejidad es la existencia de factores de riesgo ambientales y genéticos que se cree juegan un papel importante en la predisposición a la enfermedad (Simpson y Al-Chalabi 2006).

El restante 10 % de los pacientes evidencia alguna forma familiar con una clara herencia mendeliana que responde a mutaciones en una serie de genes, siendo los más relevantes *SOD1*, *FUS* y *TARDBP* (Gros-Louis *et al.* 2006; Valdmanis *et al.* 2009). Algunas de estas mutaciones se manifiestan fenotípicamente por un síndrome que es clínicamente indistinguible de la forma esporádica de ELA, por lo que se cree que ambas variantes deben compartir hasta cierto punto mecanismos patológicos.

## 2 - INTRODUCCIÓN

---

### 2.1.3 - Tratamiento

Si bien durante los últimos años se han producido grandes avances sobre la patofisiología de ELA -especialmente en lo que respecta a las variantes familiares- y se han ensayado numerosos protocolos clínicos en pacientes, no existen actualmente tratamientos efectivos para detener o retrasar significativamente la progresión de la enfermedad. La única droga aprobada en los Estados Unidos para el tratamiento de ELA es *riluzole*, un inhibidor de la liberación de glutamato, cuyo efecto sobre el avance de la enfermedad es tanto modesto como ampliamente discutido (Bensimon *et al.* 1994; Lacomblez *et al.* 1996).

### 2.1.4 - Mecanismos auto-inmunes

Existen numerosas evidencias que avalan la participación de los mecanismos auto-inmunes en la degeneración de las neuronas motoras en ELA. En primera instancia, se han encontrado desórdenes auto-inmunes en los pacientes con esta enfermedad (Appel *et al.* 1986) junto con auto-anticuerpos séricos contra gangliósidos (Pestronk *et al.* 1989), neurofilamentos (Couratier *et al.* 1998) y los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (CCDVs; Smith *et al.* 1992). Adicionalmente, se han detectado en muestras de los individuos afectados y en modelos animales, infiltrados espinales y corticales de células inflamatorias (Appel *et al.* 1986; Engelhardt y Appel 1990; Troost *et al.* 1990; Kawamata *et al.* 1992; Engelhardt *et al.* 1993; Alexianu *et al.* 2001; McGeer y McGeer 2002), así como también depósitos de IgGs en el retículo endoplásmico y en microtúbulos de motoneuronas (Engelhardt y Appel 1990; Engelhardt *et al.* 2005). Sin embargo, la presencia y relevancia de tales auto-anticuerpos ha sido y

## 2 - INTRODUCCIÓN

---

sigue siendo motivo de mucha controversia (Drachman y Kuncl 1989; Drachman *et al.* 1995; Arsac *et al.* 1996).

Por otro lado, se sabe que la inoculación de cobayos con homogenatos espinales de bovino lleva a la destrucción de las motoneuronas superiores e inferiores (Engelhardt *et al.* 1990; Xu *et al.* 2009), asemejándose hasta cierto punto a la variante humana de ELA en lo que respecta a la presencia de anticuerpos en las motoneuronas y células inflamatorias (Appel *et al.* 1991). También se observó que la transferencia pasiva de las IgGs provenientes de pacientes con ELA (Uchitel *et al.* 1992a) o de animales previamente inmunizados con las motoneuronas bovinas purificadas (Appel *et al.* 1991), inducía una disfunción neuromuscular en ratones inyectados. En este último caso, los anticuerpos humanos pudieron ser detectados en el soma de las neuronas motoras y en los terminales nerviosos (Fratantoni *et al.* 1996; Engelhardt *et al.* 2005).

En lo que respecta a estudios *in vitro*, se ha detectado la inducción de apoptosis por parte de las IgGs-ELA en cultivos de rodajas de médula espinal y en líneas celulares de motoneuronas, presumiblemente debido a un incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  (Demestre *et al.* 2005; Smith *et al.* 1994). A nivel de la placa neuromuscular (PNM), se observó que la pre-incubación de preparaciones de músculo con las IgGs-ELA estimulaba la actividad sináptica espontánea y asincrónica (Uchitel *et al.* 1988; Uchitel *et al.* 1992a; Pagani *et al.* 2006), el influjo de  $Ca^{2+}$  (Mosier *et al.* 1995) y la inducción de vías de señalización que llevaban a la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los depósitos intracelulares (Pagani *et al.* 2006). Este efecto modulador sobre la liberación espontánea de acetilcolina

## 2 - INTRODUCCIÓN

---

también ha sido detectado en ratones inyectados intraperitonealmente con IgGs-ELA (Muchnik *et al.* 2002).

### 2.2 - Sistema motor

Los movimientos, ya sean voluntarios o involuntarios, se producen por patrones espaciales y temporales de contracciones musculares orquestados por el cerebro y la médula espinal. Éstos involucran tanto los circuitos que posibilitan los movimientos reflejos elementales como aquellos que organizan los patrones intrincados de actividad neural responsables de las acciones motoras voluntarias más complicadas.

En última instancia, todos los movimientos producidos por la musculatura esquelética son inducidos por las motoneuronas inferiores de la médula espinal y el tallo cerebral, que inervan directamente dicha musculatura. Estas neuronas se encuentran controladas en forma directa por los circuitos locales dentro de la médula espinal y el tallo cerebral, que coordinan los grupos individuales de músculos. Las neuronas motoras inferiores también están sujetas a una regulación mayormente indirecta llevada a cabo por las motoneuronas superiores, que forman parte de los circuitos cerebrales más altos responsables de la coordinación de secuencias complejas de movimiento (Grillner y Wallen 1985). Otros circuitos de regulación motora especialmente importantes residen en los ganglios basales y el cerebelo, los cuales modulan a las motoneuronas superiores y así aseguran que los movimientos se realicen con una importante precisión temporal y espacial (DeLong y Strick 1974).

## 2 - INTRODUCCIÓN

---

Los circuitos neurales responsables del control del movimiento pueden ser divididos en cuatro sub-sistemas distintivos pero altamente interactivos (**Figura 2.1**), cada uno de los cuales realiza una contribución particular al control motor (Purves *et al.* 2004).

### 2.2.1 - Médula espinal

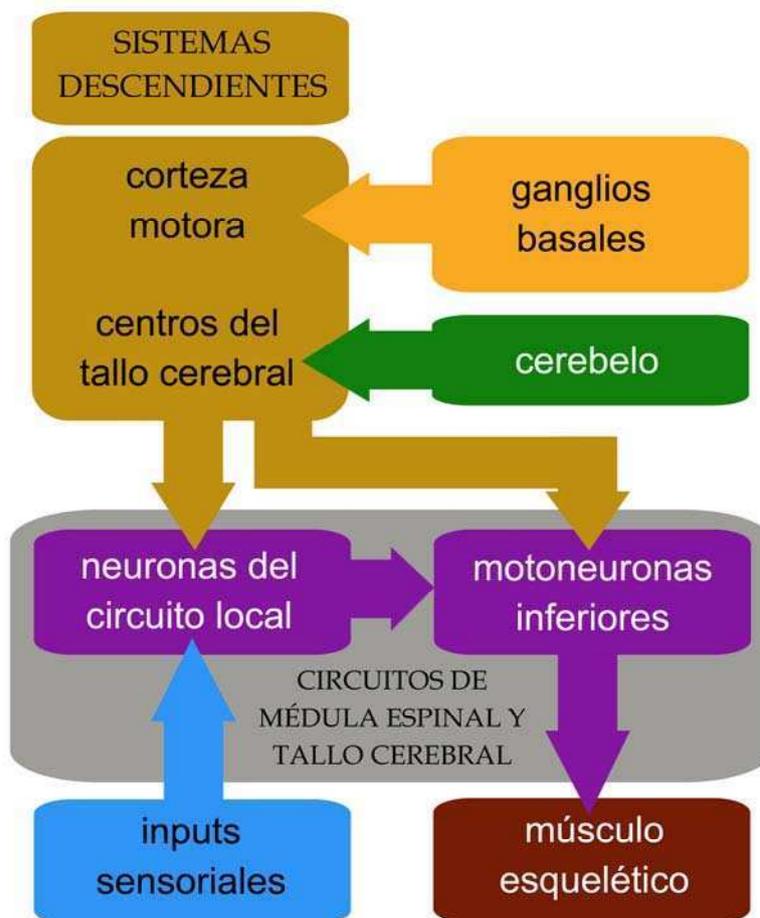
El primero de estos sub-sistemas está compuesto por el circuito local dentro de la materia gris de la médula espinal, junto con el circuito análogo ubicado en el tallo cerebral.

La médula espinal contiene una región central de sustancia gris formada en su mayoría por los cuerpos celulares de las neuronas que la constituyen, sumada a una región periférica de sustancia blanca constituida por los axones. Los somas de las motoneuronas residen en la parte ventral de la sustancia gris, también conocida como asta ventral (**Figura 2.2**).

Las células relevantes para el control motor son las motoneuronas inferiores (las cuales envían sus axones desde el tallo cerebral y la médula espinal hacia músculos esqueléticos de la cabeza y el cuerpo, respectivamente) y las neuronas del circuito local (las cuales comprenden la mayor fuente de *inputs* sinápticos para las motoneuronas inferiores).

Las neuronas motoras que inervan los músculos individuales se encuentran agrupadas en núcleos motores organizados en columnas longitudinales que abarcan varios segmentos espinales. Las motoneuronas que sinaptan con los músculos proximales se localizan medialmente en la médula espinal, mientras que las que inervan los músculos más distales se ubican en las regiones progresivamente más laterales.

## 2 - INTRODUCCIÓN

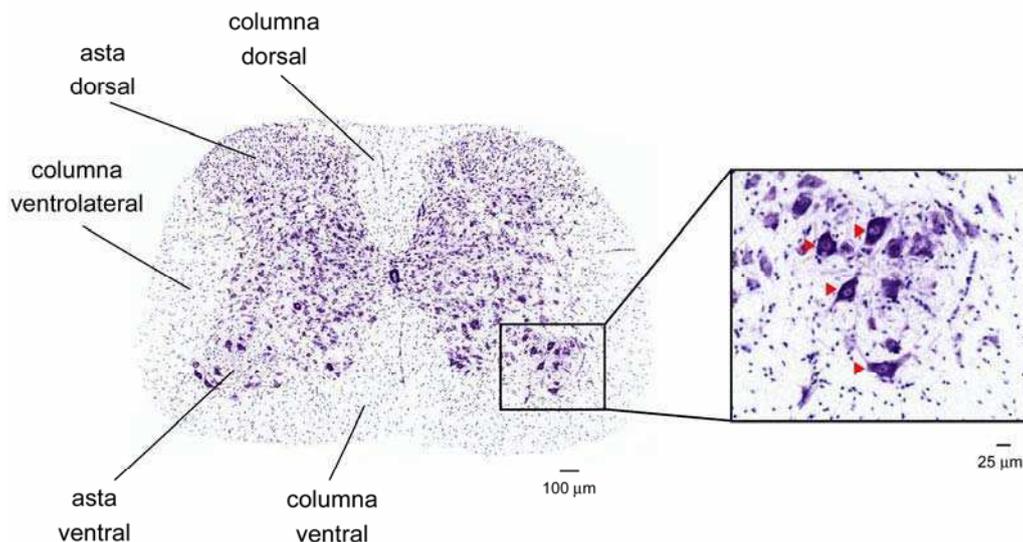


**Figura 2.1: Organización de las estructuras neurales involucradas en el control del movimiento.**

Los cuatro sub-sistemas que se muestran en el esquema (circuitos locales de la médula espinal y el tallo cerebral, vías modulatorias descendientes, ganglios basales y cerebelo) realizan aportes esenciales y distintivos al control de la actividad motora. Reproducido de Purves *et al.* 2004.

Toda la información para la generación del movimiento, ya sea reflejo o voluntario, es en última instancia transmitida hacia el músculo a través de la actividad de las neuronas motoras inferiores. Por su parte, las neuronas del circuito local reciben *inputs* sensoriales y proyecciones descendentes de centros neurales de mayor jerarquía. De esta manera, el circuito por ellos formado provee la coordinación entre diferentes grupos musculares necesaria para la generación de movimientos organizados.

## 2 - INTRODUCCIÓN



**Figura 2.2: Estructura interna de la médula espinal.**

Sección transversa de la médula espinal de ratón (P56, tinción de Nissl) mostrando las diferentes regiones que la componen como así también las motoneuronas inferiores (cabezas de flecha rojas). Imágenes extraídas de Allen Brain Atlas ([www.brain-map.org](http://www.brain-map.org)).

Desde el punto de vista morfológico, metabólico y molecular, las motoneuronas presentan una serie de características que las diferencian del modelo clásico de neurona. En primer lugar, las motoneuronas son células de gran tamaño, con un diámetro somático de entre 50 y 60  $\mu\text{m}$ , y procesos axonales considerablemente extensos, algunos de los cuales pueden llegar a medir hasta un metro en humanos. Como consecuencia de estas particularidades anatómicas, se presume que las motoneuronas poseen una elevada demanda de energía acoplada a una alta tasa metabólica, lo cual requiere de una elevada actividad mitocondrial para satisfacer estos requerimientos (Shaw y Eggett 2000).

Además, debido a la extensa red axonal que las caracteriza, las neuronas motoras precisan de una estructura citoesquelética importante,

## 2 - INTRODUCCIÓN

---

hecho que se ve reflejado en su alto contenido de neurofilamentos comparado con otros tipos neuronales (Williamson *et al.* 1998).

Otro aspecto importante es la elevada expresión de una versión del receptor de glutamato altamente permeable a  $\text{Ca}^{2+}$  (Carriedo *et al.* 1996). En consecuencia, las motoneuronas resultan particularmente vulnerables a la excitotoxicidad mediada por glutamato y su consecuente sobre-carga de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Por último, las neuronas motoras muestran tradicionalmente una baja expresión de proteínas *buffer* de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en el citoplasma, como parvalbúmina y calbindina (Alexianu *et al.* 1994). Estas y otras macromoléculas, junto con organelas como el retículo endoplásmico y la mitocondria, forman parte del sistema de regulación de  $\text{Ca}^{2+}$  que opera en forma constante para mantener niveles intracelulares bajos de este ión. De aquí se deduce que las motoneuronas tienen una capacidad de regulación de  $\text{Ca}^{2+}$  muy limitada y son considerablemente sensibles a cualquier proceso que induzca una acumulación excesiva de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula.

Se cree que todos estos factores contribuyen a la alta y selectiva vulnerabilidad que presentan este tipo de neuronas espinales a la injuria asociada a ELA, representando factores de riesgo importantes para los procesos patológicos involucrados en esta enfermedad.

### 2.2.2 - Corteza cerebral

El segundo sub-sistema motor está constituido por las neuronas motoras superiores que residen en el tallo y la corteza cerebral y cuyos axones descienden para sinaptar sobre las neuronas del circuito local o, más raramente, sobre las motoneuronas inferiores en forma directa.

## 2 - INTRODUCCIÓN

---

La corteza es la parte más superficial del encéfalo y representa la porción más grande de materia gris del cerebro. Posee una organización horizontal en capas (láminas) que contienen diferentes tipos de neuronas. El número de capas y su organización difieren según la región del cerebro que se trate y de esta manera dan lugar a la separación de la corteza en áreas funcionales (Nolte 2001). La mayoría de estas regiones está compuesta por hasta seis capas de células neuronales, partiendo de la más superficial (capa I) hacia la más interna (capa VI).

Las vías de las neuronas motoras superiores que se originan en la corteza cerebral son esenciales para la iniciación voluntaria de los movimientos y para la coordinación de los patrones complejos en los movimientos avanzados. En particular, las proyecciones descendentes de las áreas corticales del lóbulo frontal (corteza motora primaria, corteza premotora lateral y medial) son claves para la planificación, la iniciación y la dirección de una secuencia de movimientos voluntarios. Cada área proyecta directamente sobre la médula espinal a través del tracto corticoespinal, e indirectamente por medio de los sistemas motores del tallo cerebral.

Las neuronas motoras superiores ubicadas en el tallo cerebral son responsables de la regulación del tono muscular y de la orientación de los ojos, la cabeza y el cuerpo en base a la información sensorial que reciben (vestibular, somática, auditiva y visual). De esta manera, su contribución resulta crítica para los movimientos básicos de marcha y para el control de la postura (Purves *et al.* 2004).

La corteza de los humanos y otros mamíferos se encuentra estructurada en forma laminar, con cada lámina cortical presentando una serie de características funcionales y anatómicas distintivas. Las células

## 2 - INTRODUCCIÓN

---

piramidales de la capa cortical V de la corteza motora primaria -también conocidas como células de Betz- son las motoneuronas superiores.

### 2.2.3 - Cerebelo y ganglios basales

Los restantes sub-sistemas involucrados en el control motor son circuitos complejos que no tienen un acceso directo ni a las neuronas del circuito local ni a las motoneuronas inferiores. En su lugar, estas estructuras controlan el movimiento por regulación de la actividad de las neuronas motoras superiores.

Antes de que una señal motora descienda desde la corteza hacia el tallo cerebral y la médula espinal, varios centros corticales y sub-corticales (incluyendo los ganglios basales y el cerebelo) han ejercido su influencia sobre la corteza motora para dar forma a esa señal descendiente final. Tanto el cerebelo como los ganglios basales llevan a cabo esta regulación a través del tálamo, afectando de esta manera la actividad de las vías descendientes del tracto córtico-bulbar y córtico-espinal que se originan en las áreas motoras y pre-motoras (Groenewegen 2003).

El más grande de estos sub-sistemas es el cerebelo, el cual se encuentra ubicado sobre la cara dorsal de la protuberancia. El cerebelo actúa a través de vías eferentes hacia las motoneuronas superiores detectando la diferencia entre las órdenes motoras descendentes y la acción motora resultante, también conocida como "error motor". El cerebelo usa esta información sobre discrepancias para efectuar reducciones en tiempo real y a largo plazo en estos errores motores y de esta manera mejorar la agudeza de los movimientos.

## 2 - INTRODUCCIÓN

---

El último de los sub-sistemas motores está compuesto por un grupo de estructuras, conocidas colectivamente como ganglios basales, que se encuentran embebidas en las zonas más profundas del cerebro anterior. Entre estas regiones sub-corticales se puede mencionar el estriado, el globo pálido, el núcleo sub-talámico y la sustancia nigra. Los ganglios basales suprimen los movimientos no deseados y preparan a los circuitos de motoneuronas superiores para la iniciación de una acción motora. Los ganglios basales reciben *inputs* de todas las áreas corticales y proyectan a través del tálamo a regiones de la corteza frontal relacionadas con la planificación de los movimientos (Purves *et al.* 2004).

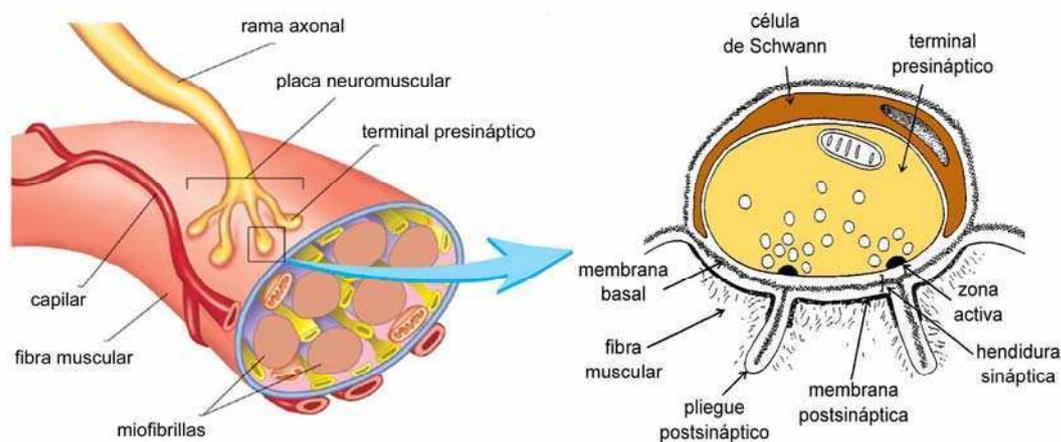
### 2.3 - Unión neuromuscular

El axón de la neurona motora se divide en la zona cercana al músculo y emite entre 20 y 100 ramificaciones, cada una de las cuales inerva una fibra muscular individual. El conjunto formado por el terminal motor y todas las fibras musculares por él contactadas se denomina unidad motora (Purves *et al.* 2004).

#### 2.3.1 - Estructura de la unión neuromuscular

La unión o PNM de vertebrados (**Figura 2.3**) se encuentra formada por regiones específicas de tres tipos celulares distintivos: la neurona motora (componente pre-sináptico), la fibra muscular (componente post-sináptico) y la célula de Schwann (Ogata 1988). La principal característica de esta estructura es la alta especialización de las porciones sinápticas de dichos tipos celulares, ya que contienen un gran número de organelas y moléculas,

## 2 - INTRODUCCIÓN



**Figura 2.3: Estructura de la placa neuromuscular de vertebrados.**

En el esquema se muestra un terminal motor inervando una fibra muscular. A la derecha se observa un terminal cortado en forma transversal. Cada placa neuromuscular consiste en el terminal nervioso presináptico desde donde se libera el neurotransmisor (acetilcolina), la hendidura sináptica, el área post-sináptica en el músculo conteniendo el receptor de acetilcolina y la envoltura de la célula de Schwann. Imagen extraída de Sanes y Lichtman 1999 y [http://www.biologycorner.com/anatomy/muscles/notes\\_muscles.html](http://www.biologycorner.com/anatomy/muscles/notes_muscles.html).

que a su vez se encuentran poco representadas en las regiones extra-sinápticas.

El terminal nervioso motor se encuentra especializado en el proceso de liberación. El mismo posee numerosas vesículas sinápticas (de aproximadamente 50 nm de diámetro) conteniendo el neurotransmisor, acetilcolina, junto con una alta densidad de mitocondrias, las cuales proveen la energía necesaria para la síntesis y la liberación del neurotransmisor. El agrupamiento de las vesículas sinápticas en la mitad del terminal que está en contacto con la fibra muscular refuerza la idea de polarización de esta estructura. La mayoría de las vesículas sinápticas se localizan en determinadas regiones de la membrana pre-sináptica conocidas como zonas activas, en las cuales las vesículas se fusionan con la

## 2 - INTRODUCCIÓN

---

membrana del terminal y liberan su contenido hacia la hendidura sináptica. Por su parte, las porciones pre-terminales poseen un escaso número de vesículas y mitocondrias junto con una ausencia de zonas activas, pero se encuentran enriquecidas en microtúbulos y neurofilamentos (Yee *et al.* 1988).

La membrana post-sináptica se especializa en responder de una manera rápida y eficiente a la liberación del neurotransmisor desde el terminal nervioso. Por debajo del terminal sináptico la membrana muscular posee ligeras depresiones e invaginaciones más marcadas que componen los pliegues post-sinápticos, los cuales se ubican en forma directamente opuesta a las zonas activas y se adentran en la fibra muscular una distancia de hasta 1  $\mu\text{m}$ . En las crestas de dichos pliegues hay una alta concentración de receptores de acetilcolina (más de 10.000 moléculas/ $\mu\text{m}^2$ ), la cual decae en forma acentuada (a aproximadamente 10 moléculas/ $\mu\text{m}^2$ ) en las regiones extra-sinápticas (Salpeter *et al.* 1988). Desde su parte citoplasmática el receptor de acetilcolina se encuentra asociado a un complejo aparato citoesqueletario que genera y mantiene dicha distribución diferencial.

La célula de Schwann que rodea al terminal motor cumple la función de aislarlo del medio extracelular y proveer factores tróficos. Además, presenta características morfológicas y bioquímicas que la distinguen del otro tipo de célula de Schwann reportado, el productor de la vaina de mielina que recubre el axón motor desde el soma neuronal hasta la zona pre-terminal (Mirsky y Jessen 1996).

Otro componente importante de la PNM es la denominada lámina basal. Dicha estructura se extiende a lo largo del espacio entre la fibra

## 2 - INTRODUCCIÓN

---

muscular y el terminal sináptico, y se proyecta hacia el interior de los pliegues post-sinápticos. De esta manera, forma parte de una fracción importante de la hendidura sináptica presente en la PNM. Los componentes mayoritarios de la lámina basal del músculo son similares a los encontrados en la lámina basal de otras zonas del cuerpo: colágeno IV, laminina, entactina y proteoglicanos. Sin embargo, las porciones sinápticas y extra-sinápticas de la lámina basal expresan isoformas particulares. La lámina basal también contiene una isoforma de acetilcolinesterasa (la enzima responsable de la degradación del neurotransmisor) anclada a colágeno, glicoconjugados y proteínas de señalización como agrina y neuregulina (Sanes y Lichtman 1999).

Desde el punto de vista inmunológico, un aspecto importante a tener en cuenta es que la PNM es el único componente del sistema motor que se encuentra por fuera de la barrera hemato-encefálica. De esta manera, el terminal motor constituye una estructura particularmente vulnerable a la acción del sistema inmune y sus anticuerpos, representando un blanco temprano en diversas enfermedades auto-inmunes (Lang y Vincent 2009).

### 2.3.2 - *Transmisión sináptica neuromuscular*

La llegada del impulso nervioso (potencial de acción) al terminal del axón motor genera un cambio en el potencial de membrana celular (despolarización) que induce la apertura de los CCDVs. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al terminal a través de estos canales inicia un proceso complejo que culmina con la fusión de las vesículas sinápticas a la membrana celular y la posterior liberación de acetilcolina hacia la hendidura sináptica (Purves *et al.* 2004). Este proceso se conoce con el nombre de exocitosis.

## 2 - INTRODUCCIÓN

---

Una vez liberado, el neurotransmisor difunde a través de la hendidura sináptica e interactúa con el receptor de acetilcolina en la membrana post-sináptica. Dicha interacción promueve el influjo de sodio a través del receptor y de esta manera induce una despolarización en la zona de la PNM conocida como potencial de placa evocado (Takeuchi y Takeuchi 1960). Esta despolarización activa a los canales de sodio dependientes de voltaje presentes en la base de los pliegues post-sinápticos de la fibra muscular (Flucher y Daniels 1989) e inicia una potencial de acción propagado que culmina en la contracción del músculo (Aidley 1989).

### *2.3.3 - Liberación espontánea de neurotransmisor*

En todas las sinapsis químicas, la comunicación entre células se encuentra mediada por la liberación controlada de neurotransmisor en respuesta a la llegada de un potencial de acción. Sin embargo, en ausencia de estimulación neuronal, la liberación de neurotransmisor todavía puede ocurrir de manera espontánea, como fue demostrado por primera vez en experimentos realizados en la PNM (Fatt y Katz 1952).

Los potenciales de placa miniatura (MEPPs) o “minis” que se registran en ausencia de impulsos nerviosos, representan la fusión de una única vesícula sináptica con el terminal presináptico, liberando de esta manera una cantidad de neurotransmisor conocida como cuanto. En la PNM, estas respuestas pueden observarse como una despolarización de pequeña amplitud en la fibra muscular y con una frecuencia de unos pocos a varias decenas de eventos por minuto.

Se sabe que este proceso se encuentra estrechamente regulado por el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, al igual que por el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Hubbard et

## 2 - INTRODUCCIÓN

---

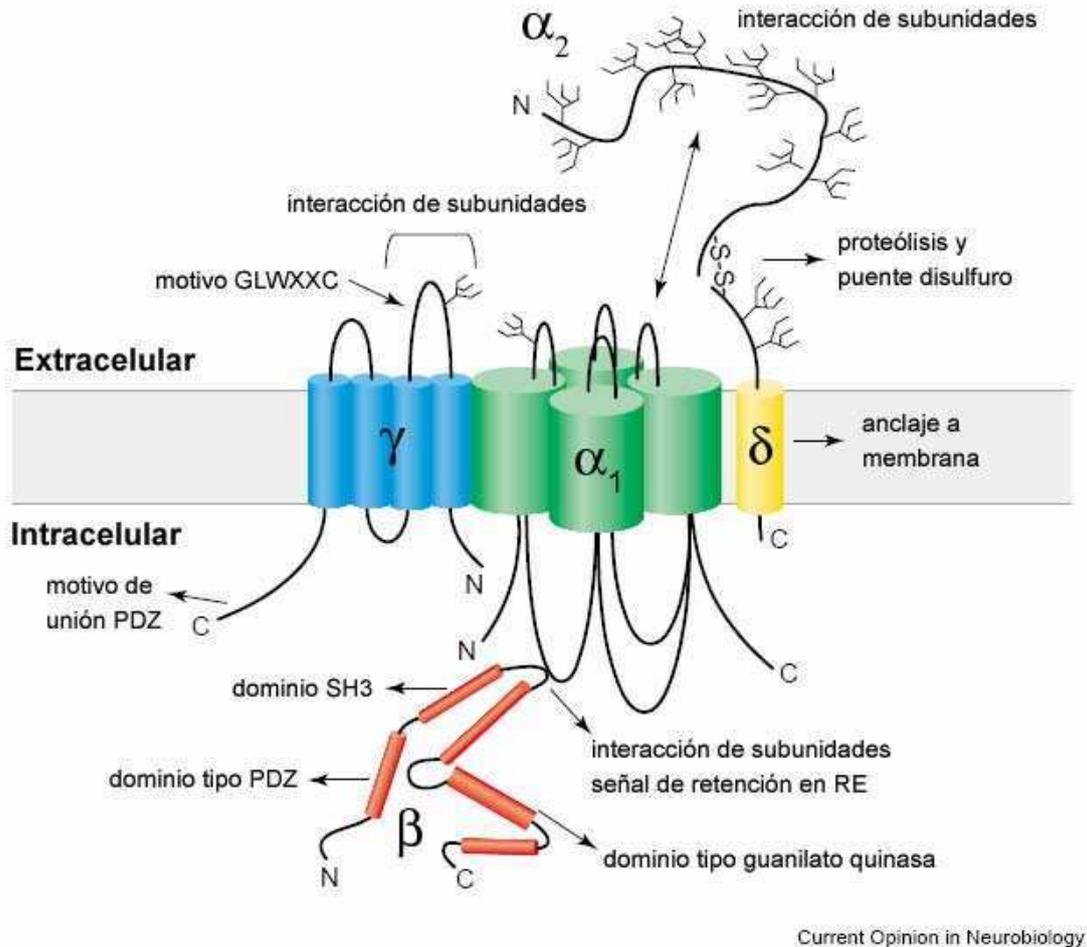
*al.* 1968; Llano *et al.* 2000; Angleson y Betz 2001), presentando una dependencia a este ión prácticamente lineal (Lou *et al.* 2005; Sun *et al.* 2007). Por lo tanto, se deduce que un aumento en la frecuencia de liberación basal de acetilcolina es un reflejo del incremento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto también implica que cualquier estímulo despolarizante que active a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje, como una solución de alto potasio, promoverá la liberación espontánea (Takeuchi y Takeuchi 1961). También se ha encontrado que este tipo de liberación posee un componente independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Katz *et al.* 1996; Losavio y Muchnick 1997).

En términos generales, evidencias recientes sugieren que la liberación espontánea de neurotransmisor jugaría un rol importante en la maduración y estabilidad de las redes sinápticas y en la regulación de la síntesis de proteínas dendríticas (Chung y Kavalali 2006; Wasser y Kavalali 2009).

### 2.4 - Canales de $\text{Ca}^{2+}$ dependientes de voltaje

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (CCDVs) comprenden una familia de proteínas transmembrana que controlan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a una despolarización de la membrana plasmática y regulan procesos como la contracción muscular, la secreción vesicular, la neurotransmisión y la expresión génica (Catterall 2000). Cada canal está formado por un complejo multimérico que incluye a las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\alpha_2\delta$  (**Figura 2.4**; Arikath y Campbell 2003; Catterall *et al.* 2005).

## 2 - INTRODUCCIÓN



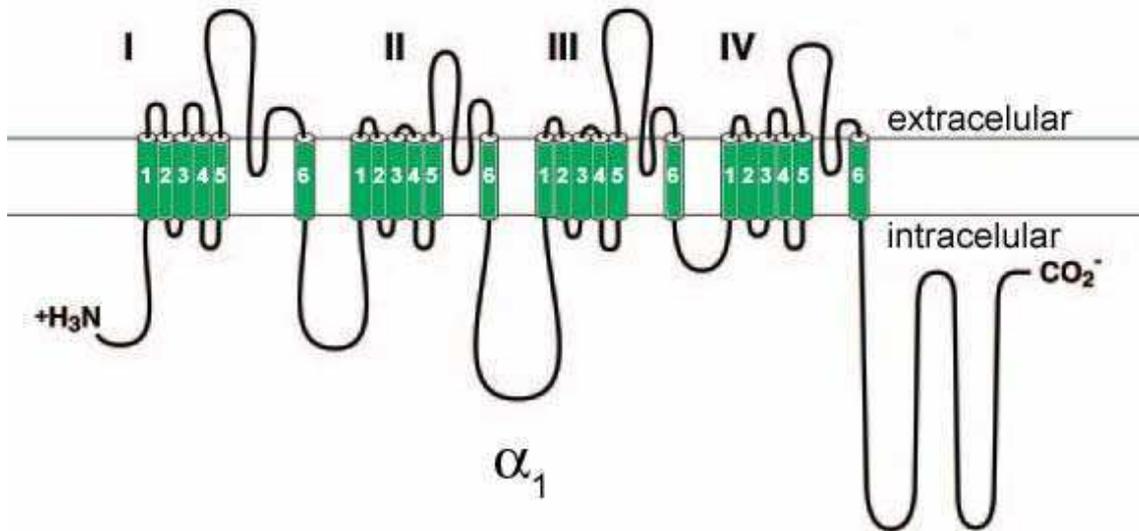
Current Opinion in Neurobiology

### Figura 2.4: Topología de membrana, interacción de subunidades y dominios estructurales de los CCDVs.

Los CCDVs están compuestos por la subunidad  $\alpha_1$  formadora del poro y las subunidades accesorias  $\alpha_2$ ,  $\delta$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Los componentes  $\alpha_2$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  poseen dominios transmembranales, mientras que la subunidad  $\beta$  es estrictamente intracelular. Las tres subunidades accesorias interactúan directamente con la subunidad  $\alpha_1$ , mientras que no se han reportado interacciones entre las subunidades accesorias. Modificado de Arikath y Campbell 2003.

La subunidad  $\alpha_1$  es el polipéptido más grande de los que componen el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (190-250 kDa) y comprende estructuras como el poro de conducción, los sensores de voltaje y el aparato de apertura, al igual que la mayoría de los sitios conocidos de regulación de la actividad por segundos mensajeros, drogas y toxinas. Por este motivo, es la subunidad que determina en mayor medida las propiedades biofísicas y farmacológicas del canal (Dolphin 2009). La subunidad  $\alpha_1$  (Figura 2.5) está formada por

## 2 - INTRODUCCIÓN



**Figura 2.5: Estructura de la subunidad  $\alpha_1$ .**

En el diagrama se representan los cuatro dominios transmembrana homólogos (I-IV) así como también los seis segmentos S que componen cada dominio de la subunidad  $\alpha_1$  (1-6). Modificado de Catterall *et al.* 2005.

alrededor de 2000 aminoácidos organizados en cuatro dominios homólogos (dominios I-IV). Cada dominio consiste en seis  $\alpha$  hélices transmembrana ( $S_1$  a  $S_6$ ) y un *loop* entre los segmentos  $S_5$  y  $S_6$  asociado a la membrana. Los segmentos  $S_1$  a  $S_4$  conforman el módulo responsable de sensor el voltaje, mientras que los segmentos  $S_5$ ,  $S_6$  y el *loop* ubicado entre ellos componen el poro propiamente dicho. Los grandes segmentos intracelulares del canal funcionan como plataforma de señalización para la regulación de la neurotransmisión dependiente de  $Ca^{2+}$  (Catterall y Few 2008).

La subunidad  $\beta$  es una proteína hidrofílica de 50-65 kDa y es el único componente del canal que es completamente intracelular. Por su parte, el complejo  $\alpha_2\delta$  es codificado por un único gen cuyo producto es clivado post-traduccionalmente pero permanece unido por puentes disulfuro dando lugar a la proteína madura. Una tercera subunidad accesoria -conocida como  $\gamma$ - está compuesta por cuatro segmentos transmembrana y está

## 2 - INTRODUCCIÓN

---

presente tanto en músculo esquelético como en corazón y cerebro (Catterall y Few 2008).

Las subunidades accesorias tienen una influencia importante en la función del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Dolphin 2003; Hofmann *et al.* 1999). La subunidad  $\beta$  aumenta de manera importante la expresión de la subunidad  $\alpha_1$  en la membrana plasmática y modifica la cinética del canal así como también la dependencia de la activación e inactivación con el voltaje (Catterall y Few 2008). El complejo  $\alpha_2\delta$  también incrementa la expresión de la subunidad  $\alpha_1$  en la membrana, pero tiene efectos menores y menos consistentes sobre la cinética y la dependencia de la apertura del canal con el voltaje (Davies *et al.* 2007). En términos generales la subunidad  $\gamma$  no influencia la expresión del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana, salvo en algunos casos donde provoca una marcada reducción en el número de moléculas en membrana. El rol funcional de la subunidad  $\gamma$  no se encuentra bien definido, aunque se cree que participa en la modulación de las propiedades biofísicas del canal (Arikkath y Campbell 2003).

A pesar de que las subunidades accesorias modulan las propiedades funcionales de los complejos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , la diversidad farmacológica y fisiológica de estos canales se debe en mayor medida a la existencia de múltiples subunidades  $\alpha_1$  (Catterall y Few 2008).

Una amplia serie de isoformas han sido reportadas para la subunidad  $\alpha_1$ , las cuales provienen tanto de la transcripción de numerosos genes como del *splicing* alternativo de los mismos. La combinación de estas diferentes variantes posibilita la formación de canales con diversas propiedades biofísicas y farmacológicas, según se puede observar en la **Tabla 2.1**. Las corrientes L, P/Q, N y R se clasifican como corrientes de alto voltaje de

## 2 - INTRODUCCIÓN

**Tabla 2.1: Función farmacológica y fisiológica de los CCDVs\*.**

corriente	subunidad $\alpha_1$		localización	bloqueantes específicos	función celular
	nomenclatura antigua	nomenclatura actual			
L	$\alpha_{1S}$	Cav1.1	músculo esquelético, túbulos transversos	dihidropiridinas, fenilalquilaminas, benzotiazepinas	acoplamiento excitación-contracción
	$\alpha_{1C}$	Cav1.2	miocitos cardíacos, miocitos del músculo liso, células endócrinas, cuerpos neuronales, dendritas proximales		acoplamiento excitación-contracción, liberación hormonal, regulación de la transcripción, integración sináptica
	$\alpha_{1D}$	Cav1.3	cuerpos neuronales, dendritas proximales, células endócrinas, miocitos del atrio cardíaco y células marcapaso, células de la cóclea		liberación hormonal, regulación de la transcripción, integración sináptica, marcapaso cardíaco, audición, liberación de neurotransmisores de células sensoriales
	$\alpha_{1F}$	Cav1.4	células bipolares y bastones retinales, médula espinal, glándula adrenal, mastocitos		liberación de neurotransmisores de fotorreceptores
P/Q	$\alpha_{1A}$	Cav2.1	terminales nerviosos y dendritas, células neuroendócrinas	$\omega$ -Agatoxina IVA	liberación de neurotransmisores, transientes de $Ca^{2+}$ dendrítico, liberación hormonal
N	$\alpha_{1B}$	Cav2.2	terminales nerviosos y dendritas, células neuroendócrinas	$\omega$ -Conotoxina GVIA	liberación del neurotransmisor, transientes de $Ca^{2+}$ dendrítico, liberación hormonal
R	$\alpha_{1E}$	Cav2.3	cuerpos celulares neuronales y dendritas	SNX-482	disparos repetitivos, transientes de $Ca^{2+}$ dendrítico
T	$\alpha_{1G}$	Cav3.1	cuerpos neuronales y dendritas, miocitos del músculo liso y cardíaco	Mibefradil	marcapasos, disparos repetitivos
	$\alpha_{1H}$	Cav3.2	cuerpos neuronales y dendritas, miocitos del músculo liso y cardíaco		marcapasos, disparos repetitivos
	$\alpha_{1I}$	Cav3.3	cuerpos neuronales y dendritas		marcapasos, disparos repetitivos

\* Información extraída de Brogden y Markham 1997, Strock y Diverse-Pierluissi 2004 y Catterall *et al.* 2005.

activación -dado el requerimiento de estímulos despolarizantes fuertes para la apertura del canal- mientras que las T se conocen como corrientes de bajo voltaje de activación.

Tanto en la PNM de los mamíferos como en las sinapsis del sistema nervioso central, la liberación evocada de neurotransmisores en respuesta al influjo de  $Ca^{2+}$  se encuentra mediada principalmente por los CCDVs de tipo P/Q (Protti *et al.* 1991; Llinas *et al.* 1992; Uchitel *et al.* 1992b; Katz *et al.* 1997; Iwasaki y Takahashi 1998). De esta manera, las señales de  $Ca^{2+}$

## 2 - INTRODUCCIÓN

---

generadas por los canales gatillan la transmisión sináptica a través de un control de la fusión de vesículas con la membrana plasmática de los terminales nerviosos. Por otro lado, se ha encontrado que la actividad de los canales de tipo N es crítica para la transmisión sináptica durante los estadios más tempranos del desarrollo y en animales que carecen de la subunidad  $Ca_v2.1$  (Rosato Siri y Uchitel 1999; Urbano *et al.* 2003). En lo que respecta al canal de tipo L, se ha sugerido que su presencia en la PNM (Urbano y Uchitel 1999) podría modular el reciclado rápido de las vesículas conteniendo acetilcolina (Perissinotti *et al.* 2008).

# Objetivos



### 3 - OBJETIVOS

---

Nuestra investigación se encuentra orientada a dilucidar los mecanismos de acción de los anticuerpos de ELA positivos (IgGs-ELA), es decir, las IgGs capaces de unirse a la PNM e inducir una potenciación sináptica.

En el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar si las IgGs-ELA tienen la capacidad de interactuar con la PNM del músculo diafragma de ratón y modular su frecuencia espontánea de liberación de acetilcolina.
- Estudiar la reactividad de las IgGs-ELA hacia otras estructuras neurales relevantes para la patología de la enfermedad, como la médula espinal, la corteza cerebral y el cerebelo.
- Dilucidar el rol que juegan los canales de calcio en esta interacción, para lo cual se procedió a:
  - Evaluar la reactividad y funcionalidad de los anticuerpos en un modelo de ausencia del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q y otro de ausencia del canal de tipo N.
  - Analizar posibles interacciones entre las IgGs-ELA y el canal de tipo P/Q, así como también con otras proteínas presentes en los terminales sinápticos.
  - Investigar los posibles cambios en la expresión de proteínas sinápticas en dicho modelo de delección del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q.

# Materiales y Métodos



### 4.1 - Materiales

#### 4.1.1 - Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico y adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), salvo indicación contraria. El detalle de los anticuerpos empleados se muestra en la **Tabla 4.1**. Las columnas de agarosa-proteína G HiTrap fueron obtenidas de GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suiza).

Para preparar todas las soluciones se utilizó agua ultrapura de calidad milli-Q, con una resistencia cercana a 18 MΩ.cm, obtenida a partir de un deionizador Barnstead (Thermo Scientific, USA). Las soluciones madre de las drogas fueron preparadas con agua para cromatografía iónica (Sigma-Aldrich, USA).

#### 4.1.2 - Líneas de ratones

Para todos los experimentos, el tejido fue extraído de los animales correspondientes a tres líneas murinas diferentes: Swiss (machos, P> 30), línea carente de Ca<sub>v</sub>2.1 sv129 (machos y hembras, P16-P23) y línea carente de Ca<sub>v</sub>2.2 C57BL/6 (machos, P18). Los animales de estas últimas dos líneas fueron donados por el Dr. Shin Hee-Sup, del Instituto Coreano de Ciencia y Tecnología (Seul, República de Corea). Los ratones de la línea Swiss fueron adquiridos en el bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

## 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 4.1: Información sobre los anticuerpos empleados en este trabajo.**

Anticuerpo	Especie productora	Empresa/ Laboratorio (país de origen)	Nº catálogo	Dilución utilizada
Anti-Ca <sub>v</sub> 2.1	conejo	Laboratorio Dr. Snutch (Canadá)	BC229	1:10.000
Anti-GAD <sup>65/67</sup>	conejo	Sigma (USA)	G5163	1:500
Anti-GFAP	conejo	Sigma (USA)	G9269	1:500
Anti-NeuN	ratón	Millipore (USA)	MAB377	1:500
Anti-sinaptofisina	ratón	Sigma (USA)	S5768	1:400
Anti-sinaptotagmina I	conejo	Alomone (Israel)	ANR-003	1:500
Anti-sinaptobrevina II	ratón	Laboratorio Dr. Jahn (Alemania)	CL69.1	1:500
Anti-sintaxina 1A	conejo	Synaptic Systems (Alemania)	110302	1:1.000
Anti-IgG <sub>humano</sub> -FITC	cabra	Cappel (Países Bajos)	1201-0081	1:2.000
Anti-IgG <sub>conejo</sub> -TMR	cabra	Molecular Probes (USA)	T2769	1:1000
Anti-IgG <sub>ratón</sub> -TMR	cabra	Sigma (USA)	T5393	1:100
Anti-IgG <sub>humano</sub> -HRP	cabra	Santa Cruz Biotechnology (USA)	sc-2453	1:1.000
Anti-IgG <sub>ratón</sub> -HRP	burro	Santa Cruz Biotechnology (USA)	sc-2314	1:1.000
Anti-IgG <sub>conejo</sub> -HRP	cabra	Santa Cruz Biotechnology (USA)	sc-2004	1:1.000

### 4.1.3 - Muestras de suero humano

Los pacientes fueron diagnosticados con ELA esporádica de acuerdo al criterio de El Escorial (Brooks, 1994). Todos los individuos participantes dieron su consentimiento escrito para formar parte del estudio y el protocolo aplicado fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional del Hospital Británico de Buenos Aires.

La edad al momento del diagnóstico se encontraba comprendida en el rango de 59 a 76 años (promedio: 64,6 años), con una proporción de sexos de 6:2 (H:M). Seis pacientes evidenciaron un comienzo espinal de la patología, mientras que el resto mostró un inicio bulbar. Todos los parámetros clínicos evaluados en cada paciente con ELA (Escala Funcional, Escala Norris, Escala Ashworth, Escala MRC) presentaron valores similares

## 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

(**Tabla 4.2**). La exclusión de formas genéticas de la enfermedad se basó en la historia familiar de cada paciente.

Los controles enfermos (CE; n = 7; 4 mujeres; edad promedio: 56,0 años) comprendieron personas con el síndrome miasténico de Lambert-Eaton (un desorden auto-inmune contra CCDVs, CE1), miastenia gravis (una enfermedad auto-inmune contra los receptores de acetilcolina, CE2), síndrome de Charcot-Marie-Tooth (enfermedad de motoneurona puramente genética que involucra la destrucción de la vaina de mielina, CE3), formas familiares de ELA (CE4-6) y neuropatía motora multifocal con bloqueo de la conducción (enfermedad auto-inmune contra la vaina de mielina, CE7).

Los controles sanos (CS; n = 3; 2 mujeres; edad promedio: 36,7 años) incluyeron sujetos sin ninguna evidencia de enfermedad neurológica.

Las muestras de sangre fueron colectadas al momento de realizar la evaluación clínica. El suero fue separado por centrifugación y conservado a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

### 4.2 - Métodos

#### 4.2.1 - Manejo de animales

Los ratones fueron tratados de acuerdo a las guías nacionales para el trato humano de los animales de laboratorio de la Universidad de Buenos Aires, las cuales son comparables con las de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de Estados Unidos. Se realizaron todos los esfuerzos posibles para reducir el número de animales utilizados, así como también su sufrimiento.

## 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 4.2: Parámetros clínicos de los pacientes con ELA esporádica incluidos en el estudio.**

Paciente	Edad (años)	Sexo	ELA	CFV	Escalas				Tasa de progresión <sup>5</sup>	Tiempo de progresión (meses)
					EF <sup>1</sup>	MRC <sup>2</sup>	Norris <sup>3</sup>	Ashworth <sup>4</sup>		
ELA1	66	M	D	A	22	136	49	7	4,50	4
ELA2	70	F	D	N	ND	ND	ND	ND	ND	12
ELA3	67	M	D	N	33	149,5	68	1	0,58	12
ELA4	62	M	Pr	A	32	174	82	7	0,44	18
ELA5	70	F	D	N	30	ND	66	5	0,33	30
ELA6	77	M	Ps	A	35	162	67	3	0,08	60
ELA7	59	M	D	N	31	154,5	80	5	0,50	18
ELA8	67	M	D	N	28	138	61	9	0,50	24

Abreviaturas M: masculino, F: femenino, D: definido, Pr: probable, Ps: posible, CFV: capacidad de fuerza vital, A: anormal, N: normal, EF: escala funcional (en inglés, ALSFR), ND: no disponible, MRC: escala para fuerza muscular.

<sup>1</sup> Rango: 0 a 40 (normal)

<sup>2</sup> Rango: 0 a 190 (normal)

<sup>3</sup> Rango: 0 a 99 (normal)

<sup>4</sup> Rango: 0 (normal) a 36

<sup>5</sup> Calculada con los valores de EF de la siguiente manera: 
$$\frac{40 - EF}{t_{progresión} \text{ (meses)}}$$

### 4.2.2 - Genotipado de ratones

La determinación del genotipo de los animales se llevó a cabo mediante la técnica de PCR multiplex (Opticon Cyclor, MJ Research, USA), partiendo de material colectado por biopsias. Las muestras de ADN fueron purificadas con el kit DNeasy Tissue (Qiagen Inc., Valencia, California, USA) luego de la digestión del tejido con proteinasa K (2 mg/mL) durante 15 h a 56 °C.

A continuación se detalla la secuencia de los primers utilizados:

Ca<sub>v</sub>2.1 *forward*: 5' -CCAGCTTGAGTGGCCGCAGCACACG-3'

Ca<sub>v</sub>2.1<sup>+/+</sup> *reverse*: 5' -ATAATAAGTCACCTCTGGTTCTAAAG-3'

Ca<sub>v</sub>2.1<sup>-/-</sup> *reverse*: 5' -CTGACTAGGGGAGGAGTAGAAG-3'

Ca<sub>v</sub>2.2 *forward*: 5' -TGGCACCTTATGCCTTGCACGGTGCCTGCG-3'

Ca<sub>v</sub>2.2<sup>+/+</sup> *reverse*: 5' -GGTCGAGATGGCTTGCGGGACCCGTTGGGA-3'

Ca<sub>v</sub>2.2<sup>-/-</sup> *reverse*: 5' -GCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAAT-3'

El protocolo de amplificación empleado fue el siguiente:

Genotipado de  $Ca_v2.1$ :

- 95 °C 3 min
- 95 °C 30 seg, 55 °C 30 seg, 72 °C 30 seg (35 ciclos)
- 72 °C 5 min

Genotipado de  $Ca_v2.2$ :

- 94 °C 2 min
- 94 °C 20 seg, 58 °C 20 seg, 72 °C 40 seg (35 ciclos)
- 72 °C 7 min

Los productos de PCR fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa (1 % p/v) conteniendo bromuro de etidio (1  $\mu$ g/mL). Las bandas fueron analizadas de acuerdo a su tamaño esperado: 240 pb para  $Ca_v2.1^{+/+}$ , 390 pb para  $Ca_v2.1^{-/-}$ , 460 pb para  $Ca_v2.2^{+/+}$  y 580 pb para  $Ca_v2.2^{-/-}$ . Para estimar dicho tamaño se empleó el marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

### 4.2.3 - Purificación de Inmunoglobulinas G

Todos los procedimientos fueron realizados a 4 °C. Las muestras de suero fueron centrifugadas a 12.000 g durante 10 min y el sobrenadante se sometió a un fraccionamiento con sulfato de amonio hasta una concentración final de 50 % p/v. La solución fue mantenida bajo agitación durante 60 min y luego centrifugada a 12.000 g durante 30 min. El pellet resultante se resuspendió en *buffer* fosfato de sodio 20 mM pH 7 y

## 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

posteriormente se dializó contra la misma solución durante 16 h empleando una membrana de celulosa de 12 kDa de poro.

El aislamiento de las IgGs se llevó a cabo por medio de una cromatografía de afinidad con una columna de Proteína G-agarosa y *buffer* fosfato 20 mM como agente de lavado. Los anticuerpos fueron eluidos con glicina 0,1 M pH 2,7 y la acidez neutralizada con Tris-HCl 1 M pH 9. Las fracciones aisladas fueron dializadas contra el *buffer* fosfato salino (PBS; *buffer* fosfato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 3 mM) pH 7,4 durante 5 h.

La concentración de las IgGs fue estimada por el análisis de absorbancia de los eluidos a 280 nm, teniendo en cuenta la absorptividad molar de las IgGs humanas.

El chequeo de las fracciones purificadas se realizó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y posterior tinción del gel con azul de Coomassie. Las alícuotas fueron conservadas a -20 °C.

### 4.2.4 - Ensayo de ELISA

Para la cuantificación de las IgGs de las muestras de suero se utilizó un ensayo de ELISA *sandwich* (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) y se realizó la cobertura con el anticuerpo de captura (anti-IgG<sub>humano</sub>) durante 15 h a 4 °C. Las muestras y el patrón se diluyeron en Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 140 mM, BSA 1% p/v y Tween-20 0,05 % v/v. El anticuerpo de detección (acoplado a peroxidasa de rábano) fue utilizado a una dilución 1:10.000 y como sustrato para la medición de actividad se empleó o-fenilendiamina (OPD) a una

## 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

concentración de 0,5 mg/mL, junto con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03 % v/v. Luego de una incubación a temperatura ambiente durante 30 min, se realizó la lectura de la absorbancia a 450 nm.

La estimación de la concentración de las IgGs se llevó a cabo -de acuerdo a la sugerencia del proveedor- por ajuste de los datos a una curva logística de cuatro parámetros, previa transformación de las concentraciones a escala logarítmica, por medio del software SigmaPlot 10 (Systat Software Inc., Chicago, Illinois, USA).

### 4.2.5 - Registros intracelulares

Los ratones fueron anestesiados con una sobredosis intraperitoneal de tribromoetanol 2 % (0,3 mL/10 g peso), exsanguinados por la vena yugular y eutanizados por decapitación. La disección del músculo diafragma se llevó a cabo en cajas de Petri cubiertas con Sylgard (Dow Corning, Midland, Michigan, USA) conteniendo solución normal de Ringer (RN; NaCl 137 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 12 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mM y glucosa 11 mM, pH 7,2-7,4), burbujeada continuamente con O<sub>2</sub> 95 %/ CO<sub>2</sub> 5 %.

Todos los procedimientos fueron realizados a temperatura ambiente (20-23 °C), salvo indicación contraria. Algunos de estos experimentos fueron realizados en colaboración con Lucas Vattino.

La preparación de nervio frénico-diafragma fue colocada en una cámara de registro (volumen: 1 mL) e incubada con las IgGs purificadas de pacientes o controles sanos durante 4 h en una atmósfera humidificada. Los anticuerpos fueron diluidos en RN hasta una concentración final de 0,4

## 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

mg/mL. Para testear el efecto de las inmunoglobulinas se utilizó en forma aleatoria tanto el hemi-diafragma derecho como el izquierdo.

La frecuencia de MEPPs fue determinada en ausencia de tetrodotoxina (actividad espontánea), antes y después del período de incubación, por medio de registros intracelulares. Para ello se emplearon microelectrodos de vidrio conteniendo KCl 3 M (resistencia: 20-30 M $\Omega$ ) y se realizaron registros de 2-5 min de duración, adquiridos de un máximo de 15 fibras por animal, empleando al menos 3 ratones por tratamiento.

El procedimiento de adquisición se llevó a cabo de la manera descrita previamente (Pagani *et al.* 2006). Los datos fueron almacenados en un disco duro para su posterior análisis usando el software apropiado (Axoscope 9.0 y Clampfit 9.0, Axon Instruments, Foster City, California, USA). Para realizar las comparaciones de datos y confección de gráficos se empleó el software SigmaPlot 10.0 integrado con SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., Chicago, Illinois, USA).

### 4.2.6 - Inmuno-fluorescencia de PNM

La eutanización de los animales y la disección se llevó a cabo según lo descrito anteriormente. Los músculos disecados se fijaron con paraformaldehído 4 % p/v a 4 °C, se permeabilizaron con Tritón-X100 1 % v/v y se criopreservaron en sacarosa 30 % p/v a 4 °C. Como medio de inclusión se empleó OCT4583 TissueTek (Sakura, Tokyo, Japón) y se obtuvieron secciones de tejido de 40  $\mu$ m empleando un crióstato (ETR2248, Reichert-Jung, Bensheim, Alemania). Dichas secciones fueron montadas en portaobjetos cubiertos de gelatina y guardadas a -20 °C. Para reducir la señal de fondo de las fibras musculares, los preparados de músculo

## 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

diafragma fueron cortados de manera tangencial y en consecuencia, las PNM por lo general no mostraron la forma tipo *pretzel* que las caracteriza.

Los cortes de tejido fueron permeabilizados con Tritón-X100 0,05 % v/v y posteriormente bloqueados con seroalbúmina bovina (BSA) 3 % p/v y suero normal de cabra 5 % v/v, durante 30 min. Al finalizar el bloqueo, se incubaron las secciones con las IgGs purificadas de pacientes o individuos controles, en las diluciones apropiadas (1:10-1:100) durante 16-20 h a 4 °C. Como agente diluyente se utilizó PBS conteniendo BSA 3 % p/v, suero normal de cabra 5 % v/v, L-lisina 0,1 M y Tritón X-100 0,075 % v/v. La unión del anticuerpo primario se reveló utilizando un anticuerpo anti-IgG<sub>humano</sub> acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una dilución 1:2.000. La co-tinción de los cortes con  $\alpha$ -bungarotoxina (0,25  $\mu$ g/mL) conjugada a tetrametilrodamina (TMR) nos permitió identificar la PNM a través de su alta afinidad por el receptor post-sináptico de acetilcolina. Luego de exhaustivos lavados con PBS, las secciones de músculo fueron montadas en PBS:glicerol (1:1), cubiertas con cubreobjetos y selladas con esmalte de uñas.

Para chequear las uniones no específicas y la auto-fluorescencia, se incluyeron controles por omisión de  $\alpha$ -bungarotoxina, anticuerpos primarios (control de isotipo) o secundarios.

### 4.2.7 - Inmuno-fluorescencia de médula espinal, corteza cerebral y cerebelo

Los ratones anestesiados con tribromoetanol fueron perfundidos transcardíacamente con PBS seguido de una solución de paraformaldehído 4 % p/v en sacarosa 4 % p/v, luego de comprobar la pérdida del reflejo pupilar y plantar de las extremidades. Con posterioridad a la disección

## 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

completa del cerebro, cerebelo y médula espinal, el tejido fue fijado adicionalmente en la misma solución durante 2-4 h a 4 °C. Los cortes de 50-150  $\mu\text{m}$  se obtuvieron con un vibrátomo Integraslice 7550PSDS (Campden Instruments, Loughborough, Reino Unido) y se permeabilizaron con Tritón X-100 1 % v/v durante 30 min. La incubación con las IgGs purificadas de los pacientes o los individuos controles (0,2 mg/mL) se llevó a cabo durante 16-20 h a 4 °C, utilizando como agente diluyente PBS con BSA 3 % p/v, suero normal de cabra 5 % v/v, L-lisina 0,1 M y Tritón X-100 0,075 % v/v. La unión del anticuerpo primario fue detectada empleando un secundario anti-IgG<sub>humano</sub> acoplado a FITC, en una dilución de 1:2.000.

Para la inmuno-marcación de la médula espinal, se analizaron las secciones lumbares y torácicas debido al gran tamaño de las células residentes en estas regiones. Las motoneuronas inferiores fueron detectadas por su morfología y localización en el asta ventral. El área cortical motora primaria fue identificada en las rodajas con ayuda de un atlas de cerebro de ratón (Paxinos y Franklin 2001), mientras que las motoneuronas fueron reconocidas por su morfología y tamaño. Las neuronas de Purkinje fueron identificadas dentro de las secciones cerebelares por su morfología distintiva. En todos los casos previos, se utilizó una contra-tinción con yoduro de propidio (3  $\mu\text{M}$ , 60 min) para facilitar la distinción morfológica de las diferentes poblaciones celulares. En el caso del tejido fijado, el yoduro de propidio tiñe tanto el citoplasma como el núcleo de las células debido a su afinidad general por los ácidos nucleicos.

## 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

En forma análoga a lo descrito anteriormente, también se realizaron co-tinciones de tejido empleando los marcadores mencionados en la sección Resultados y descritos en la **Tabla 4.1**.

### *4.2.8 - Análisis de inmuno-fluorescencia y procesado de imágenes*

La marcación inmuno-fluorescente se analizó con un microscopio confocal FV300 (Olympus Optical Co., Tokio, Japón), equipado con un sistema de adquisición de imágenes y el software Fluoview 3.3 (Olympus Optical Co., Tokio, Japón). Las secciones fueron escaneadas en forma secuencial con un laser de argón ( $\lambda$ : 488 nm) y helio-neón ( $\lambda$ : 543 nm), para reducir el *bleeding-through* de las señales fluorescentes. Tanto la intensidad de los láseres como la configuración de cada fotomultiplicador (voltaje, ganancia y *offset*) se mantuvieron constantes en cada experimento.

Para el análisis de los cortes de PNM montados en portaobjetos, se utilizó un objetivo PlanApo 60x Olympus de inmersión en aceite (apertura numérica: 1,4), mientras que las rodajas fueron fotografiadas con un objetivo LUMplanFL 60x Olympus de inmersión en agua (apertura numérica: 0,9) o un UplanFL 20x Olympus seco (apertura numérica: 0,5).

Se procedió a coleccionar para cada canal un total de 10 planos confocales a intervalos de 1  $\mu$ m, los cuales fueron subsecuentemente analizados con el software ImageJ 1.42 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia se llevó a cabo por medición del valor de gris medio de por lo menos 15 células o PNM de 2-3 animales, luego de la sustracción de la señal de fondo. Para el caso de las preparaciones de músculo, la región de

## 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

interés se eligió en base a la señal de  $\alpha$ -bungarotoxina. Los valores medios de gris se normalizaron al control de isotipo.

### 4.2.9 - Preparación de sinaptosomas

La purificación de las fracciones crudas de membrana y sinaptosomas se llevó a cabo según el protocolo de Gray y Whittaker (1962).

El cerebelo de ratón fue disgregado con un homogenizador de vidrio-teflón tipo *Dounce*, en solución fría de Tris-HCl 50 mM pH 7,4 conteniendo sacarosa 0,32 M y EDTA 10  $\mu$ M (relación g tejido:mL sacarosa 1:10). Los homogenatos fueron centrifugados a 1.000 g durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante resultante se centrifugó a 17.000 g durante 55 min a 4 °C. Los pellets fueron resuspendidos en *buffer* RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, NP-40 1 % v/v, SDS 0,1 % p/v y deoxicolato de sodio 0,5 % p/v), suplementado con los inhibidores de proteasas apropiados (EDTA 10  $\mu$ M, PMSF 2 mM, aprotinina 10  $\mu$ g/mL, leupeptina 100  $\mu$ M y pepstatina 1  $\mu$ g/mL) y empleados en los experimentos de inmunoprecipitación. Este extracto representó la fracción cruda de membranas.

Alternativamente, se continuó con la purificación de sinaptosomas. El pellet de la última centrifugación se resuspendió en solución de sacarosa 0,32 M y se sembró en un gradiente discontinuo de sacarosa compuesto por dos fases (1,2 M - 0,8 M). El fraccionamiento se realizó por centrifugación a 112.500 g durante 2 h. Los sinaptosomas se colectaron de la interfase de sacarosa 1,2 M - 0,8 M y se concentraron por centrifugación a 100.000 g durante 60 min, para luego liofilizarse. Las muestras fueron luego preparadas para su separación por electroforesis en dos dimensiones.

## 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 4.2.10 - Obtención de extractos totales de cerebelo y músculo

Para la preparación del extracto total de cerebelo, el tejido fue disgregado mecánicamente en presencia de *buffer* RIPA (suplementado con inhibidores de proteasas), por medio de un homogenizador tipo *Dounce*.

Por su parte, el tejido muscular disecado de los miembros inferiores fue pulverizado en presencia de N<sub>2</sub> líquido utilizando un mortero de porcelana. El polvo resultante se solubilizó en *buffer* RIPA suplementado con inhibidores de proteasas.

En ambos casos, dada la alta viscosidad de la solución resultante, se incluyó en el proceso de solubilización un paso extra de sonicado. Para ello se empleó un equipo Fisher Sonic Dismembrator modelo 500 (Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido), siguiendo un protocolo de 3 ciclos de 5 segundos cada uno, a una intensidad de 20 % del máximo.

### 4.2.11 - Purificación de rafts

La obtención de las fracciones enriquecidas en proteínas de *rafts* se realizó según el protocolo descrito en Maekawa *et al.* 1999.

Brevemente, los extractos de cerebelo fueron obtenidos por disgregación mecánica en *buffer* TME (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, EGTA 1 mM) conteniendo Tritón-X100 2 % v/v (relación g tejido:mL TME 1:10). A este homogenato se adicionó una alícuota de solución de sacarosa 2,4 M a fin de lograr una concentración final de 0,8 M. La muestra se colocó en el fondo de un gradiente discontinuo de sacarosa, seguido de una capa de sacarosa 0,7 M (en TME) y otra de *buffer* TME. La separación se realizó por centrifugación a 70.000 g durante 6 h a 4 °C. La banda ubicada en la interfase entre la capa de TME y sacarosa 0,7 M fue colectada y

## 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

resuspendida en *buffer* TME conteniendo Tritón-X100 1 % v/v. Luego de una centrifugación a 100.000 g durante 1 h a 4 °C, el pellet se guardó a -80 °C para su posterior solubilización con *buffer* RIPA suplementado con inhibidores de proteasas.

### 4.2.12 - Cultivo de células y transfección/inducción

Las células embrionarias de riñón humano HEK293 (pasajes: 18-26, número de catálogo ATCC: CRL-1573) fueron mantenidas por pasajes seriados en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> de área. Las células fueron crecidas en medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) conteniendo L-glutamina 4 mM, glucosa 4,5 g/L, piridoxina-HCl 4 mg/L y piruvato de sodio 110 mL/L, y suplementado con suero fetal bovino (SFB, Gibco, USA) 10 % v/v (inactivado por calor), en una estufa humidificada mantenida a 37 °C y en una atmósfera compuesta por CO<sub>2</sub> 5 % y aire 95 %.

El subcultivo de las células se realizó por incubación con tripsina-EDTA (ácido etilendiamintetra-acético) 0,25 % p/v seguida de una inactivación de la proteasa por adición de DMEM conteniendo SFB y resembrando en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de área. Para las transfecciones se emplearon cultivos con una confluencia del 50 % y se utilizó la técnica de liposomas catiónicos, con el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor.

La expresión del cDNA de la subunidad Ca<sub>v</sub>2.1 humana, la  $\beta_{2a}$  de rata y la  $\alpha_2\delta_2$  de rata se llevó a cabo en el vector pcDNA3.1Zeo(+) (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Treinta y seis horas luego de la transfección, se

## 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

procesaron las células para los experimentos de inmuno-precipitación o *western blot*, según se indica más adelante.

La línea celular inducible T-rex 293 (pasajes: 9-12), derivada de la HEK293, se utilizó como un modelo de expresión estable de las subunidades del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q. El cultivo se realizó en forma esencialmente similar al descrito previamente, salvo por la adición al medio de aminoácidos no esenciales (1 % p/v), y 24 h previo a la inducción, de los agentes de selección blasticidina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), zeocina (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e higromicina B (150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

El vector utilizado en este caso fue el pcDNA5/TO (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), el cual contiene un elemento de respuesta a tetraciclina que fue empleado para dirigir la expresión del cDNA de la subunidad  $\text{Ca}_v2.1$  de rata. Las subunidades accesorias  $\beta_{2a}$  y  $\alpha_{2\delta_2}$  fueron expresadas en el plásmido pBudCE4.1 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Las células fueron lisadas 48 h luego de la inducción con tetraciclina (1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). En ambos casos, la lisis se llevó a cabo en forma mecánica utilizando agujas de diámetro interno decreciente (26-29 G). La misma se realizó en *buffer* conteniendo NP-40 (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NP-40 0,5 % v/v, NaCl 150 mM y EDTA 50 mM) suplementado con inhibidores de proteasas para los ensayos de inmuno-precipitación o en *buffer* Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2 % p/v, azul de bromofenol 0,01 % p/v,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 % v/v y glicerol 10 % v/v) para la electroforesis seguida de *western blot*.

## 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 4.2.13 - Determinación de la concentración de proteínas

En todos los casos, la solubilización de las proteínas fue seguida por una centrifugación de 20 min a 21.500 g para separar el material no resuspendido.

La medición de la concentración de proteínas se llevó a cabo según el método descrito por Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina como proteína patrón.

### 4.2.14 - Ensayo de inmuno-precipitación

Una cantidad de proteínas de entre 100 y 250  $\mu\text{g}$  se incubaron durante 16 h con los anticuerpos y 60  $\mu\text{l}$  de bolitas de agarosa con proteína G (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), en un agitador rotativo a 4°C. Las bolitas de agarosa se lavaron con un *buffer* de lisis conteniendo NP-40 (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NP-40 0,5 % v/v, NaCl 150 mM y EDTA 50 mM) y los complejos proteicos que interactuaron con los anticuerpos fueron eluidos con *buffer* Laemmli.

Los inmuno-precipitados fueron analizados por electroforesis en condiciones desnaturalizantes seguida de *western blot*. Una alícuota del lisado empleado originalmente para el ensayo se corrió en paralelo para chequear la presencia de las proteínas analizadas (*input*). Alternativamente, la fracción de proteínas inmuno-precipitadas se separó por electroforesis y posteriormente se procedió a la tinción del gel con nitrato de plata, utilizando un protocolo compatible con espectrometría de masa (Vorum) extraído de Mortz *et al.* 2001.

## 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 4.2.15 - *Electroforesis en gel de una dimensión y western blot*

Los *western blots* se llevaron a cabo de acuerdo a procedimientos *standard*. Los lisados celulares se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida (a un voltaje constante de 120 V) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL, GE Healthcare, Piscataway, USA), aplicando un voltaje constante de 100 V durante 60 min. Los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con leche en polvo descremada 2 % en PBST (PBS conteniendo Tween-20 0,2 %) durante 90 min a temperatura ambiente.

Las membranas fueron incubadas durante 16 h a 4 °C con los anticuerpos primarios mencionados en la sección Resultados, seguido de una incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a la peroxidasa de rábano. Todos los anticuerpos fueron diluidos en PBST conteniendo leche en polvo descremada 2 %. Las bandas inmuno-reactivas fueron detectadas por emisión de quimioluminiscencia utilizando el kit Immobilon Western (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) y el analizador de imágenes LAS-1000 plus (Fujifilm, Tokio, Japón).

### 4.2.16 - *Electroforesis en gel de dos dimensiones*

Las muestras de sinaptosomas liofilizadas se resuspendieron en solución de muestra para 2D (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4 %) y la concentración proteica se determinó con el kit 2D-Quant (GE Healthcare, Piscataway, USA). La carga de las muestras en las tiras utilizadas en la primera dimensión (IPG Strips 3-10; GE Healthcare, Piscataway, USA) se realizó por rehidratación pasiva durante toda la noche.

## 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

El isoelectroenfoco se llevó a cabo según el siguiente esquema: 30 min a un voltaje constante de 300 V, 30 min a un gradiente de voltaje 300-1.000 V, 80 min a un gradiente de voltaje 1.000-5.000 V, terminando con un voltaje constante de 5.000 V hasta completar 2.000 V h.

Las tiras con muestras enfocadas se equilibraron en un *buffer* Tris (Tris-HCl 75 mM pH 8,8, urea 6 M, glicerol 29,3 %, SDS 2 %, azul de bromofenol 0,002 %) conteniendo DTT 10 mg/mL (para reducir los puentes disulfuro) y subsiguientemente, iodoacetamida 25 mg/mL (para alquilar grupos tioles).

La segunda dimensión se realizó en un gel de poliacrilamida 12,5 % en condiciones de corriente constante (10 mA por gel). Al terminar la corrida, los geles fueron teñidos empleando el protocolo de Coomassie coloidal.

### 4.2.17 - Espectrometría de masa e identificación por mapeo peptídico

Las proteínas a ser identificadas fueron escindidas del gel y digeridas con tripsina (10 mg/mL en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM) a 37 °C durante toda la noche. Los péptidos resultantes fueron extraídos del gel con acetonitrilo 60 % en ácido trifluoroacético 0,2 %, concentrados con bomba de vacío y desalados con una micro-columna C18 de fase reversa (OMIX Pippete tips, Varian). La elución de los péptidos se realizó directamente con la solución de matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinámico en acetonitrilo 60 % y ácido trifluoroacético 0,2 %).

Los espectros de masa de la mezcla de digestión fueron adquiridos con un equipo MALDI-TOF-TOF modelo 4800 de Applied Biosystems (Carlsbad, California, USA), en un trabajo en colaboración con los Drs.

## 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

Carlos Cerveñansky, Rosario Durán y Analía Lima (Unidad de Proteómica y Bioquímica Analítica, Instituto Pasteur, Montevideo, Uruguay). Para ello se utilizó el espectrómetro de masa en modo reflector y se calibró externamente con péptidos patrones. Para la obtención de los espectros de MS/MS se empleó la herramienta de disociación inducida por colisión.

Las proteínas fueron identificadas por búsqueda en la base de datos NCBI nr con los valores de  $m/z$  y utilizando el programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes:

- Tolerancia de masa isotópica: 0,05 Da.
- Tolerancia de masa fragmentada: 0,25 Da.
- Modificación fija: carbamidometilación de cisteínas.
- Modificación variable: oxidación de metioninas.
- Tolerancia de fragmentos trípticos no encontrados: 1.

### 4.2.18 - Análisis estadístico

Los resultados se expresaron y graficaron como valores de media  $\pm$  error *standard* de la media. Las diferencias entre los grupos experimentales fueron analizadas con el *test* no paramétrico *Mann-Whitney Rank Sum*, mientras que el análisis de correlación entre los datos se llevó a cabo con el coeficiente de Spearman. Para ello se empleó el software SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., Chicago, Illinois, USA). Un valor de  $p$  menor o igual a 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

# Resultados

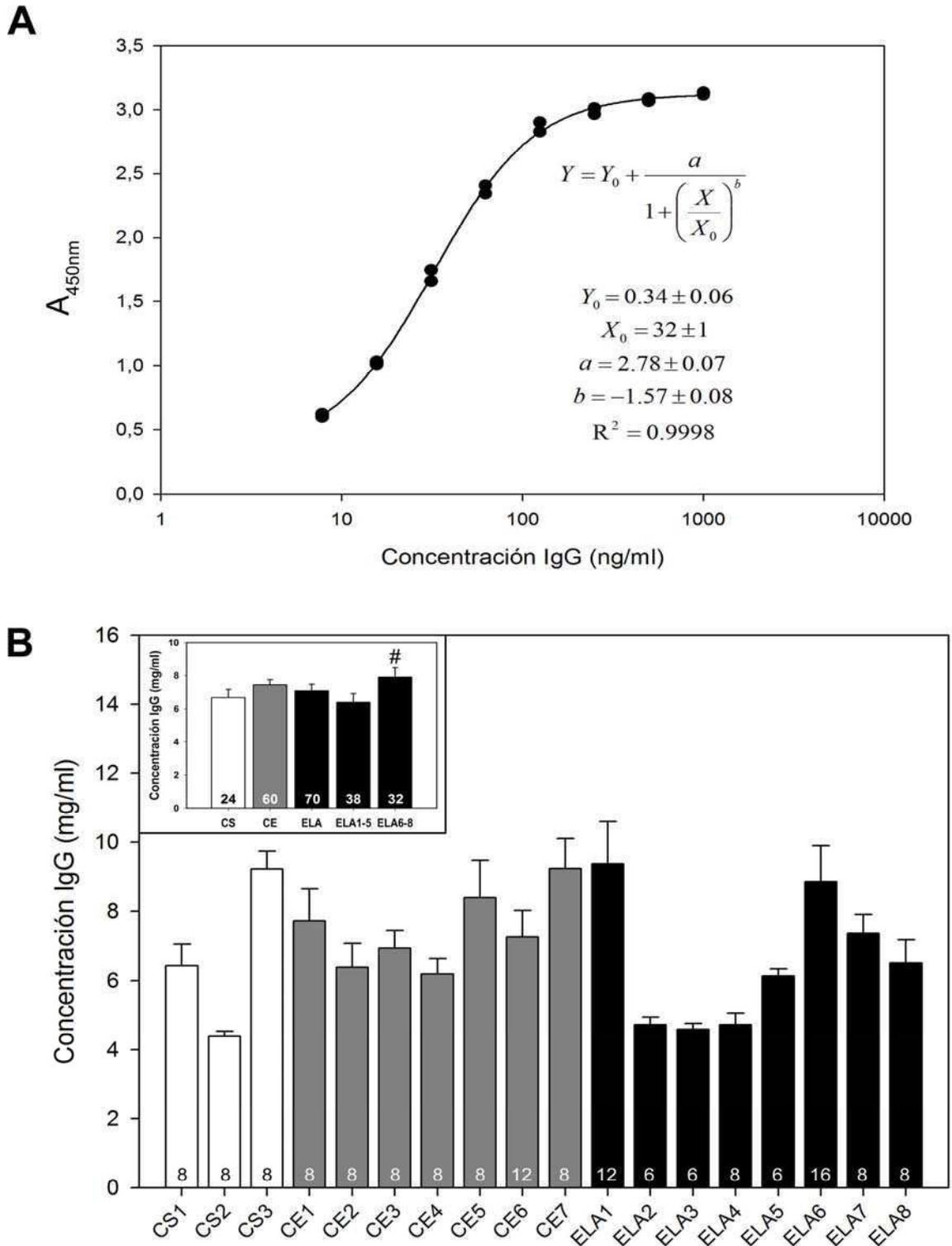


### 5.1 - Los anticuerpos de ELA aumentan la actividad sináptica espontánea e interactúan con la PNM de ratón

En una primera instancia determinamos la concentración de las IgGs en las muestras de suero de pacientes con ELA por medio de un ensayo de ELISA *sandwich*, utilizando un kit comercial (**Figura 5.1A**). En forma paralela analizamos las muestras provenientes de suero de los individuos normales (CS) y de los pacientes con enfermedades neurológicas distintas de ELA esporádica (CE), algunas de las cuales incluían formas hereditarias de la enfermedad (CE4-6) y otros desórdenes auto-inmunes (CE1-2 y CE7). Como se observa en la **Figura 5.1B**, los valores de la cuantificación de las IgGs de los pacientes esporádicos mostraron niveles dentro del rango encontrado para los individuos sanos (3,73-11,29 mg/mL), no diferenciándose en forma significativa de éstos ( $p > 0,05$ ). El mismo patrón, aunque mas homogéneo, se pudo observar para el caso de los CE. La agrupación de los datos según cada categoría tampoco reveló mayores diferencias, excepto en el caso de las muestras ELA6-8, que mostraron una concentración de anticuerpos significativamente mayor que las ELA1-5 (**Figura 5.1B**; recuadro interno;  $p < 0,01$ ), aunque no resultó diferente a la encontrada en los CS ( $p > 0,05$ ). La razón por la cual los datos de ELA fueron combinados de esta manera se comprenderá mas adelante.

Con el fin de estudiar si las IgGs-ELA purificadas de la serie de pacientes incluidos en este estudio eran capaces de modificar la frecuencia de MEPPs, realizamos incubaciones de preparaciones de músculo diafragma de ratón con estos anticuerpos. Posteriormente analizamos la tasa de liberación espontánea de acetilcolina por medio de registros intracelulares de las fibras musculares.

## 5 - RESULTADOS



**Figura 5.1: Ensayo de ELISA sandwich para la cuantificación de las IgGs en el suero humano.**

Se utilizó un kit comercial (Human IgG ELISA Quantitation Kit, Bethyl Laboratories, USA) para la determinación de los niveles de anticuerpo en cada muestra de suero. La detección se realizó mediante la medición espectrofotométrica de la actividad de la enzima peroxidasa de rábano, empleando el sustrato OPD ( $\lambda_{\text{absorbancia}}$ : 450nm).

## 5 - RESULTADOS

---

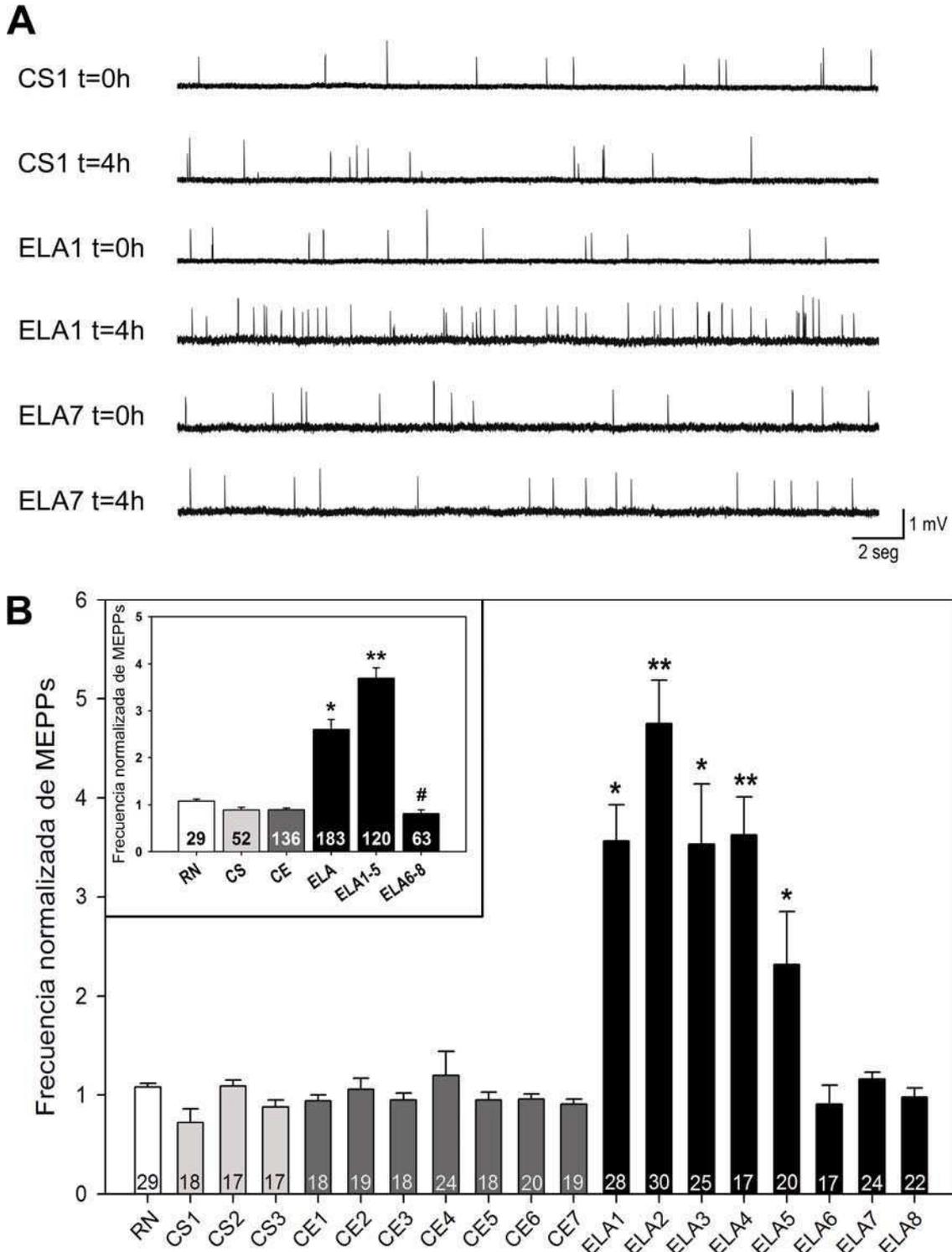
A) Gráfico representativo de la curva de calibración utilizada para la estimación de la concentración de las IgGs en cada muestra. También se muestra la ecuación del ajuste de los datos y los valores medios y errores de los parámetros, al igual que la bondad de dicho ajuste ( $R^2$ ).

B) Gráfico de barras mostrando los valores obtenidos para todas las muestras. El recuadro interno se elaboró a partir de la combinación de todos los datos, además de separar las muestras de ELA en dos grupos (ELA1-5 y ELA6-8). #  $p < 0,01$  vs ELA1-5. Los números en la parte inferior indican la cantidad total de datos promediados. Barras blancas = controles sanos (CS), barras grises = controles enfermos (CE), barras negras = pacientes con ELA.

Como se puede observar en la **Figura 5.2**, cinco de las muestras de ELA (63 %) presentaron una clara tendencia a aumentar significativamente la frecuencia de potenciales miniatura ( $p < 0,05$  comparando frecuencia inicial versus final), partiendo de una condición basal de 30 MEPPs/min. Los valores encontrados luego de 4 h de incubación con estas muestras fueron entre 2 y 5 veces mayores a los iniciales.

Este efecto estuvo completamente ausente en aquellos experimentos donde se utilizó RN, o IgGs de los controles sanos o enfermos ( $p > 0,05$  comparando la frecuencia inicial versus final). Esta ausencia de efecto también fue observada en las tres muestras restantes de las IgGs-ELA analizadas, las cuales fueron incapaces de aumentar la actividad sináptica espontánea por encima de los niveles basales iniciales ( $p > 0,05$  comparando frecuencia inicial versus final). Las diferencias observadas se hicieron más marcadas al agrupar los datos, especialmente entre ELA1-5 y ELA6-8 (**Figura 5.2B**; recuadro interno).

## 5 - RESULTADOS



**Figura 5.2: Registros de MEPPs de preparaciones de músculo diafragma de ratón.**

Los músculos fueron incubados con RN o anticuerpos purificados de pacientes.

A) Registros intracelulares representativos adquiridos antes (t=0h) o después (t=4h) de la incubación.

B) Cuantificación de la frecuencia de MEPPs relativa al comienzo del experimento. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,001$  comparando las frecuencias iniciales y finales de MEPPs. El recuadro interno muestra la combinación de los datos (\*  $p < 0,01$  vs CS, \*\*  $p < 0,001$  vs CS y #  $p < 0,001$  vs ELA1-5). El número dentro de las barras indica la cantidad de PNM's estudiadas en cada condición experimental. Barra blanca = RN, barras gris claro = CS, barras gris oscuro = CE, barras negras = ELA.

## 5 - RESULTADOS

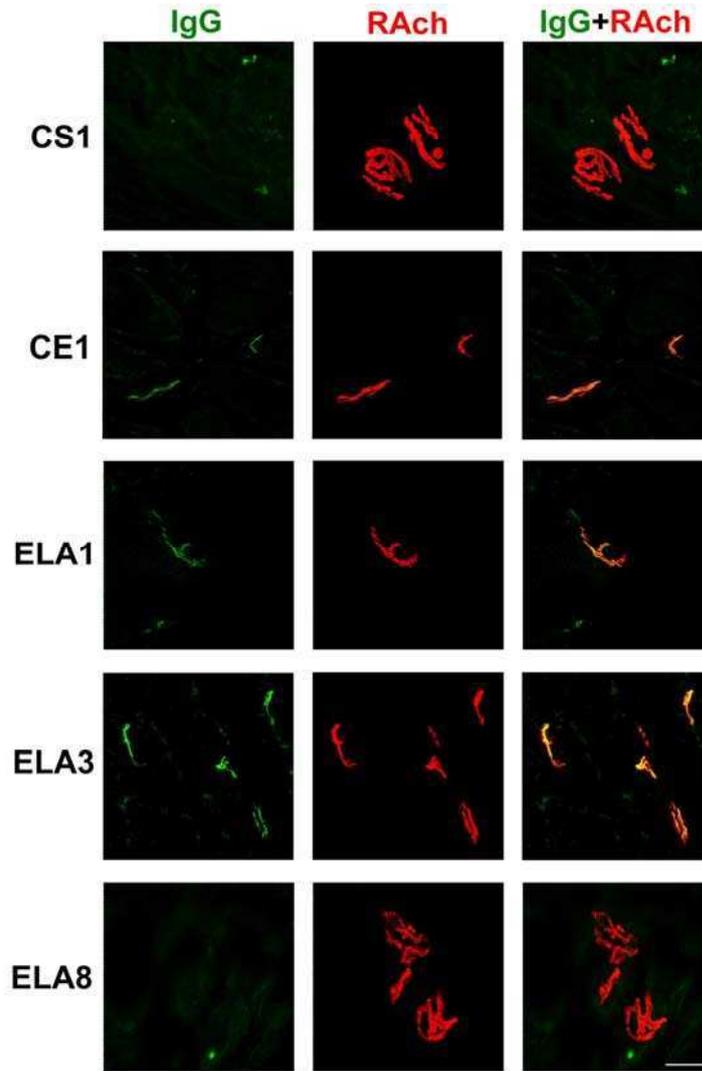
---

Para obtener una mejor comprensión de el/los sitio/s de acción de estos anticuerpos, llevamos a cabo un estudio de inmuno-fluorescencia indirecta, empleando las IgGs de pacientes con ELA o individuos controles como anticuerpos primarios, además de utilizar  $\alpha$ -bungarotoxina acoplada a tetrametilrodamina como un marcador post-sináptico de la PNM.

Interesantemente, las mismas muestras de los pacientes con ELA que produjeron una potenciación sináptica, también presentaron reactividad contra la PNM de diafragma de ratón (**Figuras 5.3 y 5.4**;  $p < 0,05$  comparando ELA versus control de isotipo). Las intensidades de fluorescencia en estos casos resultaron ser entre 3 y 22 veces mayor a las encontradas en los controles sanos (**Figuras 5.3 y 5.4**;  $p < 0,05$  comparando ELA versus CS). Como se muestra en el recuadro de la **Figura 5.4A**, los datos agrupados también mostraron diferencias marcadas.

Por otro lado, la inmuno-reactividad de las restantes IgGs-ELA no resultó significativamente diferente a la señal de fondo (**Figura 5.4**;  $p > 0,05$  comparando ELA versus el control de isotipo) ni a los controles sanos ( $p > 0,05$  comparando ELA versus CS), excepto cuando se consideraron en conjunto. En este último caso sí se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$  comparando ELA6-8 versus CS).

## 5 - RESULTADOS

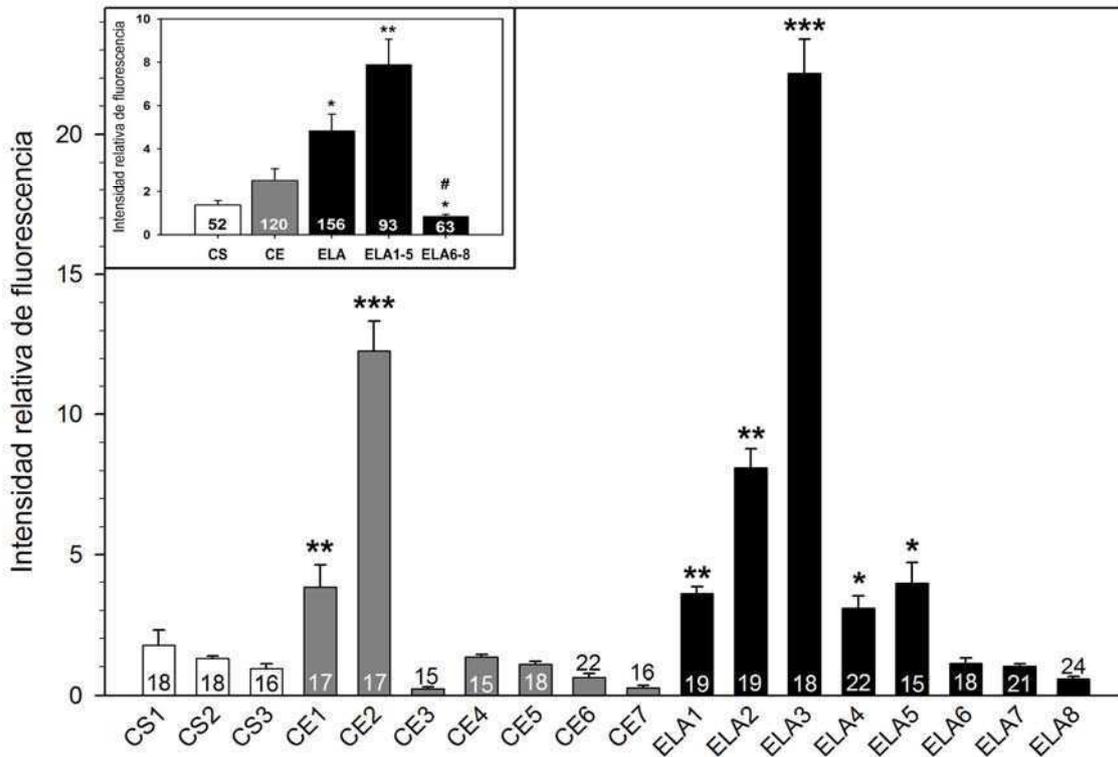


**Figura 5.3: Inmuno-fluorescencia de la PNM de ratón.**

Las secciones (40  $\mu\text{m}$ ) de músculo diafragma de ratón fueron incubadas con las IgGs purificadas de los pacientes con ELA, CS o CE. La visualización del anticuerpo primario se realizó con un anticuerpo secundario anti-IgG<sub>humano</sub> acoplado a FITC. Como marcador post-sináptico de la PNM se utilizó  $\alpha$ -bungarotoxina conjugada a TMR (RAch, receptor de acetilcolina). Se muestran micrografías confocales representativas del tejido inmuno-marcado. Las fotos en la última columna muestran las imágenes superpuestas. Barra: 25  $\mu\text{m}$ . Aumento = 600X.

Mientras que la mayoría de las muestras controles permanecieron dentro de los niveles de unión no específicos ( $p > 0,05$  comparando las muestras controles versus el control de isotipo), dos de los seis controles enfermos evidenciaron resultados positivos en este ensayo de inmuno-marcación (**Figura 5.4**;  $p < 0,01$  CE1 y CE2 versus el control de isotipo o CS). Curiosamente estos anticuerpos fueron purificados del suero de los

## 5 - RESULTADOS



**Figura 5.4: Medición de la inmuno-fluorescencia de PNM de ratón.**

Cuantificación de la intensidad de fluorescencia normalizada al control de isotipo. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  comparando con los CS. El recuadro interno muestra la combinación de los datos (\*  $p < 0,05$  vs CS, \*\*  $p < 0,001$  vs CS y #  $p < 0,001$  vs ELA1-5). El número dentro de las barras indica la cantidad de PNM estudiadas en cada condición experimental (N=7 animales).

pacientes que padecían enfermedades auto-inmunes dirigidas contra los componentes de la PNM, como son el síndrome miasténico de Lambert-Eaton (CE1) y la miastenia gravis (CE2).

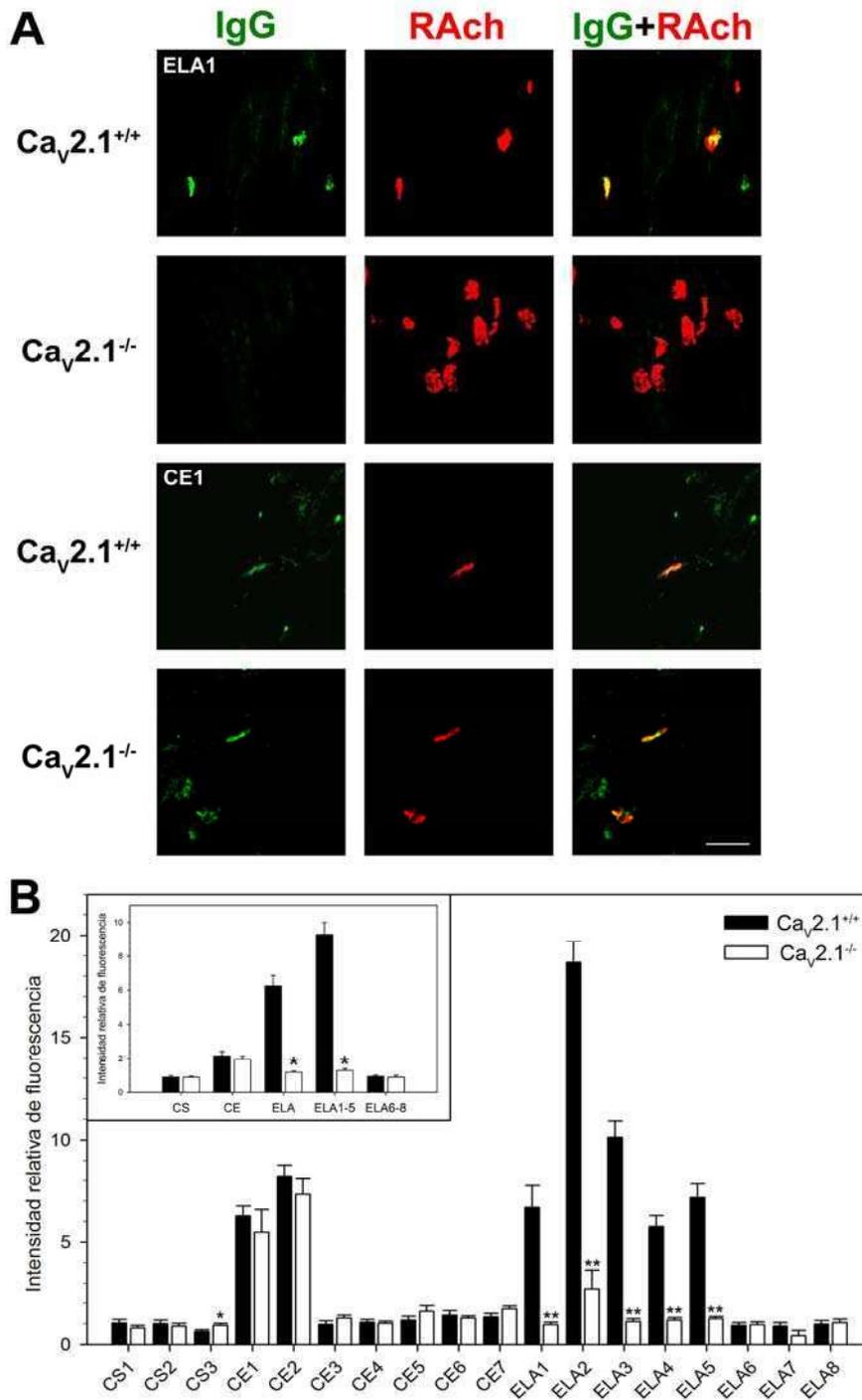
Un aspecto importante que debe recalarse es la falta de efecto electrofisiológico y unión a la PNM en todos los casos de ELA familiar analizados (**Figuras 5.2 y 5.4**; CE4-6). En este sentido, todas las muestras purificadas de los pacientes con la variante hereditaria se comportaron de forma esencialmente similar a los controles sanos ( $p > 0,05$  comparando CE4, CE5 o CE6 versus CS).

### 5.2 - Reactividad de las IgGs-ELA contra la PNM de los ratones $Ca_v2.1^{-/-}$ y $Ca_v2.2^{-/-}$

Existe una amplia variedad de evidencias que sugieren una asociación entre las IgGs-ELA y los CCVDs de tipo P/Q (Llinas *et al.* 1993; Smith *et al.* 1994; Carter y Mynlieff 2003; Pagani *et al.* 2006). Teniendo en cuenta estos antecedentes, junto con la interacción específica que algunas IgGs-ELA mostraron hacia la PNM de ratón en el presente estudio, nos propusimos evaluar si la ausencia de la subunidad  $\alpha_1$  del canal de  $Ca^{2+}$  de tipo P/Q o N podía modificar la unión de los anticuerpos de ELA a esta estructura neuronal.

Como se muestra en la **Figura 5.5**, las IgGs-ELA no evidenciaron una interacción apreciable hacia los músculos diafragma de ratones carentes de la subunidad  $\alpha_1$  específica del canal de  $Ca^{2+}$  tipo P/Q ( $p < 0,001$  comparando los animales  $Ca_v2.1^{+/+}$  versus  $Ca_v2.1^{-/-}$ ). En estos casos, los valores de intensidad de fluorescencia en los ratones carentes de la subunidad  $\alpha_{1A}$  no resultaron estadísticamente diferentes de los obtenidos con los individuos controles (**Figura 5.5B**;  $p > 0,05$  comparando ELA versus CS). Esta marcada disminución en la interacción de las IgGs-ELA también puede apreciarse en el recuadro de la **Figura 5.5B**, el cual muestra los datos organizados en grupos.

En contraste con estos resultados, los anticuerpos de los CE que mostraron afinidad por la PNM de los ratones *WT* (**Figura 5.4**; CE1 y CE2) también interactuaron con las secciones de músculo de los ratones  $Ca_v2.1^{-/-}$  (**Figura 5.5B**;  $p > 0,05$  comparando los animales  $Ca_v2.1^{+/+}$  versus  $Ca_v2.1^{-/-}$ ).



**Figura 5.5: Inmuno-fluorescencia de la PNM de los ratones carentes del canal de Ca<sup>2+</sup> de tipo P/ Q.**

Las secciones (40  $\mu$ m) de músculo diafragma de los ratones Ca<sub>v</sub>2.1<sup>-/-</sup> o WT (P16-23) fueron expuestas a las IgGs purificadas de los pacientes con ELA, CS o CE. La presencia de los anticuerpos primarios se determinó según lo especificado anteriormente.

A) Micrografías confocales representativas de la PNM. Las fotos en la última columna muestran las imágenes superpuestas. Barra: 25  $\mu$ m. Aumento = 600X.

B) Determinación de la intensidad de fluorescencia normalizada al control de isotipo. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,001$  comparado con los músculo WT, respectivamente. El número de PNM analizadas en cada condición experimental varió entre 16 y 30 (N=5 animales). El recuadro interno muestra la combinación de los datos (\*  $p < 0,001$  vs Ca<sub>v</sub>2.1<sup>+/+</sup>).

## 5 - RESULTADOS

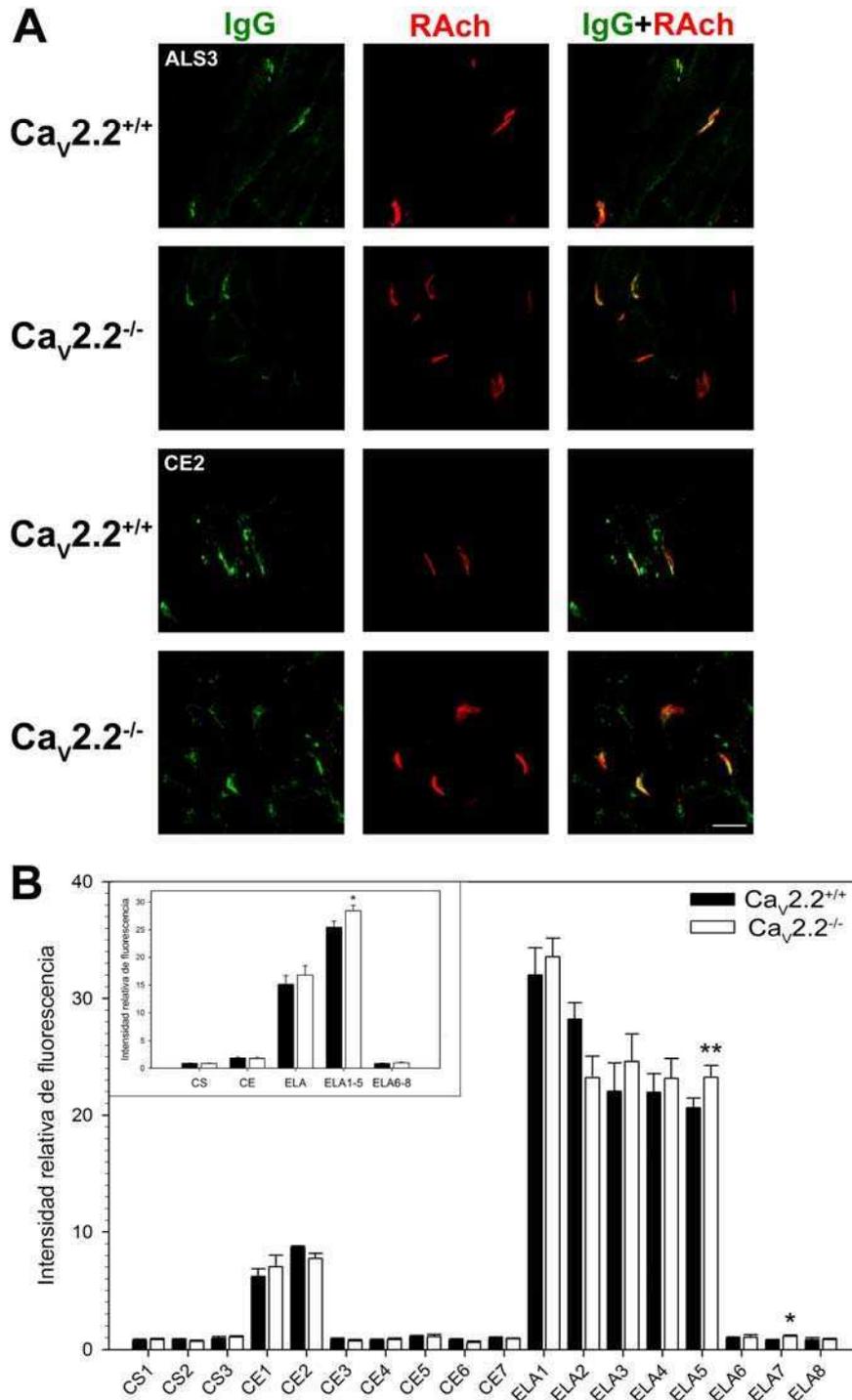
---

Adicionalmente, la diferencia en la reactividad mencionada anteriormente no fue detectada al comparar los músculos de los ratones *WT* y aquellos carentes del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N (**Figura 5.6**). La interacción de los anticuerpos ELA con la PNM mostró similares niveles para ambos genotipos ( $p > 0,05$  comparando los animales  $\text{Ca}_v2.2^{+/+}$  versus  $\text{Ca}_v2.2^{-/-}$ ), salvo en el caso de las muestras ALS5 y ALS7 que exhibieron un pequeño aumento ( $p < 0,001$  para ELA5 y  $p < 0,05$  para ELA7, comparando los animales  $\text{Ca}_v2.2^{+/+}$  versus  $\text{Ca}_v2.2^{-/-}$ ). La agrupación de los datos mostró un incremento discreto pero significativo en la fluorescencia de las muestras ELA1-5 en el tejido transgénico (**Figura 5.6B**; recuadro interno;  $p < 0,05$  comparando los animales *WT* versus  $\text{Ca}_v2.2^{-/-}$ ). Adicionalmente, ninguno de los CE que reaccionó contra los terminales de los animales *WT* modificó su nivel de unión en ausencia de la subunidad  $\text{Ca}_v2.2$  (**Figura 5.6B**; CE1 y CE2;  $p > 0,05$  comparando los animales *WT* versus  $\text{Ca}_v2.2^{-/-}$ ).

### 5.3 - Funcionalidad de las IgGs-ELA en la actividad espontánea de la PNM de los ratones $\text{Ca}_v2.1^{-/-}$

Con el objetivo de evaluar la relevancia funcional de la disminución encontrada en la interacción de las IgGs-ELA con la PNM de los ratones  $\text{Ca}_v2.1^{-/-}$ , testeamos el efecto de los anticuerpos en la actividad sináptica espontánea de los músculos de los ratones normales y carentes de la subunidad formadora del poro. Desafortunadamente, debido a la escasez de muestra, no pudimos incluir en este estudio todas las IgGs-ELA ensayadas previamente.

## 5 - RESULTADOS



**Figura 5.6: Inmuno-fluorescencia de la PNM de los ratones carentes del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N.**

Las secciones (40  $\mu\text{m}$ ) de músculo diafragma de los ratones  $\text{Ca}_v2.2^{-/-}$  o *WT* (P18) fueron incubadas con las IgGs purificadas de los pacientes con ELA, CS o CE. La presencia de los anticuerpos primarios se determinó según lo especificado anteriormente.

A) Fotos representativas de la PNM. Los paneles en la última columna muestran las imágenes superpuestas. Barra: 25  $\mu\text{m}$ . Aumento = 600X.

B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia normalizada al control de isotipo. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,001$  comparando con los músculos *WT*. El número de placas analizadas en cada condición experimental varió entre 15 y 25 (N=4 animales). El recuadro interno muestra la combinación de los datos (\*  $p < 0,05$  vs  $\text{Ca}_v2.2^{+/+}$ ).

## 5 - RESULTADOS

---

Luego de un período de incubación de 4 h, la mitad de las muestras analizadas incrementaron significativamente la liberación de acetilcolina de los terminales *WT*, llevando la frecuencia de actividad espontánea a valores entre 40 y 60 veces mayores a los iniciales (**Tabla 5.1**;  $p < 0,001$  comparando los animales  $Ca_v2.1^{+/+}$  versus  $Ca_v2.1^{-/-}$ ). A pesar de que los preparados de músculo de los ratones de la línea sv129 resultaron ser más sensibles al efecto de los anticuerpos que los correspondientes a Swiss (**Figura 5.2B**), es importante destacar que ambos resultados están esencialmente en concordancia.

Interesantemente, aquellos anticuerpos que promovieron un incremento en la tasa de liberación de neurotransmisor en la PNM no fueron capaces de aumentar la frecuencia de MEPPs por encima de los valores iniciales en los músculos de los ratones  $Ca_v2.1^{-/-}$  (**Tabla 5.1**;  $p < 0,001$  comparando los animales *WT* y  $Ca_v2.1^{-/-}$ ). Sin embargo, todos los preparados de los ratones nulos para la subunidad  $Ca_v2.1$  retuvieron su habilidad de responder a un estímulo despolarizante (KCl 15 mM) incrementando significativamente su frecuencia de actividad espontánea luego de un período de incubación de 10 min (**Tabla 5.2**;  $p < 0,001$  comparando la frecuencia de KCl con la inicial y la de 4 h).

## 5 - RESULTADOS

**Tabla 5.1:** Frecuencia de MEPPs normalizada al comienzo del experimento, luego de 4 h de incubación con las IgGs-ELA indicadas. Entre paréntesis se detalla el número de fibras analizadas (provenientes de 4 animales por genotipo).

		genotipo			
		Ca <sub>v</sub> 2.1 <sup>+/+</sup>		Ca <sub>v</sub> 2.1 <sup>-/-</sup>	
		0 h	4 h	0 h	4 h
Paciente	ELA2	1,00±0,09 (28)	45±11 <sup>†</sup> (17)	1,00±0,09 (23)	0,79±0,07* (20)
	ELA5	1,00±0,09 (19)	59±8 <sup>†</sup> (17)	1,00±0,08 (23)	0,73±0,07* (21)
	ELA7	1,00±0,07 (39)	0,70±0,05 (33)	1,0±0,1 (21)	0,78±0,09 (20)
	ELA8	1,0±0,4 (23)	0,54±0,07 (19)	1,0±0,1 (15)	1,0±0,2 (14)

<sup>†</sup>  $p < 0,001$  vs frecuencia inicial

\*  $p < 0,001$  vs frecuencia de Ca<sub>v</sub>2.1<sup>+/+</sup>

**Tabla 5.2:** Frecuencia de MEPPs de músculo diafragma Ca<sub>v</sub>2.1<sup>-/-</sup> al comienzo del experimento y luego de una incubación secuencial de 4 h con la IgG-ELA5 y 10 min con una solución de KCl 15 mM. Entre paréntesis se detalla el número de fibras analizadas (provenientes de 2 animales).

	0 h	4 h	KCl 15 mM
ELA5	1,00±0,08 (7)	0,9±0,1 (7)	69±14* (7)

\*  $p < 0,001$  vs frecuencia inicial y 4 h

### 5.4 - Estudio de la inmuno-marcación de las IgGs-ELA en cerebelo, corteza cerebral y médula espinal

Para caracterizar en mayor detalle la reactividad de los anticuerpos de ELA utilizando otros sustratos neuronales relevantes para la patofisiología de la enfermedad, realizamos ensayos de inmuno-fluorescencia en cortes de médula espinal y corteza cerebral de ratones.

La gran mayoría de los anticuerpos de los pacientes con ELA presentaron una afinidad significativa hacia las estructuras motoneuronales del asta ventral, especialmente hacia el citoplasma celular (**Figura 5.7**). Esto llevó a que los datos agrupados también resultaran significativamente más elevados comparados con los CS (**Figura 5.7B**; recuadro interno).

## 5 - RESULTADOS

---

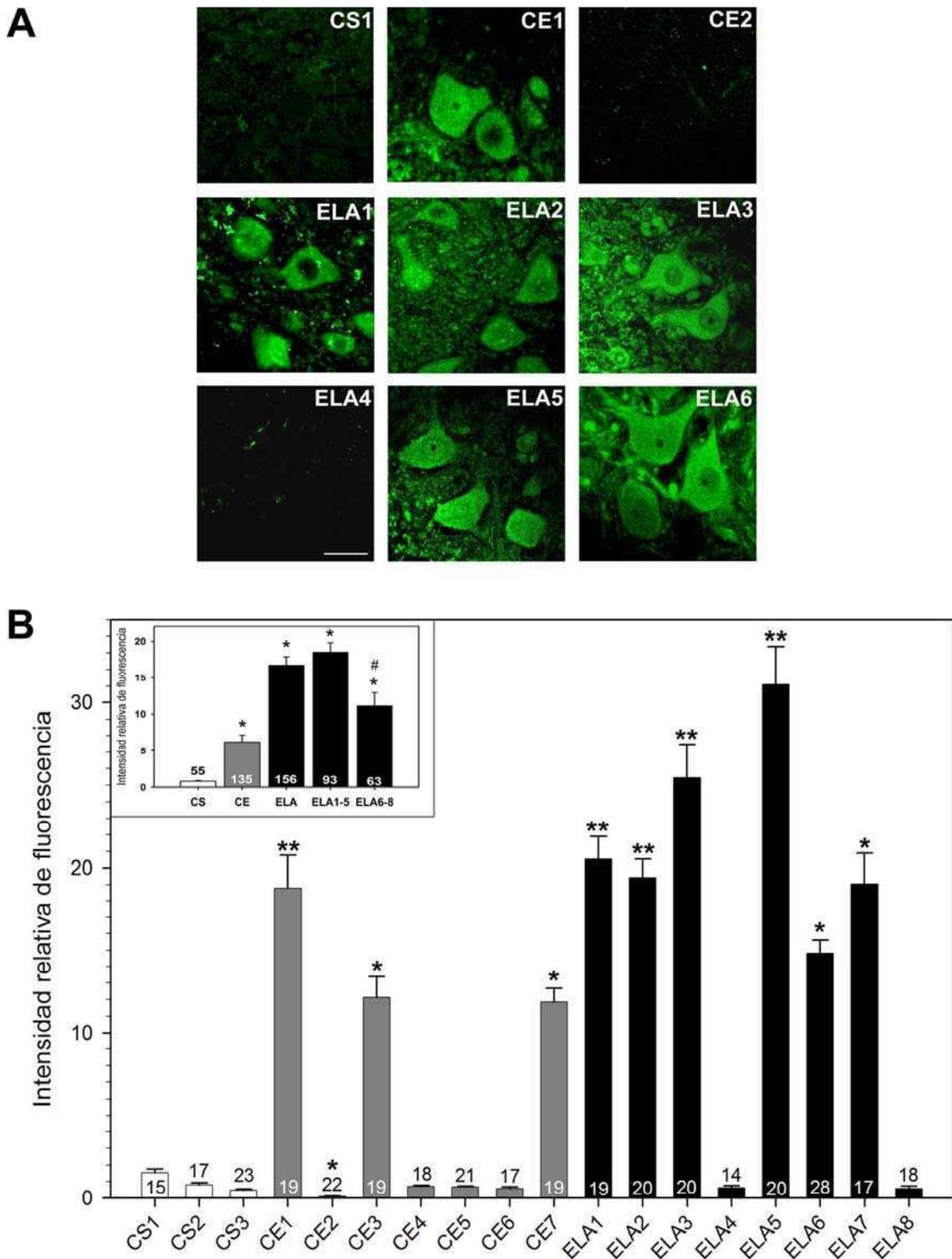
Algunos anticuerpos revelaron además capacidad de unión a los componentes nucleares, como puede observarse para ELA5 (**Figura 5.7A**).

El patrón obtenido en la médula espinal, sin embargo, no resultó similar al hallado en los cortes de músculo diafragma, ya que tanto las muestras que reaccionaron con la PNM como las que no lo hicieron, exhibieron interacción con las neuronas motoras. Este resultado se ve reflejado en la separación de los datos en estos dos grupos (**Figura 5.7B**; recuadro interno). Sin embargo, existe una tendencia significativa de las muestras ELA6-8 a presentar una menor reactividad hacia las motoneuronas inferiores respecto de las ELA1-5, comportamiento que ya se había apreciado en la PNM, con diferencias más acentuadas.

En cuanto a los controles sanos, todas las muestras evaluadas mostraron niveles de inmuno-reactividad dentro de los valores basales. Por su parte, los anticuerpos de cuatro CE exhibieron diferencias respecto de los CS, con valores ya sea por encima (CE1, CE3 y CE7) o por debajo de estos últimos (CE2), haciendo que los CE sean en forma colectiva significativamente más elevados (**Figura 5.7B**; recuadro interno).

Al analizar la unión de los anticuerpos a las rodajas conteniendo la corteza motora primaria de ratón, ninguna de las muestras de los pacientes con ELA o los individuos controles exhibió una afinidad por el tejido mayor a la unión no específica presente en el control de isotipo (resultados no mostrados).

## 5 - RESULTADOS



**Figura 5.7: Inmuno-fluorescencia de la médula espinal.**

Las secciones (150  $\mu$ m) de médula espinal de los ratones fueron incubadas con las IgGs purificadas de los pacientes con ELA, CS o CE. La presencia de los anticuerpos primarios fue revelada usando un secundario anti-IgG<sub>humano</sub> acoplado a FITC.

A) Imágenes representativas de las motoneuronas residentes en el asta ventral de la médula espinal. Barra: 25  $\mu$ m. Aumento = 600X.

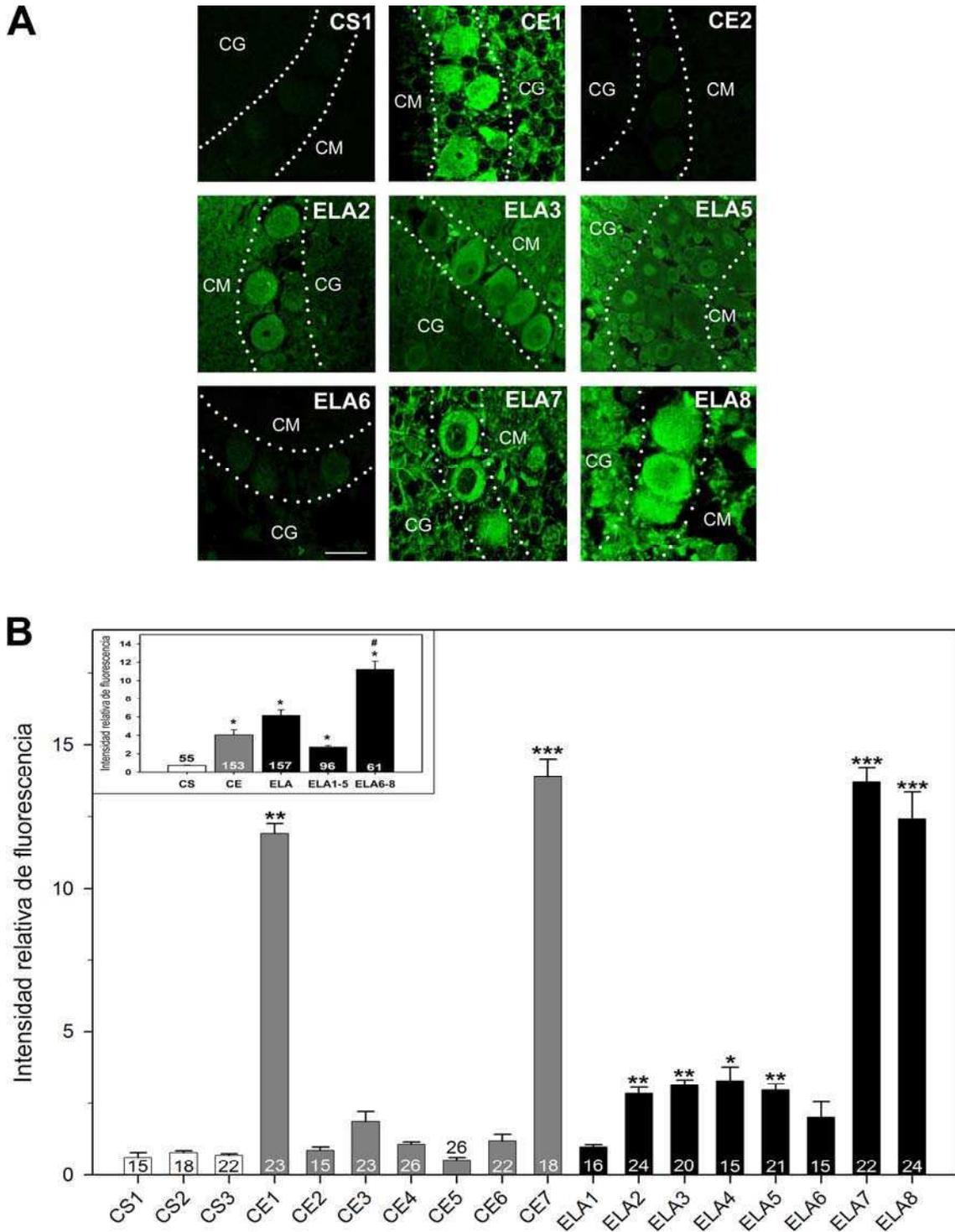
B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en el soma de las motoneuronas, normalizada al control de isotipo. \*  $p < 0,01$  y \*\*  $p < 0,001$  comparando con los CS. El recuadro interno muestra la combinación de los datos (\*  $p < 0,001$  vs CS y #  $p < 0,01$  vs ELA1-5). El número dentro de las barras indica la cantidad de células estudiadas en cada condición experimental (N=5 animales). Barras blancas = CS, barras grises = CE, barras negras = ELA.

## 5 - RESULTADOS

---

Un análisis similar en los cortes de cerebelo reveló que la mayoría de las IgGs-ELA mostraron afinidad por los antígenos presentes en las células de Purkinje (**Figura 5.8**;  $p < 0,05$  comparando ELA versus el control de isotipo). Este patrón dio lugar a que los datos de ELA agrupados (ya sea en su totalidad o separados en ELA1-5 y ELA6-8) resultaran significativamente mayores a los controles sanos (**Figura 5.8B**; recuadro interno). Por su parte, el grupo ELA6-8 también evidenció un aumento considerable respecto al ELA1-5. La mayor parte de las muestras evidenciaron afinidad principalmente hacia los componentes somáticos de estas neuronas (**Figura 5.8A**; ELA3 y ELA7), mientras que otras mostraron unión hacia antígenos principalmente nucleares (ELA5) o contra ambos en diferente grado (ELA2 y ELA8). La inmuno-reactividad hacia las células residentes en las capas molecular y granular del cerebelo fue considerablemente menor a la encontrada hacia las neuronas de Purkinje, excepto para la muestra ELA5 donde se pudo apreciar una generalizada tinción de los núcleos celulares. Además, para el caso de ELA3 se observó una unión de los anticuerpos hacia componentes citoplasmáticos de las células de la capa molecular y granular.

## 5 - RESULTADOS



**Figura 5.8: Inmuno-fluorescencia de cerebelo.**

Los cortes (150  $\mu\text{m}$ ) de cerebelo de los ratones se incubaron con las IgGs purificadas de los pacientes con ELA, CS o CE. La presencia de los anticuerpos primarios fue revelada usando un anticuerpo anti-IgG<sub>humano</sub> acoplado a FITC.

A) Micrografías confocales representativas de las neuronas de Purkinje. M y G denotan las capas cerebelares molecular y granular, respectivamente. Barra: 25  $\mu\text{m}$ . Aumento = 600X.

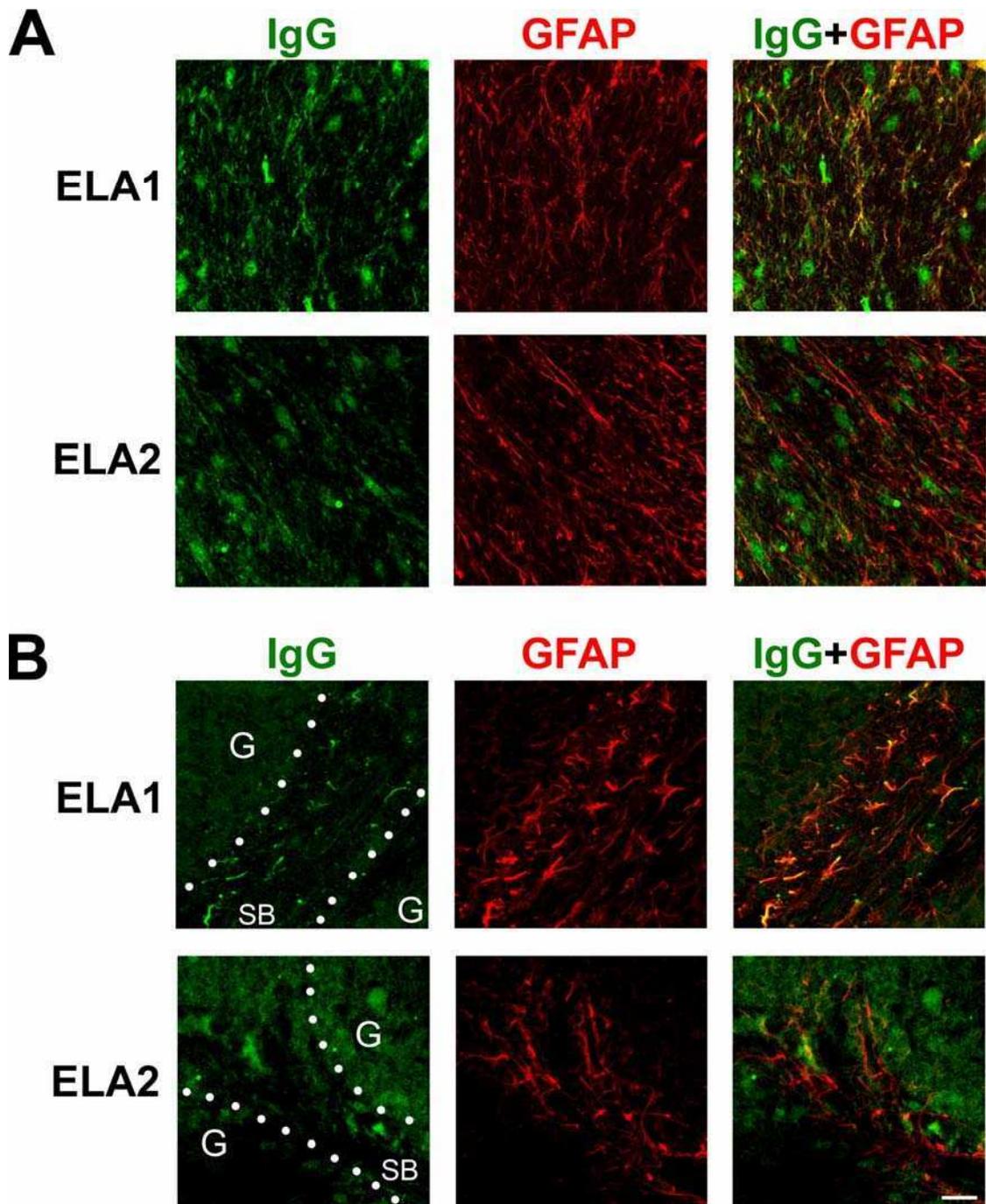
B) Determinación de la intensidad de fluorescencia en el soma de las células de Purkinje, normalizada al control de isotipo. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  comparando con los CS. El recuadro interno muestra la combinación de los datos (\*  $p < 0,001$  vs CS y #  $p < 0,001$  vs ELA1-5). El número dentro de las barras indica la cantidad de células estudiadas en cada condición experimental (N=7 animales). Barras blancas = CS, barras grises = CE, barras negras = ELA.

## 5 - RESULTADOS

---

Por su parte, ninguno de los controles sanos reveló una unión apreciable a las estructuras cerebelares (**Figura 5.8**;  $p > 0,05$  comparando los controles sanos versus el control de isotipo), mientras que dos de las muestras de CE (CE1 y CE7) interactuaron significativamente con los antígenos de esta estructura. Para el caso de CE1, esta interacción se produjo tanto hacia componentes nucleares como citoplasmáticos (**Figura 5.8A**), mientras que CE7 evidenció afinidad mayormente por estos últimos (resultado no mostrado).

Realizando un estudio más detallado sobre el tipo celular hacia el cuál los anticuerpos estaban reaccionando, encontramos que algunas de las muestras presentaron afinidad por astrocitos, tanto en la médula espinal (**Figura 5.9A**, ELA1) como en cerebelo (**Figura 5.9B**, ELA1). Esta característica se hizo evidente por la elevada co-localización de la señal de las IgGs-ELA con la del marcador astrocítico GFAP (proteína glial fibrilar acídica). Sin embargo, la presencia de estos anticuerpos anti-astrocitos no fue un fenómeno generalizado, como se muestra en la **Figura 5.9** para el caso de ELA2. En los cortes espinales también pudo apreciarse unión de los anticuerpos de ELA a otros tipos celulares.



**Figura 5.9: Inmuno-reactividad de IgGs-ELA hacia astrocitos.**

Las rodajas (50  $\mu\text{m}$ ) de tejido de ratones  $\text{Ca}_v2.1^{+/+}$  (P18) fueron incubadas con las IgGs purificadas de pacientes con ELA (primera columna) junto con un anticuerpo específico contra una proteína astrocítica, GFAP (segunda columna). La detección de los anticuerpos primarios se realizó con un secundario anti-IgG<sub>humano</sub> acoplado a FITC y un anti-IgG<sub>conejo</sub> unido a TMR, respectivamente. En la última columna se muestra la superposición de ambos canales. Barra: 20  $\mu\text{m}$ . Aumento = 600X.

A) Micrografías confocales representativas de cortes de médula espinal lumbar, en la región correspondiente a la sustancia blanca próxima a las neuronas motoras.

B) Imágenes tomadas de secciones de cerebelo, en la zona de sustancia blanca (SB) ubicada entre dos capas de células granulares (G).

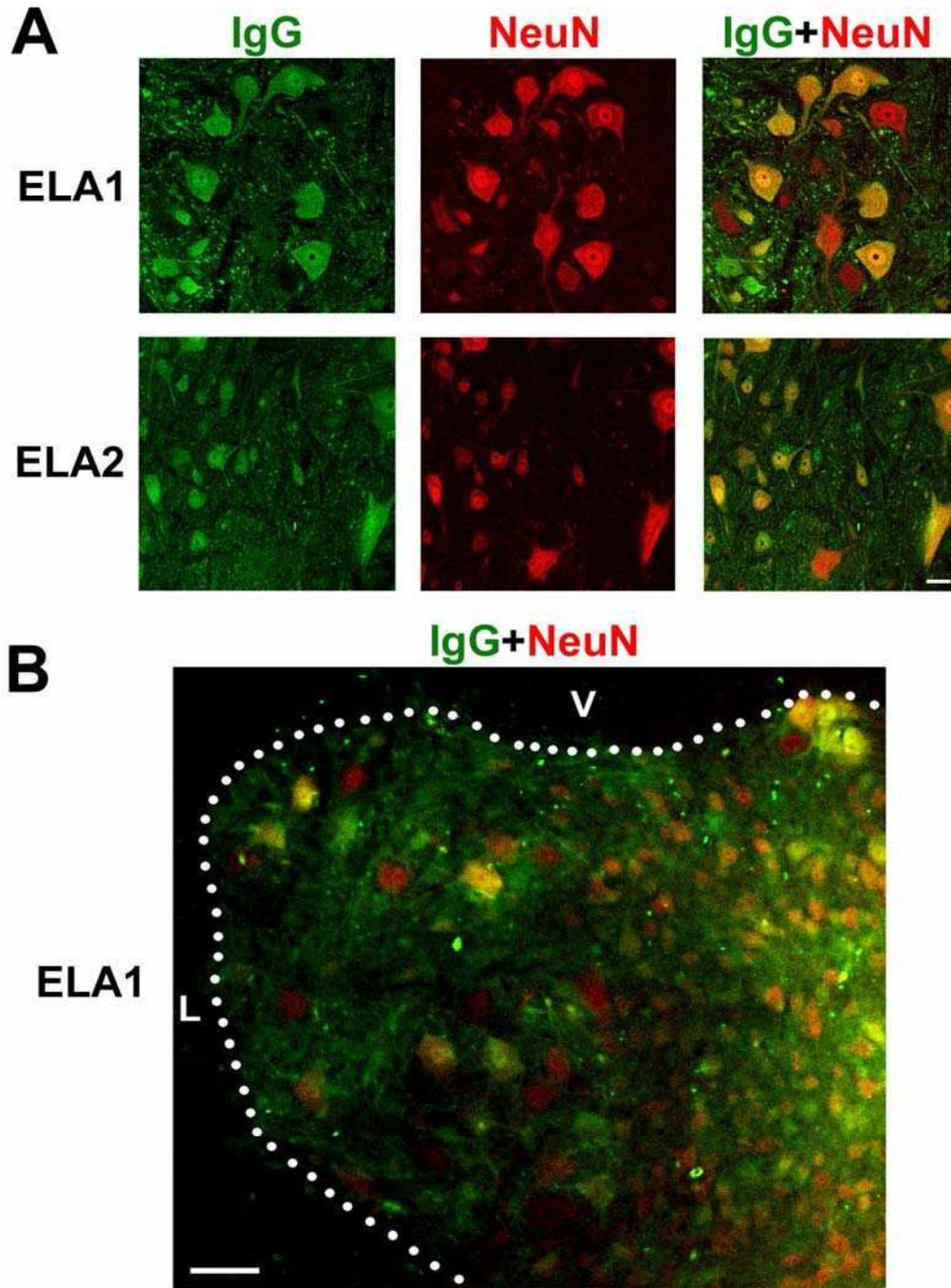
## 5 - RESULTADOS

---

En lo que respecta a la inmuno-reactividad hacia neuronas del asta ventral, encontramos que no todas las motoneuronas marcadas con el anticuerpo anti-NeuN (una proteína neuronal nuclear) unieron IgGs de pacientes con ELA (**Figura 5.10A**, células rojas en la última columna). Sin embargo, la localización de estas motoneuronas NeuN<sup>+</sup> IgG-ELA<sup>-</sup> no mostró ninguna preferencia por regiones ventro-mediales o ventro-laterales (**Figura 5.10B**), encontrándose a todo lo largo del eje medio-lateral. También pudo observarse que los anticuerpos de pacientes tiñeron otros tipos celulares no neuronales de tamaño relativamente menor (**Figura 5.10A**, células verdes en la última columna).

Tampoco se encontró ninguna distribución preferencial de las células NeuN<sup>+</sup> IgG-ELA<sup>-</sup> en otras regiones espinales (como la médula torácica), ni correlación de la intensidad de marca de las IgGs humanas con niveles de expresión de proteínas *buffers* de Ca<sup>2+</sup> como parvalbúmina o calbindina (resultados no mostrados).

El mismo tipo de estudio realizado sobre cortes de cerebelo reveló una marca general de las IgGs-ELA hacia neuronas granulares (**Figura 5.11**, capa granular), con diferentes grados de inmuno-reactividad entre muestras. En esta capa de la corteza cerebelar también se observó una tinción muy evidente hacia células NeuN<sup>-</sup> (**Figura 5.11**, capa granular, flechas), que sin embargo mostraron una importante expresión del marcador de neuronas GABAérgicas GAD<sup>65/67</sup> (**Figura 5.12**, capa granular, flechas). Por su parte, la marca de IgGs-ELA en la capa molecular se encontró asociada tanto al soma de células NeuN<sup>+</sup> (**Figura 5.11**, capa molecular) como a procesos de neuronas GABAérgicas (**Figura 5.12**, capa molecular).

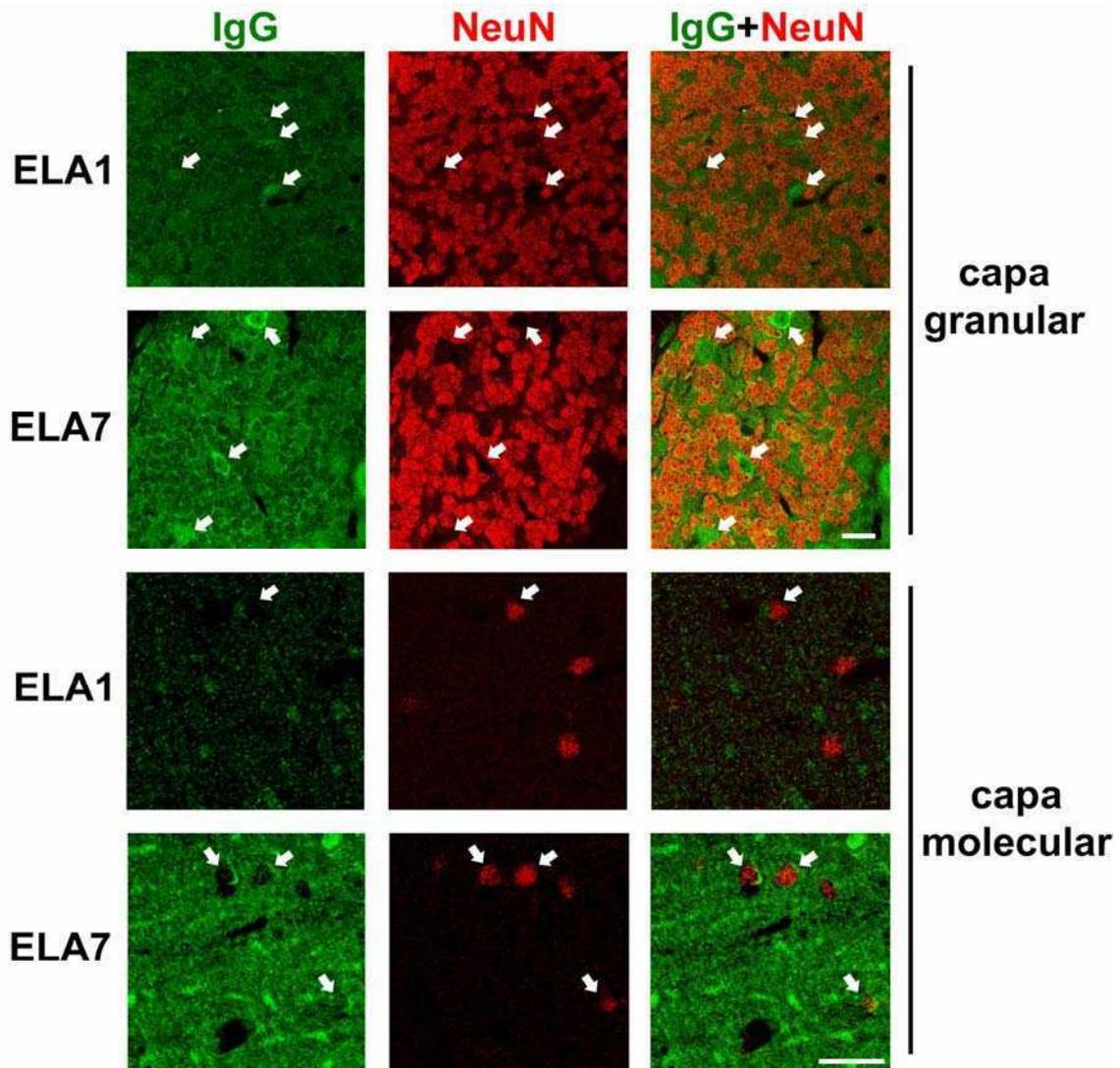


**Figura 5.10: Inmuno-reactividad de IgGs-ELA hacia motoneuronas inferiores.**

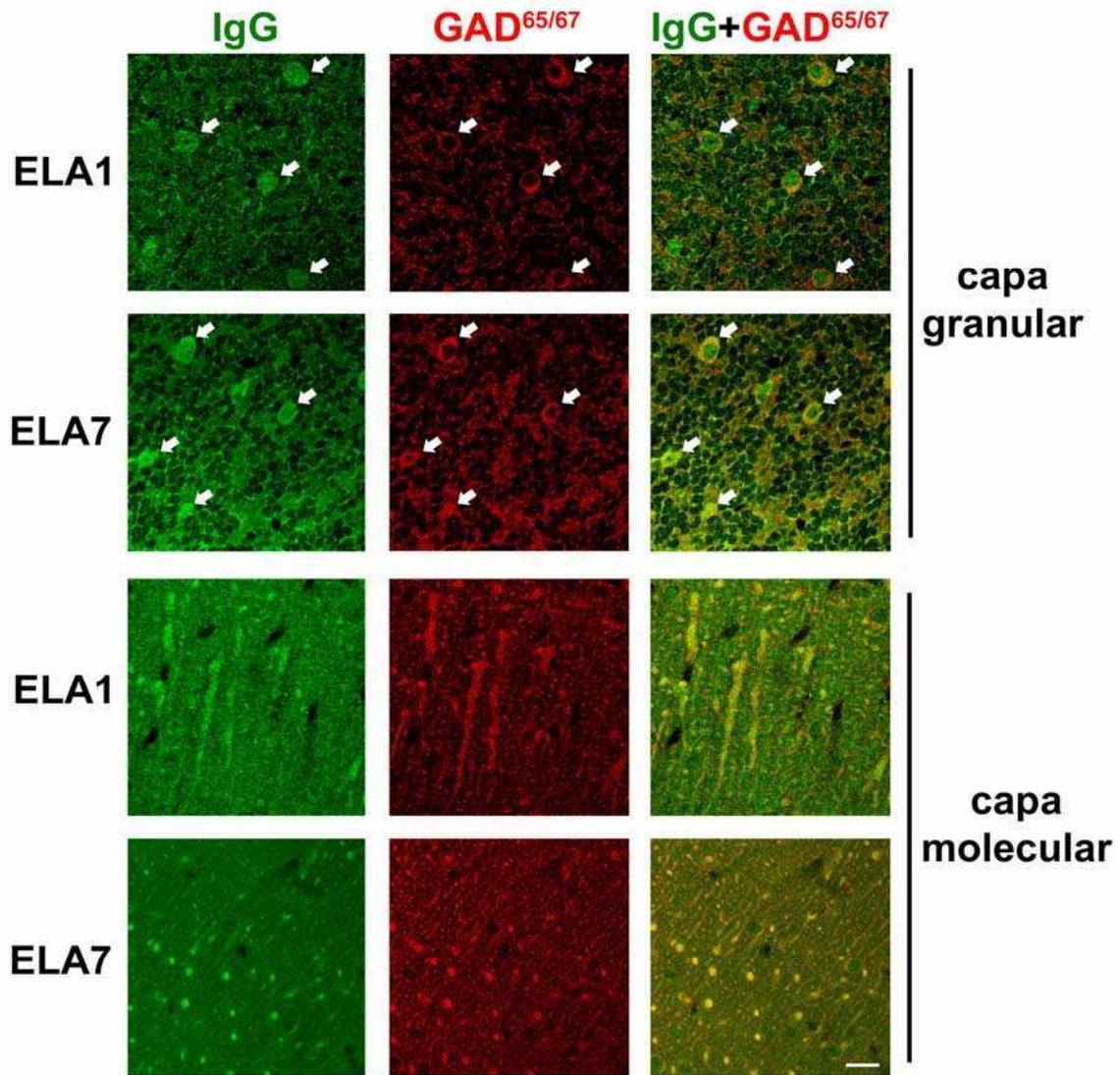
Las secciones (50  $\mu\text{m}$ ) de médula espinal lumbar de ratones  $\text{Ca}_v2.1^{+/+}$  (P18) fueron incubadas con las IgGs purificadas de pacientes con ELA junto con un anticuerpo contra un marcador neuronal nuclear, NeuN. La detección de los anticuerpos primarios se llevó a cabo con un secundario anti-IgG<sub>humano</sub> acoplado a FITC y un anti-IgG<sub>ratón</sub> conjugado con TMR, respectivamente.

A) Micrografías confocales representativas de la zona del asta ventral. En la última columna se muestra la superposición de ambos canales. Barra: 20  $\mu\text{m}$ . Aumento = 600X.

B) Imágenes tomadas a menor aumento que en A correspondiente a toda la región del asta ventral. En la misma se encuentra delimitado el borde de la sustancia gris (línea punteada) y se especifica la orientación del corte (L = lateral, V = ventral). Se muestra solamente la superposición de la señal de los canales verde y rojo. Barra: 50  $\mu\text{m}$ . Aumento = 200X.



**Figura 5.11: Inmuno-fluorescencia de IgGs-ELA y neuronas cerebelares.**  
 Las rodajas (50  $\mu\text{m}$ ) de tejido de ratones  $\text{Ca}_v2.1^{+/+}$  (P18) fueron incubadas con las IgGs purificadas de pacientes con ELA (primera columna) y con un anticuerpo contra NeuN (segunda columna). La detección de los anticuerpos primarios se realizó con un secundario anti-IgG<sub>humano</sub> acoplado a FITC y un anti-IgG<sub>ratón</sub> unido a TMR, respectivamente. En la última columna se muestra la superposición de ambos canales. En las micrografías correspondientes a la capa granular se señalan con flechas aquellas células NeuN-negativas marcadas con las IgGs-ELA, mientras que en los paneles inferiores se denotan células doble positivas. Barras: 20  $\mu\text{m}$ . Aumento = 600X.



**Figura 5.12: Inmuno-reactividad de IgGs-ELA hacia interneuronas cerebelares.**

Las secciones (50  $\mu$ m) de cerebelo de los ratones salvajes (P18) fueron incubadas con las IgGs purificadas de pacientes con ELA (primera columna) y con un anticuerpo contra un marcador de neuronas GABAérgicas,  $GAD^{65/67}$  (segunda columna). La detección de los anticuerpos primarios se realizó con un secundario anti-IgG<sub>humano</sub> acoplado a FITC y un anti-IgG<sub>conejo</sub> unido a TMR, respectivamente. En la última columna se muestra la superposición de los canales. En las fotos de la capa granular se marcan con flechas aquellas interneuronas GABAérgicas (GAD-positivas) con una señal significativa de IgGs-ELA. Barra: 20  $\mu$ m. Aumento = 600X.

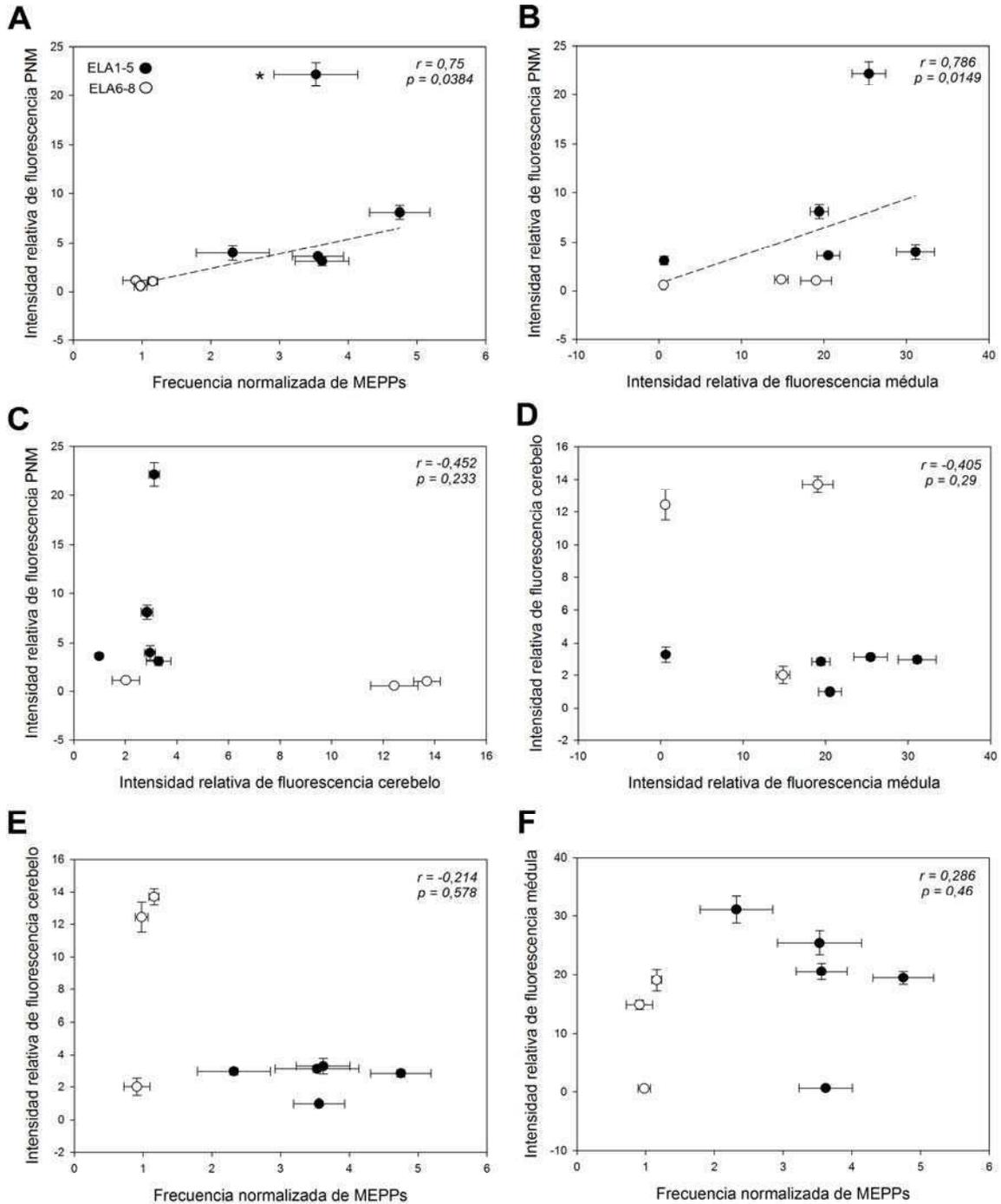
### **5.5 - Correlación entre la modulación sináptica y la inmunoreactividad tisular**

Realizando un estudio involucrando todos los parámetros analizados hasta el momento se encontró que existía una correlación significativa entre el grado de unión de los anticuerpos ELA a la PNM y tanto la frecuencia de potenciales miniatura (**Figura 5.13A**) como el grado de tinción de las motoneuronas espinales (**Figura 5.13B**). Esta correlación estuvo ausente al realizar la comparación con la inmunoreactividad en las neuronas de Purkinje (**Figura 5.13C**). Por otro lado, no se encontró relación al analizar una posible asociación entre la modulación sináptica y la interacción de las IgGs-ELA con el tejido cerebelar (**Figura 5.13E**) o espinal (**Figura 5.13F**). Estos últimos parámetros tampoco mostraron un comportamiento similar al ser analizados por el *test* de correlación (**Figura 5.13D**).

### **5.6 - Efecto de la delección de $Ca_v2.1$ sobre la reactividad de las IgGs-ELA hacia el sistema nervioso central**

Nuestro próximo paso consistió en establecer si la interacción de los anticuerpos de ELA con las estructuras neurales centrales mencionadas previamente dependía de la presencia de la subunidad  $Ca_v2.1$ , como había sido apreciado en los experimentos con la PNM (**Figura 5.5**), o si se trataba de un fenómeno solo presente en los terminales motoneuronales.

## 5 - RESULTADOS



**Figura 5.13: Correlación entre la immuno-reactividad y la inducción sináptica.**

En los gráficos se muestra la relación entre la frecuencia de potenciales miniatura (MEPPs) y la intensidad de fluorescencia en todas las estructuras neuronales estudiadas. En el extremo superior derecho de cada recuadro se detalla el valor del coeficiente de correlación de Spearman ( $r$ ) junto con su significancia estadística ( $p$ ). El análisis de correlación comprendió los datos de todos los pacientes ELA, excepto en A donde se excluyó el punto señalado con el asterisco. En A y B (las únicas correlaciones significativas) se incluyó además el ajuste lineal de los datos (línea cortada). Los datos para la confección de los gráficos fueron extraídos de las Figuras 5.2B, 5.4, 5.7B y 5.8B.

## 5 - RESULTADOS

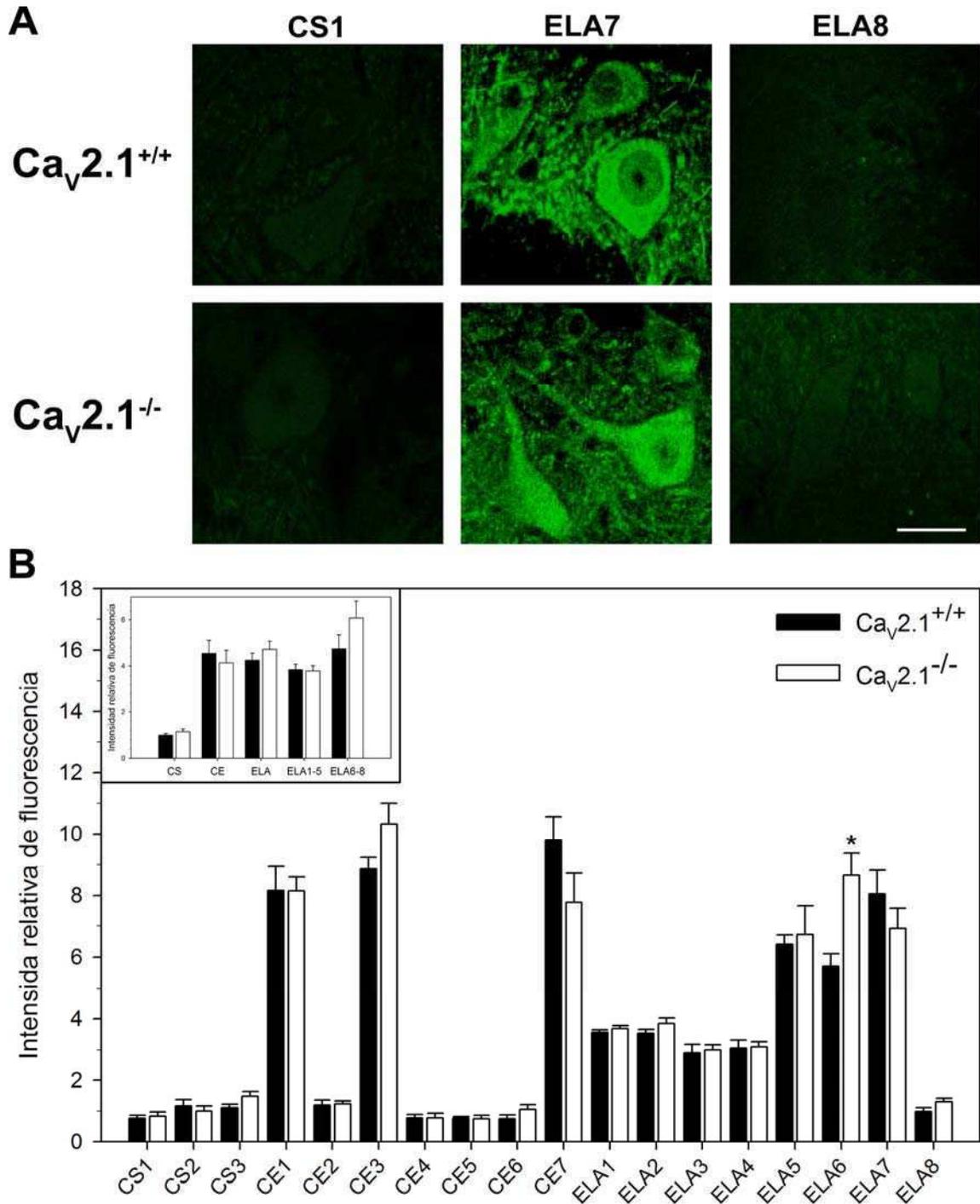
---

La ausencia de la subunidad  $\alpha_1$  que participa en la formación del poro del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q no modificó en forma apreciable los niveles de inmuno-marcación en las rodajas de tejido espinal, como puede observarse en la **Figura 5.14**. La única excepción fue la muestra ELA6, la cual mostró una mayor interacción hacia las motoneuronas inferiores de los animales transgénicos (**Figura 5.14B**).

Por otro lado, si bien la intensidad de marca obtenida en estos ensayos es menor en comparación con los experimentos realizados con la línea Swiss (**Figura 5.7**), el grupo de las muestras que presentó anticuerpos contra componentes motoneuronales en ambos casos es esencialmente idéntico.

Con respecto a los ensayos realizados en cerebelo, no se encontró una diferencia marcada entre los ratones salvajes y los carentes de la subunidad  $\text{Ca}_v2.1$  (**Figura 5.15**). Sin embargo, sí se encontró una interacción con el animal transgénico significativamente mayor para el caso de la muestra ELA7 (**Figura 5.15B**), hecho que contribuyó a que el grupo no reactivo hacia la PNM mostrara un ligero incremento en su unión al soma de las neuronas de Purkinje (**Figura 5.15B**; recuadro interno). Adicionalmente, los anticuerpos purificados del CS3 evidenciaron un ligero decremento en su unión al tejido cerebelar de los animales  $\text{Ca}_v2.1^{-/-}$  (**Figura 5.15B**).

## 5 - RESULTADOS



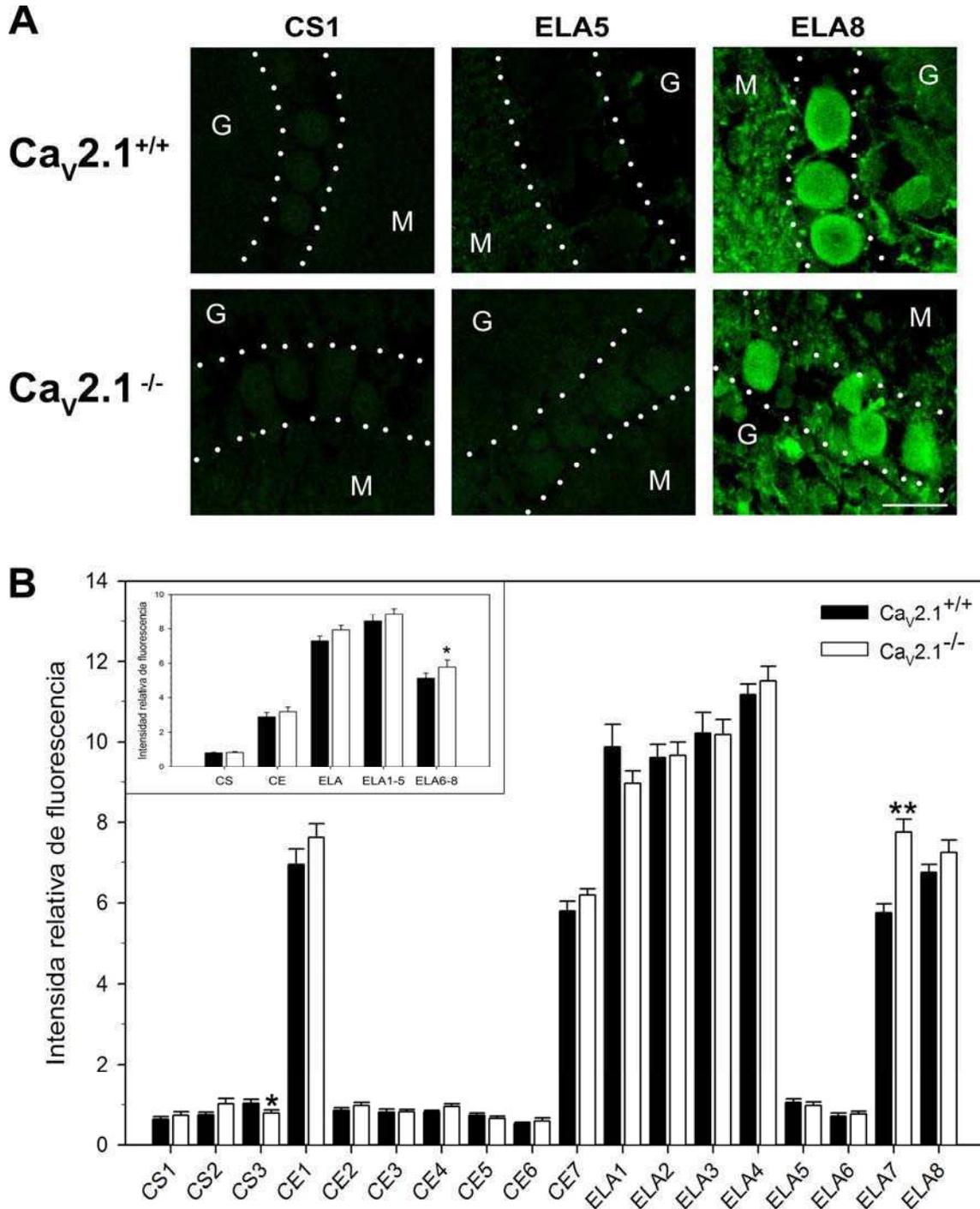
**Figura 5.14: Inmuno-fluorescencia de médula espinal de los ratones carentes del canal de Ca<sup>2+</sup> tipo P/Q.**

Los cortes (150  $\mu$ m) de la médula espinal de los ratones Ca<sub>v</sub>2.1<sup>-/-</sup> o WT (P16-23) fueron incubados con las IgGs purificadas de los pacientes con ELA, CS o CE. La detección de los anticuerpos primarios se realizó según lo descrito anteriormente.

A) Imágenes representativas de las motoneuronas residentes en el asta ventral de la médula espinal. Barra: 25  $\mu$ m. Aumento = 600X.

B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en el soma de las motoneuronas espinales, normalizada al control de isotipo. \* p<0,01 comparado con WT. El número de células analizadas en cada condición experimental varió entre 15 y 24 (N=4 animales). El recuadro interno muestra la combinación de los datos.

## 5 - RESULTADOS



**Figura 5.15: Inmuno-fluorescencia de cerebelo de ratones carentes del canal de Ca<sup>2+</sup> de tipo P/ Q.**

Las rodajas (150 μm) de cerebelo de los ratones Ca<sub>v</sub>2.1<sup>-/-</sup> o WT (P16-23) fueron incubadas con las IgGs purificadas de los pacientes con ELA, CS o CE. La detección de los anticuerpos primarios se realizó según lo descrito anteriormente.

A) Micrografías confocales representativas de las neuronas de Purkinje. M y G denotan las capas cerebelares molecular y granular, respectivamente. Barra: 25 μm. Aumento = 600X.

B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en el soma de las células de Purkinje, normalizada al control de isotipo. \*  $p < 0,01$  y \*\*  $p < 0,001$  comparado con WT. El número de células analizadas en cada condición experimental varió entre 15 y 39 (N=5 animales). El recuadro interno muestra la combinación de los datos (\*  $p < 0,05$  vs Ca<sub>v</sub>2.1<sup>+/+</sup>).

## 5 - RESULTADOS

---

Cabe destacar que en términos generales, el patrón de unión obtenido hacia el tejido cerebelar de los animales salvajes fue similar al observado anteriormente en los ratones de la cepa Swiss (**Figura 5.8**). La tinción observada con las muestras de ELA, sin embargo, resultó más homogénea en términos de intensidad, en contraste con la marcada diferencia existente entre las muestras reactivas hacia la PNM y las no reactivas, encontrada en los primeros experimentos.

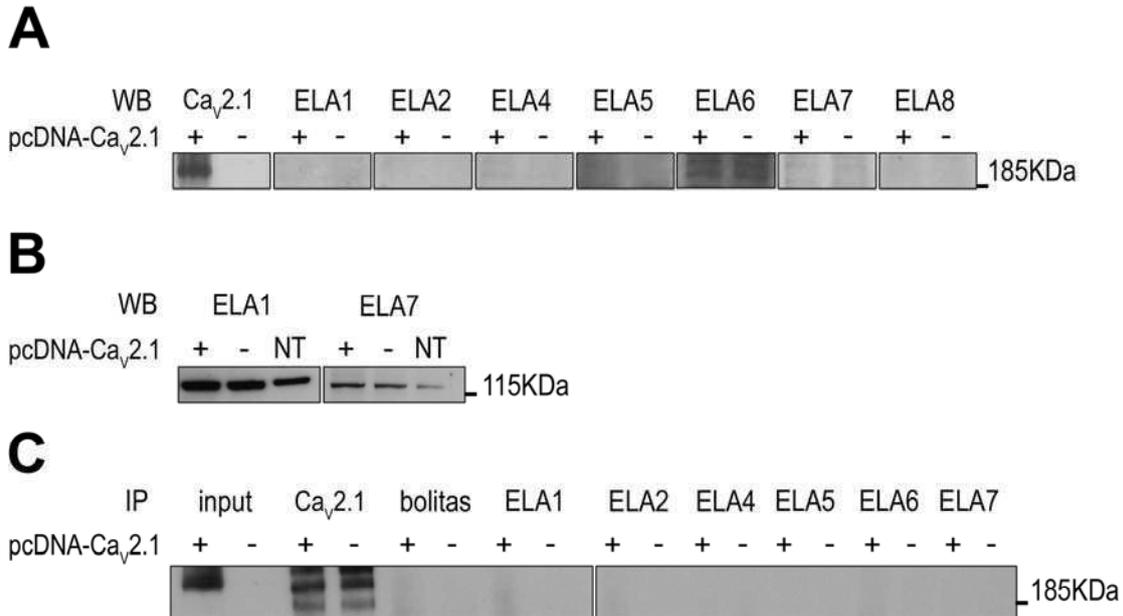
### 5.7 - Análisis de la interacción de las IgGs-ELA con la subunidad $\alpha_1$ del canal de $\text{Ca}^{2+}$ de tipo P/ Q y otras proteínas presinápticas

Dada la correlación sustancial encontrada entre la expresión de la subunidad  $\alpha_1$  del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q y tanto la unión como la modulación sináptica ejercida por los anticuerpos de ELA sobre la PNM, decidimos evaluar una posible interacción directa de dichas IgGs con las subunidades del canal de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Para ello utilizamos la línea celular HEK293, un sistema de expresión heterólogo muy utilizado en neurobiología (Thomas y Smart 2005). Transfectamos las células con las subunidades  $\text{Ca}_v2.1$ ,  $\beta_{2a}$  y  $\alpha_2\delta$ , y analizamos los lisados celulares por *western blot* en búsqueda de reactividad contra alguna banda que co-migrara con la subunidad  $\text{Ca}_v2.1$ .

El análisis de las membranas reveló que ninguna de las muestras evaluadas mostró afinidad hacia la subunidad formadora del poro, al menos en las condiciones desnaturizantes en las que se llevó a cabo el ensayo (**Figura 5.16A**). Por su parte, como muestra la **Figura 5.16B**, algunas de las IgGs-ELA reaccionaron con una proteína desconocida cuyo peso molecular era en principio similar al correspondiente para la subunidad  $\alpha_2\delta$ .

## 5 - RESULTADOS



**Figura 5.16: Interacción de los anticuerpos de ELA con el canal P/Q transfectado.**

Las células sobre-expresaron solo las subunidades accesorias ( $\beta_{2a}$  y  $\alpha_2\delta_2$ , -) o el canal P/Q intacto (Ca<sub>v</sub>2.1,  $\beta_{2a}$  y  $\alpha_2\delta_2$ , +). Las interacciones con los anticuerpos de ELA se evaluaron 36 h post-transfección.

A) y B) *Western blot* de los lisados de células HEK293 transfectadas (+, -) o no transfectadas (NT). Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos de los pacientes ELA (1:500) o con un anticuerpo policlonal de conejo anti-Ca<sub>v</sub>2.1 (1:10.000) como control de la expresión. En B se exhibe la misma membrana en una región de peso molecular diferente a la mostrada en A. C) Ensayo de inmuno-precipitación de células HEK293 transfectadas, utilizando las IgGs-ELA o un anticuerpo anti-Ca<sub>v</sub>2.1 como control positivo. Una alícuota del lisado original (40  $\mu$ g) fue corrida en el mismo gel para chequear la correcta expresión de la subunidad Ca<sub>v</sub>2.1 (*input*). También se analizó en paralelo un control negativo por omisión de los anticuerpos (bolitas).

(masa estimada: 130 kDa). Debido a que dicha banda también fue detectada en las células no transfectadas, se desestimó su posterior estudio.

Paralelamente utilizamos una aproximación diferente para investigar la posibilidad de que los anticuerpos de ELA interactuaran directa o indirectamente con el canal de Ca<sup>2+</sup>, realizando ensayos de inmuno-precipitación con los extractos de células transfectadas con las subunidades de dicho canal.

## 5 - RESULTADOS

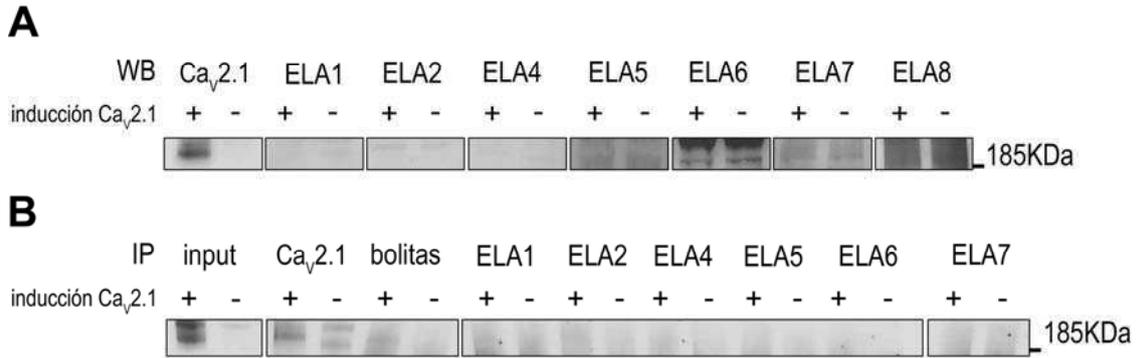
---

A pesar de que la subunidad Ca<sub>v</sub>2.1 pudo ser detectada fácilmente en los lisados originalmente utilizados para el ensayo de inmuno-precipitación, ninguna de las muestras testeadas mostró una interacción apreciable con el canal de tipo P/Q (**Figura 5.16C**).

Adicionalmente, empleamos un sistema alternativo de expresión del canal de Ca<sup>2+</sup> de tipo P/Q (**Figura 5.17**). En dichos experimentos se utilizó una línea celular derivada de la HEK293 que expresaba este canal en forma estable e inducible por tetraciclina (línea T-Rex293). Los resultados encontrados fueron esencialmente los mismos que los observados con la transfección transiente del canal (**Figuras 5.16A y 5.16C**).

Empleando el mismo tipo de ensayo, también evaluamos varias muestras en búsqueda de reactividad contra proteínas presentes en la pre-sinapsis de un extracto de sinaptosomas de cerebelo, tales como sinaptotagmina I, syntaxina 1A, sinaptofisina y sinaptobrevina II (**Figura 5.18**). En ninguno de los casos testeados pudimos detectar una interacción entre las IgGs-ELA analizadas y dichos componentes pre-sinápticos, a pesar de que estos últimos resultaron ser fácilmente detectables, ya sea en la fracción proteica utilizada para el ensayo (*input*) y/o en el control positivo del mismo (**Figura 5.18**; PRE).

## 5 - RESULTADOS

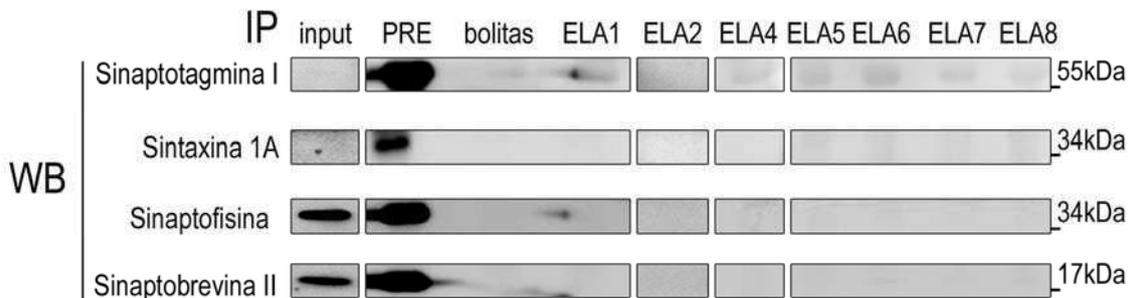


**Figura 5.17: Interacción de los anticuerpos de ELA con el canal de Ca<sup>2+</sup> de tipo P/ Q inducido.**

Las células sobre-expresaron solo las subunidades accesorias ( $\beta_{2a}$  y  $\alpha_2\delta_2$ , -) o el canal P/Q intacto (Ca<sub>v</sub>2.1,  $\beta_{2a}$  y  $\alpha_2\delta_2$ , +). Las interacciones con los anticuerpos de ELA se evaluaron 48 h post-inducción.

A) *Western blot* de los lisados de células T-rax293 expuestas (+) o no (-) al agente inductor tetraciclina durante 48 h. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos de pacientes con ELA (1:500) o con un anticuerpo anti-Ca<sub>v</sub>2.1 (1:10.000) como control de la expresión.

B) Experimentos de inmuno-precipitación de células T-rax293 inducidas (+) o no inducidas (-), utilizando las IgGs-ELA o un anticuerpo anti-Ca<sub>v</sub>2.1 como control positivo. Una fracción del lisado original (50  $\mu$ g) fue procesada en el mismo gel para verificar la correcta inducción de la subunidad Ca<sub>v</sub>2.1 (*input*). También se realizó un control negativo por omisión de anticuerpos (*bolitas*).



**Figura 5.18: Interacción de los anticuerpos de ELA con proteínas presinápticas.**

Los experimentos de inmuno-precipitación con las IgGs-ELA se llevaron a cabo con proteínas de la fracción cruda de membranas sinaptosomales purificadas de cerebelo de ratón (Ca<sub>v</sub>2.1<sup>+/+</sup>, P17). El análisis de los precipitados se realizó por *western blot*, usando anticuerpos contra varias proteínas presinápticas: sinaptotagmina I (1:500), sintaxina 1A (1:1.000), sinaptofisina (1:400) y sinaptobrevina II (1:500). Una fracción del lisado inicial (40  $\mu$ g) se corrió en paralelo (*input*). Se incluyeron controles por omisión de anticuerpos (*bolitas*) e inmuno-precipitación con los anticuerpos contra las propias proteínas presinápticas (*PRE*) a modo de control positivo.

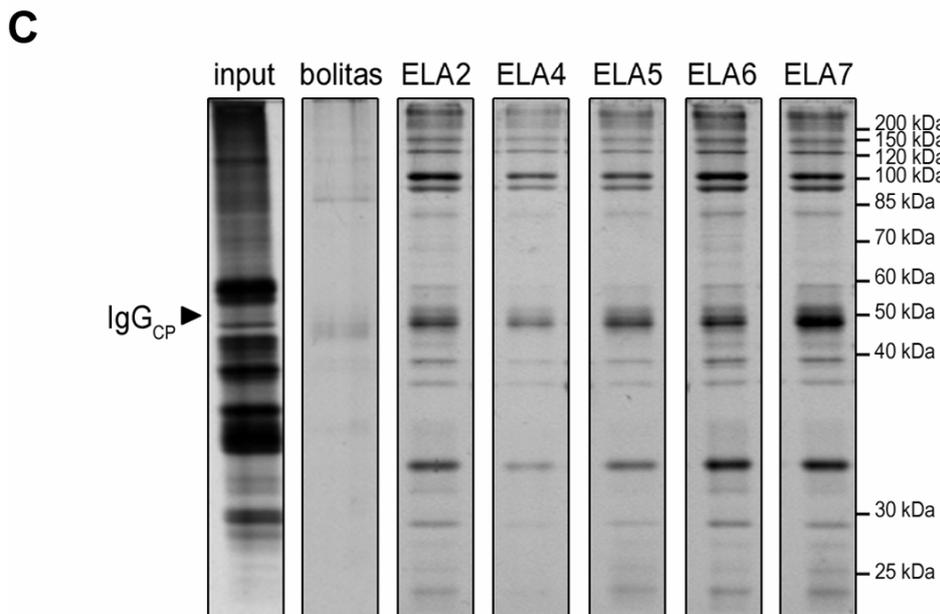
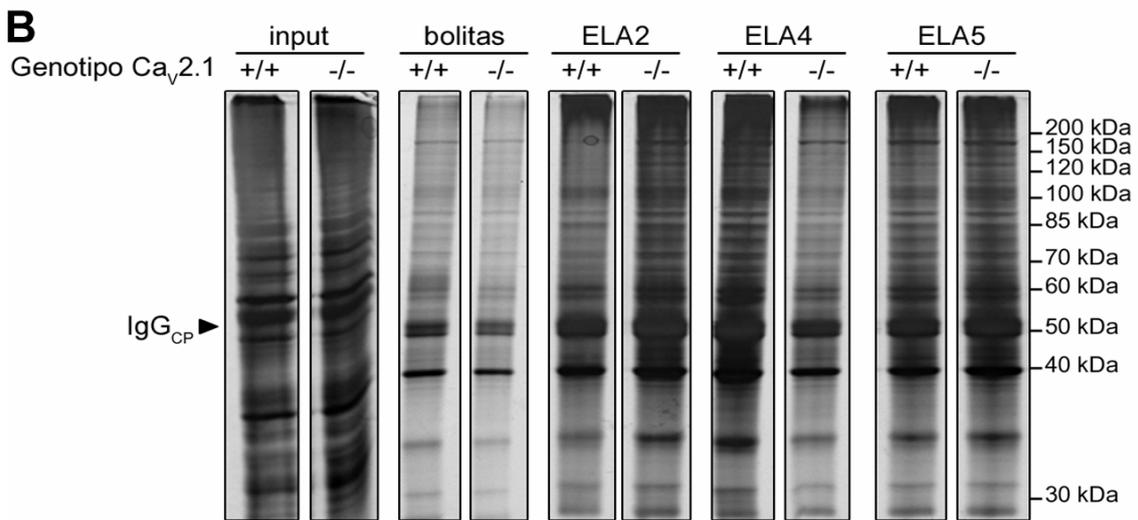
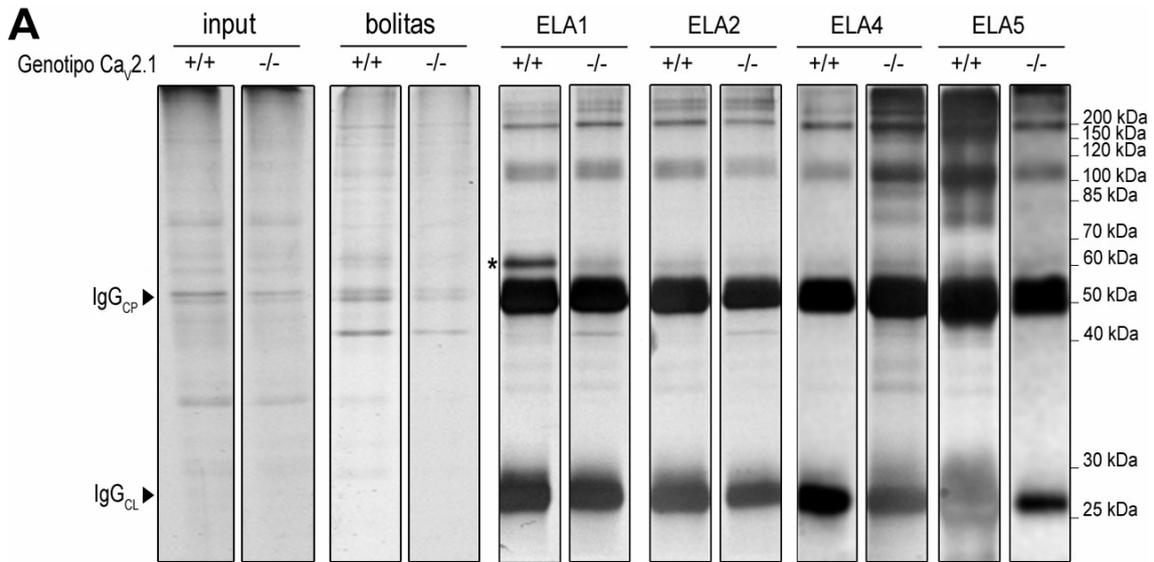
### 5.8 - Análisis comparativo de la interacción de las IgGs-ELA con las proteínas sinápticas de los ratones $Ca_v2.1^{+/+}$ y $Ca_v2.1^{-/-}$

Con el objetivo de realizar una comparación en la interacción de las IgGs-ELA con las proteínas sinápticas de los animales salvajes y aquellos carentes de canales de  $Ca^{2+}$  de tipo P/Q, llevamos a cabo ensayos de inmuno-precipitación. Los extractos empleados en estos experimentos comprendieron proteínas sinaptosomales de la fracción cruda de membrana, purificadas a partir de los animales  $Ca_v2.1^{+/+}$  o  $Ca_v2.1^{-/-}$ . El estudio se centró principalmente en aquellas muestras de IgGs que habían presentado una interacción selectiva hacia los terminales de las motoneuronas de los ratones salvajes. Los complejos que interactuaron con los anticuerpos se separaron por electroforesis unidimensional desnaturizante y las bandas proteicas se revelaron por tinción del gel con nitrato de plata.

Como se puede observar en la **Figura 5.19A**, el patrón de las proteínas de extractos crudos de sinaptosomas cerebelares que se unieron a las IgGs-ELA fue muy similar tanto entre los genotipos como entre las muestras analizadas. En uno de los casos estudiados detectamos la aparición de una banda diferencial de 61 kDa (**Figura 5.19A**; asterisco en ELA1), pero por su alta inespecificidad se desestimó su posterior estudio.

También se realizó el mismo tipo de estudio utilizando para el ensayo proteínas provenientes de un extracto total de cerebelo y aislando por centrifugación aquellos componentes con afinidad hacia las IgGs-ELA. Como se aprecia en la **Figura 5.19B**, tampoco en este caso se pudo detectar el reconocimiento por parte de los anticuerpos de ELA de alguna proteína con una expresión menor en ratones  $Ca_v2.1^{-/-}$  respecto de los  $Ca_v2.1^{+/+}$ .

## 5 - RESULTADOS



### **Figura 5.19: Inmuno-precipitación comparativa de proteínas.**

Las proteínas provenientes de la fracción cruda de membranas de sinaptosomas de cerebelo (A) o de un extracto total de cerebelo (B) o músculo (C) se precipitaron con las IgGs-ELA, mediante el uso de bolitas de agarosa unidas a proteína G. Las fracciones proteicas fueron aisladas a partir de ratones  $Ca_v2.1^{+/+}$  o  $Ca_v2.1^{-/-}$  (P18-20). Los complejos IgGs-proteínas se separaron por centrifugación y se eluyeron con *buffer* Laemmli. Luego de la electroforesis, el gel se tiñó con nitrato de plata, empleando un protocolo compatible con espectrometría de masa. Las cadenas pesadas (IgG<sub>CP</sub>) y livianas (IgG<sub>CL</sub>) de los anticuerpos están indicadas en el margen izquierdo. A la derecha de la figura se muestran los pesos moleculares de los patrones. Una fracción de cada lisado inicial se corrió en paralelo (*input*), así como también el control por omisión de anticuerpos (bolitas). El asterisco en (A) denota una banda no específica (61 kDa) que no estuvo presente en todos los experimentos.

Una aproximación experimental alternativa consistió en llevar a cabo una inmuno-precipitación a partir de un extracto total de proteínas musculares. El patrón de reactividad obtenido en este caso fue muy similar en todas las muestras analizadas, no detectándose ninguna interacción presente en forma selectiva en las IgGs-ELA con actividad neuronal potenciadora (**Figura 5.19C**).

### **5.9 - Proteómica comparativa de las proteínas sinápticas de los ratones $Ca_v2.1^{+/+}$ y $Ca_v2.1^{-/-}$**

Con el propósito de estudiar cambios globales en la expresión de las proteínas sinápticas en los ratones carentes de la subunidad  $Ca_v2.1$ , se emprendió un abordaje que involucró el uso de técnicas de electroforesis multidimensional acopladas a proteómica. Para ello, se purificaron los sinaptosomas de cerebelo de los animales  $Ca_v2.1^{+/+}$  y  $Ca_v2.1^{-/-}$  mediante una centrifugación diferencial en gradiente discontinuo de sacarosa. Las proteínas sinápticas así aisladas se analizaron por medio de una electroforesis bidimensional que implicó una primera separación de la muestra según su punto isoelectrico, seguida de un segundo

## 5 - RESULTADOS

---

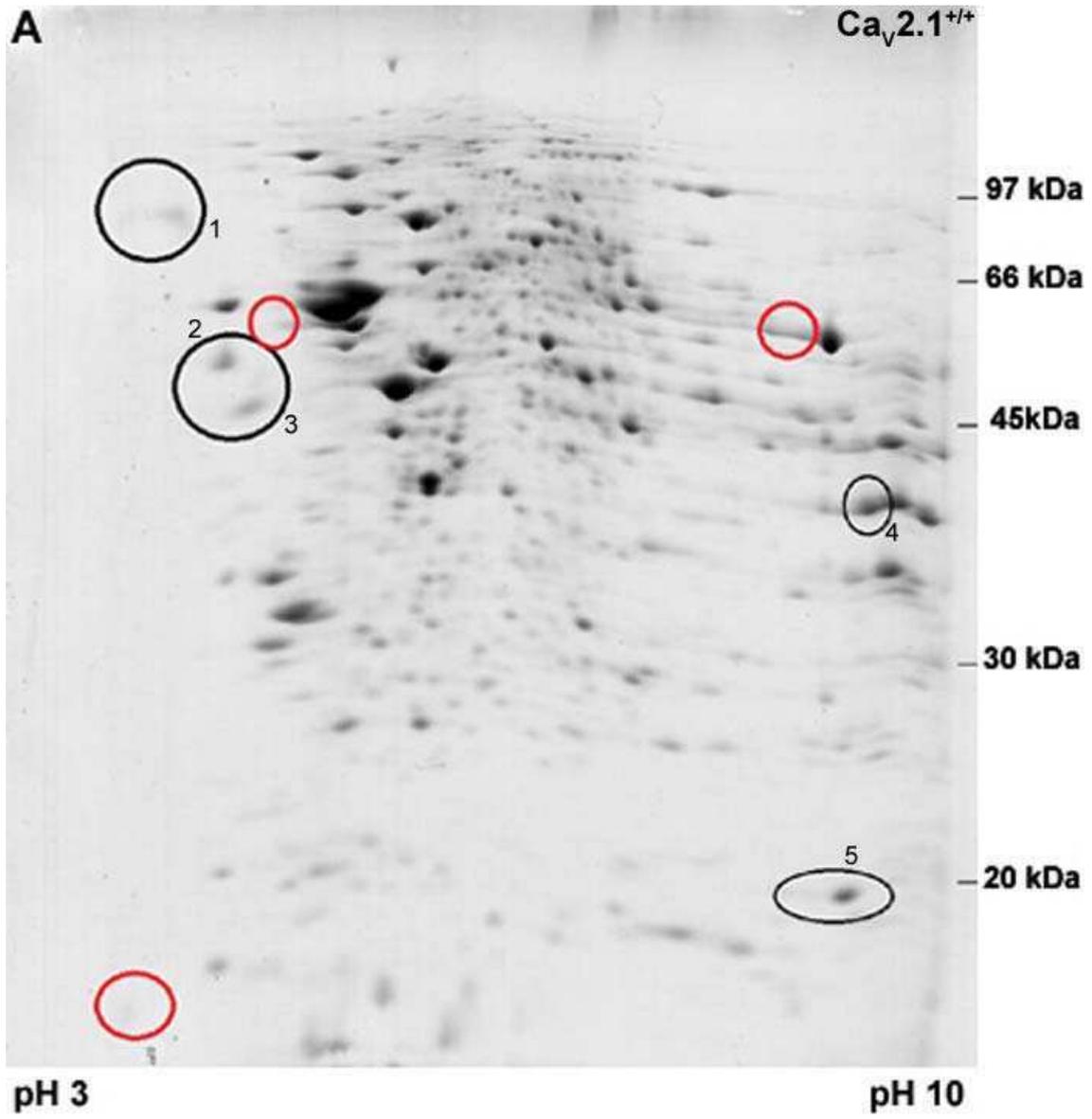
fraccionamiento de acuerdo al peso molecular. La presencia de proteínas se reveló por tinción con Coomassie coloidal.

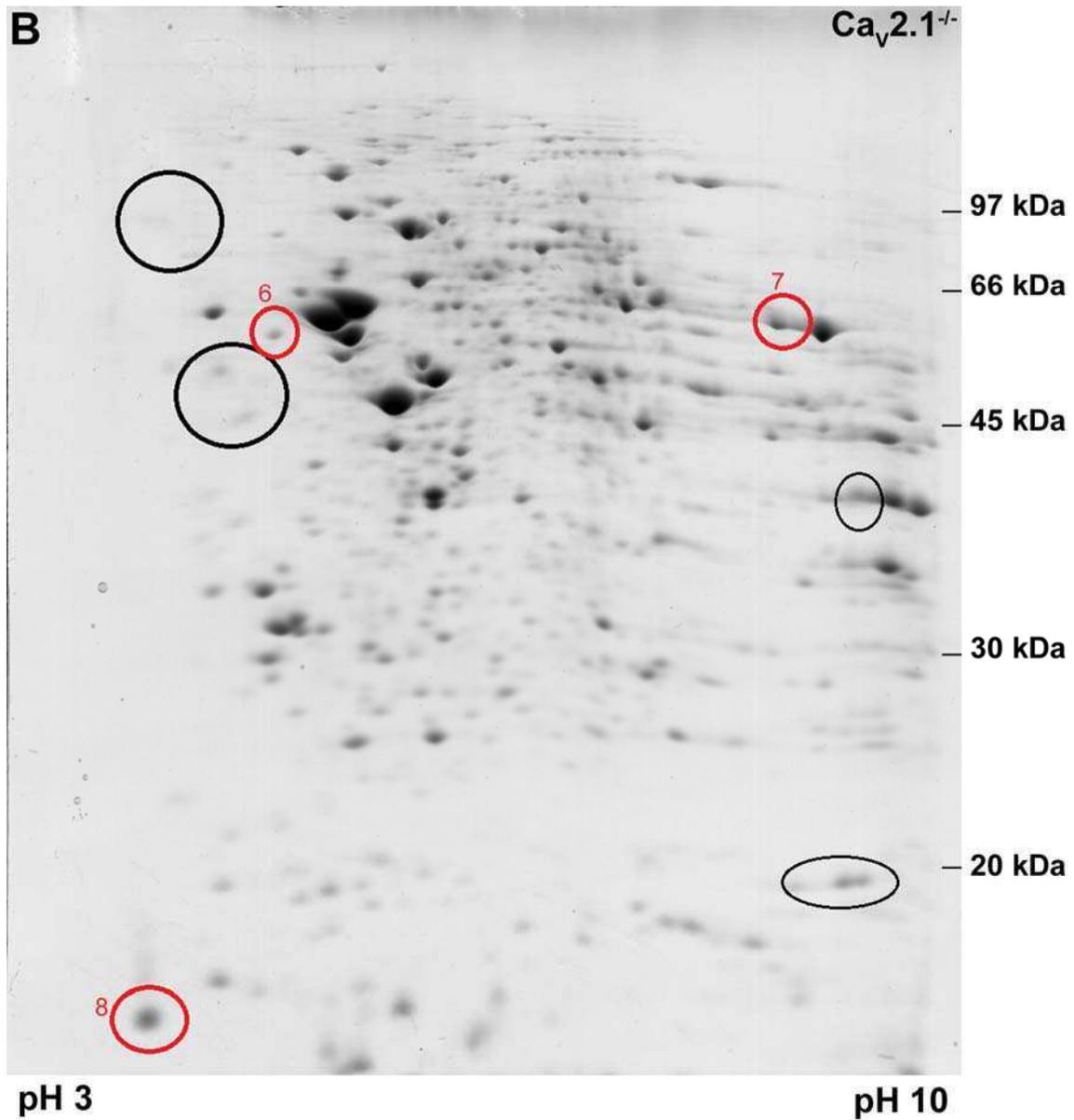
Realizando la comparación entre genotipos del perfil proteico de los sinaptosomas se pudo detectar que la mayoría de las proteínas presentes en la sinapsis se encontraron en niveles similares cuando el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q se hallaba ausente, comparando con los animales salvajes (**Figura 5.20**).

No obstante, algunas proteínas mostraron cambios importantes en sus niveles sinápticos en ratones  $\text{Ca}_v2.1^{-/-}$ , pudiéndose observar tanto proteínas que se encontraron incrementadas (**Figura 5.20**; círculos rojos) como disminuidas (**Figura 5.20**; círculos negros) en las muestras transgénicas. Esta diferencia puede apreciarse más claramente en la **Figura 5.21**, donde se grafica la cuantificación de la densidad óptica de estas proteínas diferenciales.

Con el objeto de proceder a la identificación de dichas proteínas diferenciales, las mismas fueron escindidas del gel y digeridas exhaustivamente con tripsina. Cada mezcla de péptidos resultante de la digestión fue analizada por espectrometría de masa utilizando un equipo del tipo MALDI-TOF-TOF. Para la identificación de cada muestra se utilizó tanto la información del mapeo peptídico (lista de picos de cada espectro) como los datos de los fragmentos producto de la disociación inducida por colisión. En la **Figura 5.22** se pueden observar los espectros de masa obtenidos para aquellas proteínas que mostraron una disminución marcada en los animales  $\text{Ca}_v2.1^{-/-}$ , junto con los picos empleados para la fragmentación

5 - RESULTADOS



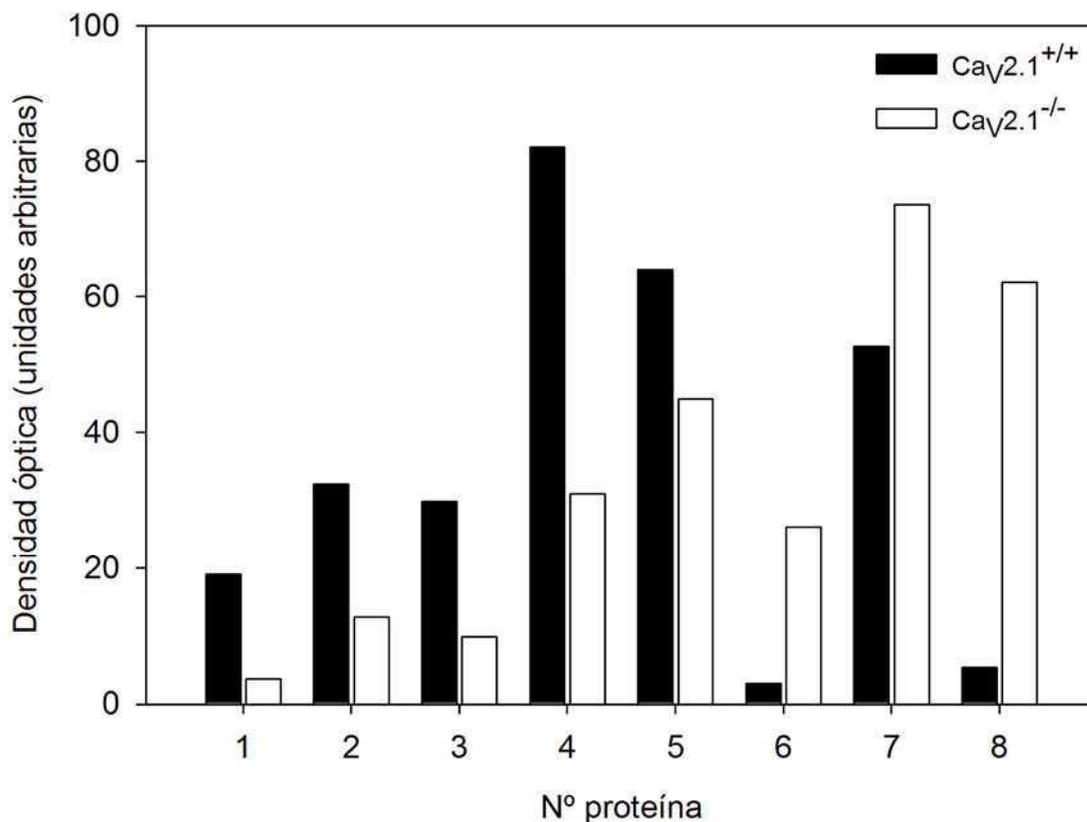


**Figura 5.20: Electroforesis comparativa.**

El análisis de las muestras de los sinaptosomas se realizó por electroforesis en dos dimensiones. Las proteínas (50  $\mu$ g) se fraccionaron según su punto isoeléctrico (en sentido horizontal) y posteriormente según su peso molecular (en sentido vertical). La detección de las proteínas se llevó a cabo por tinción con azul de Coomassie. En los extremos derecho e inferior se muestra el rango de peso molecular y pH analizados, respectivamente.

Las proteínas sinaptosomales se purificaron a partir de los ratones  $Ca_v2.1^{+/+}$  (A) o  $Ca_v2.1^{-/-}$  (B). Los círculos denotan aquellas proteínas que mostraron un aumento (O) o una disminución (O) en los ratones transgénicos respecto de los WT.

## 5 - RESULTADOS

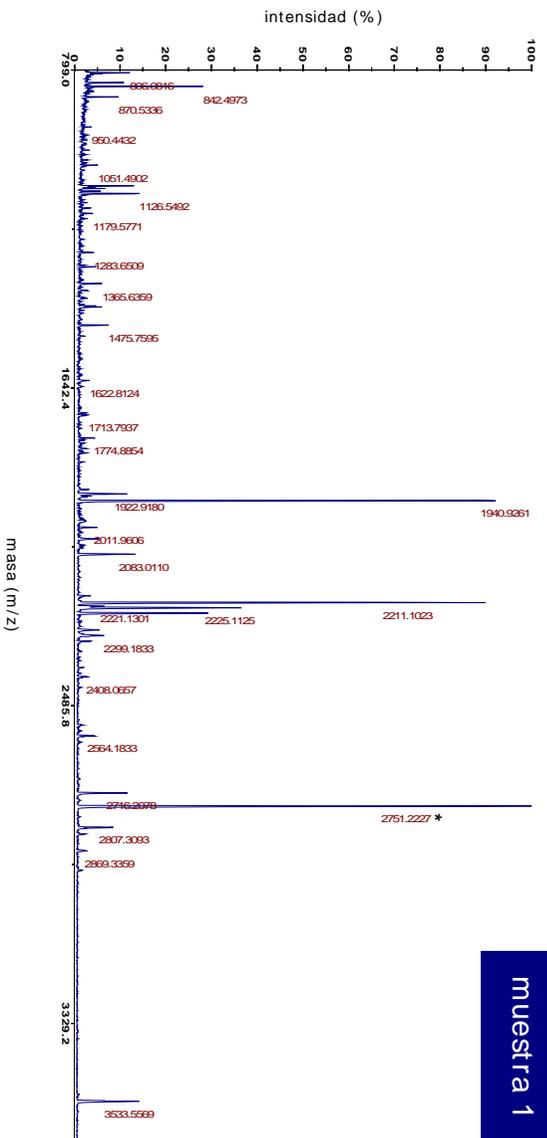


**Figura 5.21: Cuantificación de la intensidad de las proteínas diferenciales.**

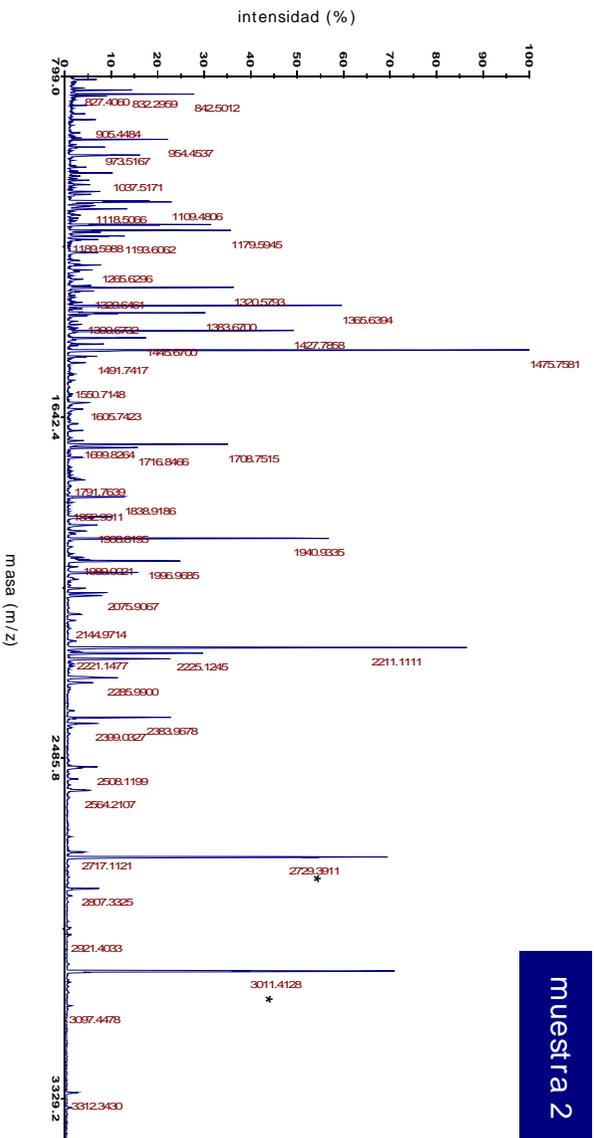
Las proteínas numeradas en los gels mostrados en la Figura 5.20 fueron sujetas a un análisis densitométrico para estimar su intensidad en cada genotipo. El estudio de la densidad óptica se llevó a cabo con el programa ImageJ, analizando una región de interés y posteriormente sustrayendo la señal de fondo.

(Figura 5.22; asteriscos). Por su parte, la **Tabla 5.3** detalla los resultados de las identificaciones de las ocho proteínas diferenciales, mostrando información concerniente a cada molécula encontrada y algunos de los parámetros de dicha investigación. Para el caso de la muestra número 3, el espectro de masa obtenido contenía principalmente los fragmentos producto de la auto-digestión de la tripsina, hecho que imposibilitó una identificación estadísticamente significativa de dicha proteína.

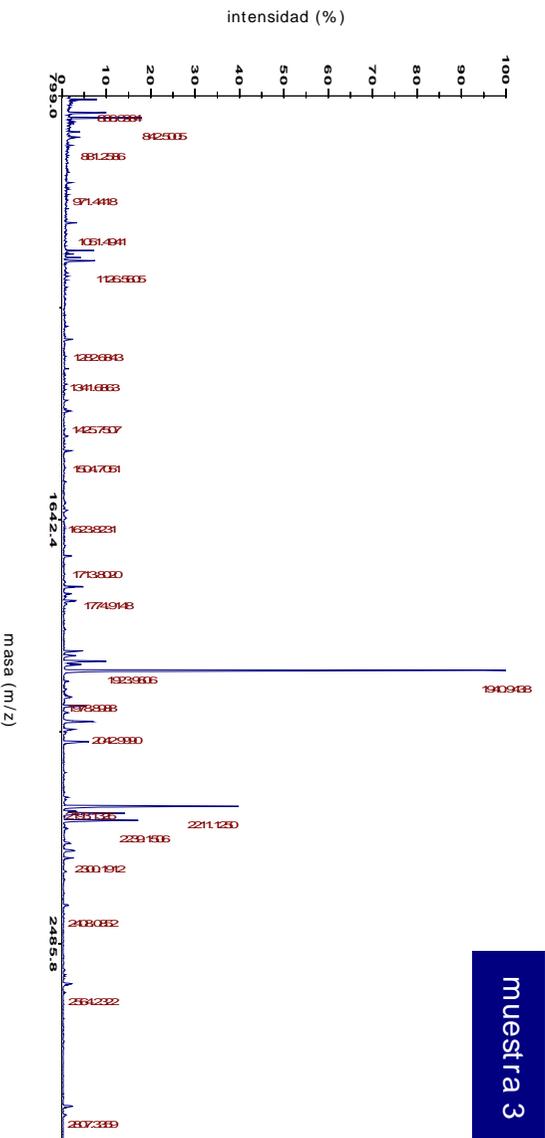
# 5 - RESULTADOS



muestra 1

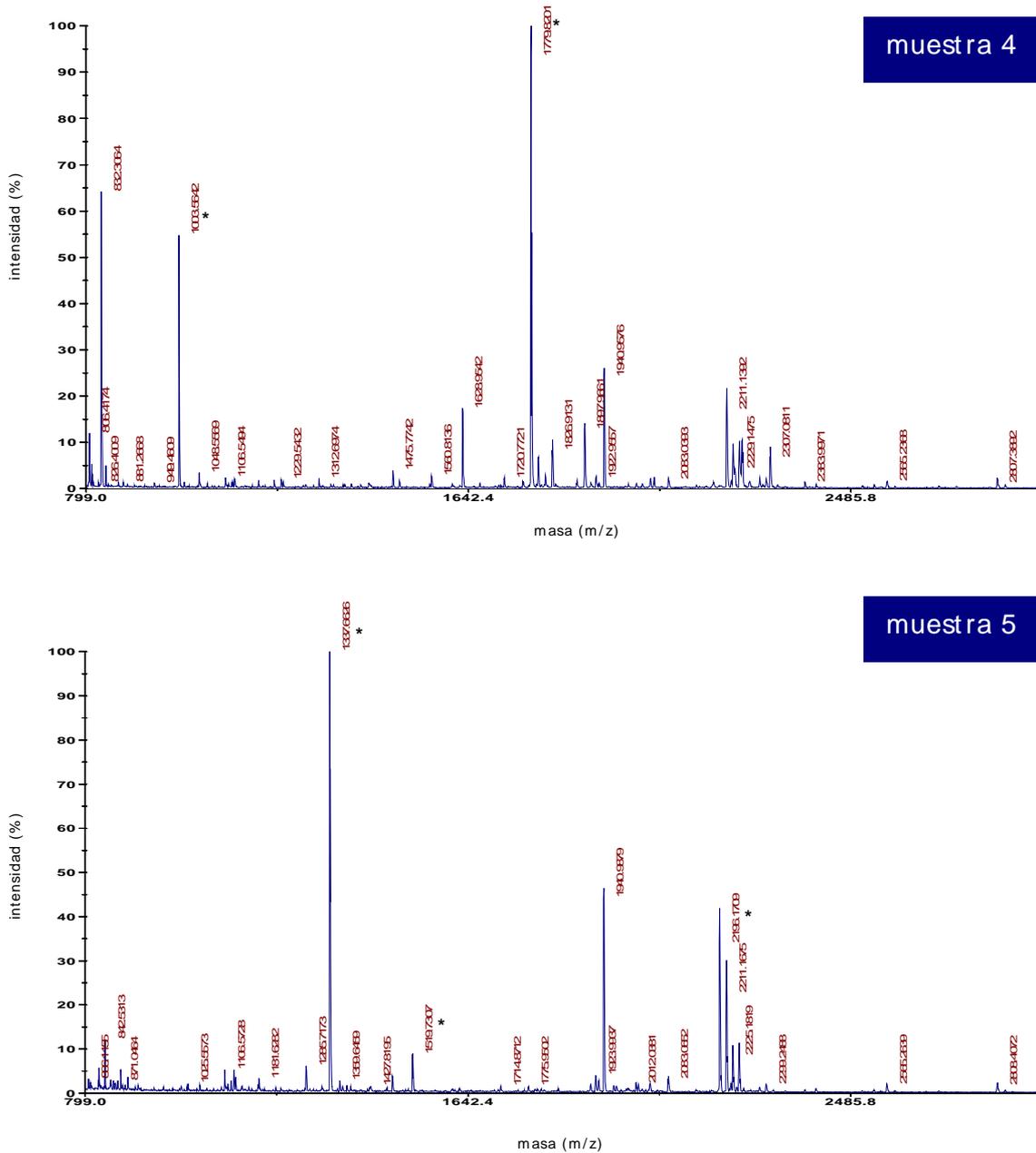


muestra 2



muestra 3

## 5 - RESULTADOS



**Figura 5.22: Espectros de masa.**

Las proteínas numeradas en la Figura 5.20 fueron escindidas del gel, digeridas con tripsina y los péptidos resultantes fueron sujetos a una identificación por espectrometría de masa. Para ello se utilizó la técnica de mapeo peptídico empleando un espectrómetro de masa del tipo MALDI-TOF-TOF. Se muestran en la figura los espectros de masa representativos de las cinco proteínas que presentaron mayor expresión en los ratones salvajes. Los números corresponden a los picos de masa de mayor intensidad. Los asteriscos indican los péptidos utilizados para el análisis de secuencia por medio de disociación inducida por colisión.

## 5 - RESULTADOS

**Tabla 5.3: Resumen de la identificación proteica por mapeo peptídico.** La búsqueda en la base de datos de NCBI nr se realizó con el programa MASCOT.

muestra	proteína identificada	Especie	PM teórico <sup>1,2</sup>	PM experimental	Score <sup>3</sup>	cobertura de secuencia
1	Sustrato de quinasa C rico en alanina, miristoilado (MARCKS)	Ratón	30 kDa	90 kDa	160 (46)	10 %
2	Proteína ácida soluble de cerebro-1 (BASP-1/ NAP-22/ CAP-23)	Ratón	22 kDa	52 kDa	159 (49)	47 %
3	Muestra no identificada	-	-	47 kDa	-	-
4	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Ratón	36 kDa	39 kDa	79 (54)	4 %
5	Cofilina-1	Ratón	19 kDa	20 kDa	216 (54)	25 %
6	Secernina-1	Ratón	46 kDa	57 kDa	177 (52)	29 %
7	Subunidad $\alpha$ de ATP sintetasa mitocondrial	Ratón	60 kDa	59 kDa	245 (53)	7 %
8	Calmodulina	Ratón	17 kDa	16 kDa	171 (53)	19 %

<sup>1</sup> PM: Peso molecular

<sup>2</sup> Especie: *Mus musculus* (ratón)

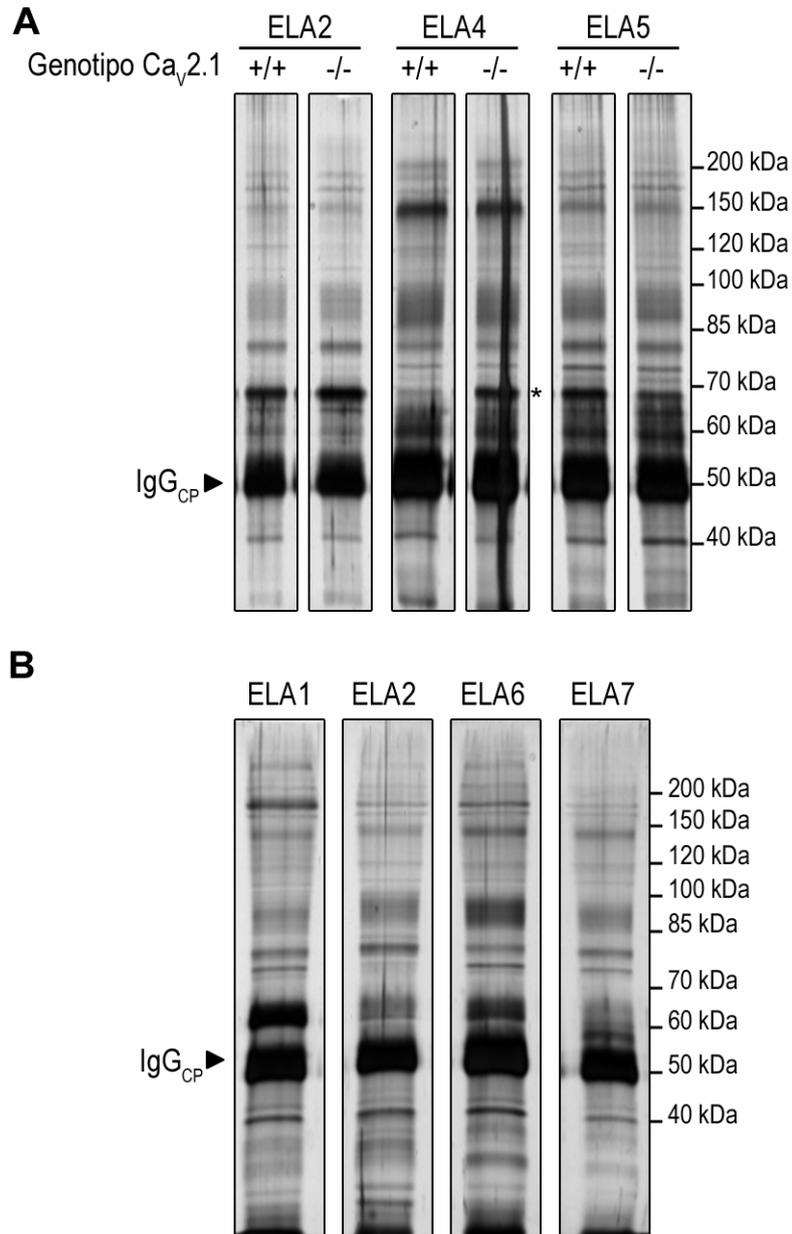
<sup>3</sup> Los datos están expresados en relación al umbral a partir del cual las identificaciones son significativas (número entre paréntesis).

### 5.10 - Interacción de las IgGs-ELA con la proteína BASP-1

De todos los candidatos sugeridos por el análisis comparativo de espectrometría de masa, decidimos proseguir con el estudio más detallado de la interacción de las IgGs-ELA con la proteína BASP-1. Para ello, realizamos ensayos de inmuno-precipitación empleando como fuente de proteínas extractos de cerebelo enriquecidos en *rafts* (Maekawa *et al.* 1999).

Como primera aproximación, realizamos con algunas de las muestras de ELA potenciadoras, un estudio comparativo entre extractos proteicos de ratones salvajes y  $Ca_v2.1^{-/-}$ . El patrón de proteínas interactuantes con los anticuerpos puede apreciarse en la **Figura 5.23A**, donde no se observaron diferencias apreciables entre genotipos, salvo la muestra ELA4 que presentó interacción con una proteína más representada en los ratones  $Ca_v2.1^{-/-}$ . (**Figura 5.23A**, asterisco). En particular, no se advirtió la presencia de

## 5 - RESULTADOS



### Figura 5.23: Inmuno-precipitación comparativa de proteínas de rafts.

Los extractos enriquecidos en proteínas cerebelares de *rafts* provenientes de ratones  $Ca_v2.1^{-/-}$  (A) o  $Ca_v2.1^{+/+}$  (A y B) fueron incubados con las IgGs-ELA, y los complejos fueron aislados mediante el uso de bolitas de agarosa conjugadas a proteína G. Para el experimento se utilizaron ratones de edad P16-20. Luego de la electroforesis de los precipitados, el gel (acrilamida 7,5 %v/v) se tiñó con nitrato de plata, empleando un protocolo compatible con espectrometría de masa. La cadena pesada de los anticuerpos (IgG<sub>CP</sub>) se indica en el margen izquierdo. A la derecha de la figura se muestran los pesos moleculares de los patrones. El asterisco en A denota una banda precipitada con ELA4 enriquecida en la muestra de ratones  $Ca_v2.1^{-/-}$ .

## 5 - RESULTADOS

---

proteínas diferenciales en la zona de pesos moleculares correspondientes a los reportados para esta proteína, en las condiciones de nuestro ensayo, es decir la zona de 55-60 kDa (Maekawa *et al.* 1993; Maekawa *et al.* 1999).

En un acercamiento alternativo, también se llevó a cabo la comparación de los patrones de proteínas precipitadas con sueros que presentaron o no afinidad hacia la PNM. En la **Figura 5.23B** se muestran los resultados para las cuatro muestras analizadas. Nuevamente, en la zona de pesos moleculares donde se esperaba la presencia de BASP-1, no se apreció una interacción selectiva de proteínas de *rafts* con los sueros moduladores.

# Discusión



### 6.1 - Placa neuromuscular

En el presente trabajo de tesis hemos detectado la existencia de una subpoblación de pacientes con ELA esporádica, que representa un 63 % del total de las muestras, cuya fracción de IgGs indujo un incremento en la liberación espontánea de acetilcolina (**Figura 5.2**). Este efecto ha sido postulado como una consecuencia de un aumento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel de los terminales sinápticos, ocasionado por la unión de las IgGs-ELA a la membrana presináptica (Uchitel *et al.* 1988; Uchitel *et al.* 1992a; Pagani *et al.* 2006).

Interesantemente, la misma serie de pacientes cuyos anticuerpos produjeron dicha potenciación sináptica también presentaron IgGs en suero capaces de interactuar con la PNM de ratón (**Figuras 5.3 y 5.4**). De hecho, se pudo encontrar una correlación significativa entre estos parámetros, como se observa en la **Figura 5.13A**, sugiriendo de esta manera una asociación entre la unión de los anticuerpos al terminal motor y su posterior efecto funcional. Estos resultados refuerzan aquellos obtenidos por Pagani *et al.* (2006), donde los autores correlacionaron positivamente la unión de los anticuerpos de ELA con los efectos electrofisiológicos estudiados. De esta manera, es posible separar a los pacientes analizados en este estudio en dos grupos, uno de los cuales podría presentar un componente autoinmune neuromuscular mediando su neuropatología.

Existe una amplia serie de evidencias que sugieren un rol para el  $\text{Ca}^{2+}$  como un importante promotor de disfunción y muerte celular (Appel *et al.* 2001; Orrenius *et al.* 2003). Adicionalmente, las motoneuronas espinales son conocidas por su particular vulnerabilidad a cualquier desbalance de

## 6 - DISCUSIÓN

---

$\text{Ca}^{2+}$ , dada la baja expresión de proteínas *buffer* de este ión (Alexianu *et al.* 1994). Un incremento en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  por encima de un cierto valor umbral podría disparar procesos deletéreos, tales como la activación de calpaínas, el plegamiento incorrecto de proteínas acoplado al estrés del retículo endoplásmico, la producción de especies reactivas del oxígeno y la liberación de glutamato (Orrenius *et al.* 2003; Smaili *et al.* 2009). La estimulación de cada una de estas vías podría eventualmente llevar a la inducción de apoptosis. Por lo tanto, el aumento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  provee una conexión clave para relacionar las hipótesis previamente propuestas para explicar la patología de ELA. En este sentido, numerosos reportes documentando un aumento en el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  de las motoneuronas y los terminales sinápticos de los ratones inoculados con las IgGs-ELA han provisto una importante relación entre la sobre-carga de  $\text{Ca}^{2+}$  y esta patología (Engelhardt *et al.* 1995; Pullen y Humphreys 2000).

La comparación entre los niveles de reactividad de los anticuerpos de ELA hacia la PNM (**Figura 5.4**) y su efecto potenciador sobre la tasa de descarga espontánea (**Figura 5.2**) indica que ambos fenómenos muestran un comportamiento similar, a pesar de que sus rangos de incremento parecen ser moderadamente diferentes. Además de las diferencias intrínsecas en la sensibilidad de las técnicas empleadas, las discrepancias podrían ser el resultado de la presencia en algunas muestras de distintos anticuerpos capaces de interactuar con los terminales sinápticos.

La presencia de niveles significativos de inmuno-reactividad en algunos controles enfermos no fue completamente inesperada (**Figuras 5.3** y **5.4**), debido a que se sabía que estos individuos podían poseer

## 6 - DISCUSIÓN

---

anticuerpos dirigidos contra proteínas involucradas en la transmisión sináptica (CCDVs en CE1 y el receptor de acetilcolina en CE2). En este sentido, estas muestras resultaron útiles como controles positivos para la técnica de inmuno-fluorescencia utilizada para detectar auto-anticuerpos en las muestras de los pacientes con ELA. Además, cabe recalcar que si bien algunos controles enfermos mostraron afinidad por la PNM de ratón, en ningún caso las IgGs de los controles incrementaron la actividad sináptica espontánea (**Figura 5.2**).

Otro aspecto importante a tener en cuenta es la falta de unión a las preparaciones de músculo de los anticuerpos provenientes de pacientes presentando la forma familiar de ELA (**Figura 5.4**; CE4-6), así como también su incapacidad de incrementar la actividad sináptica espontánea de los terminales motores (**Figura 5.2B**). Estos resultados enfatizan la especificidad de nuestros hallazgos con las inmunoglobulinas de individuos con ELA esporádica, debido a que se sabe que la forma hereditaria de esta enfermedad es clínicamente indistinguible de la variante esporádica.

### 6.2 - Sistema nervioso central

Para efectuar una caracterización adicional de la reactividad de las IgGs-ELA hacia otros posibles sustratos neuronales, llevamos a cabo experimentos de inmuno-marcación en rodajas de médula espinal y corteza cerebral de ratón. Estas estructuras son los sitios donde residen los somas de las motoneuronas inferiores y superiores, respectivamente. Ambos tipos celulares son importantes efectores del movimiento. También se analizaron cortes de cerebelo murino, debido a que esta parte del cerebro está involucrada en la coordinación de los movimientos y se ha visto que los

## 6 - DISCUSIÓN

---

anticuerpos de ELA pueden modular las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q en neuronas de Purkinje (Llinas *et al.* 1993), sugiriendo de esta manera una posible interacción con componentes cerebelares.

### 6.2.1 - Médula espinal

Llevando a cabo el análisis mencionado, hemos encontrado un amplio patrón de reactividad de las IgGs-ELA en el asta ventral de la médula espinal (**Figura 5.7**), donde la gran mayoría de las muestras analizadas mostró afinidad hacia motoneuronas inferiores y otros tipos celulares de menor tamaño. Realizando una co-tinción con un marcador neuronal específico (NeuN) encontramos que no todas las motoneuronas unieron anticuerpos de pacientes con ELA (**Figura 5.10A**). Esta heterogeneidad fue una característica presente en la totalidad de las muestras analizadas. La marca predominantemente citoplasmática observada con el anticuerpo anti-NeuN ha sido reportada con anterioridad para esta estructura neural (Mullen *et al.* 1992; Kim *et al.* 2009).

Adicionalmente, estas células  $\text{NeuN}^+ \text{IgGs-ELA}^-$  no mostraron ninguna ubicación preferencial en los cortes, ya sea a lo largo del eje medio-lateral (**Figura 5.10B**), como al analizar distintas secciones espinales (médula torácica y lumbar). Estos últimos resultados sugieren que los anticuerpos de ELA no estarían interactuando preferencialmente con motoneuronas que inervan grupos particulares de músculos, sean éstos distales/proximales (distribuidos en dirección latero-medial en la médula), o torácicos/de extremidades inferiores. Tampoco se encontró correlación entre la unión de las IgGs-ELA y los niveles de expresión de proteínas como parvalbúmina o calbindina, sugiriendo que el antígeno presente en el soma neuronal no

## 6 - DISCUSIÓN

---

estaría relacionado con la capacidad *buffer* de  $\text{Ca}^{2+}$  (resultados no mostrados).

Existen variados antecedentes que documentan la reactividad de las IgGs-ELA hacia los antígenos de las motoneuronas inferiores. Dichos reportes se valieron de técnicas electrofisiológicas (Carter y Mynlieff 2003), inmuno-histoquímicas (Kiernan y Hudson 1993; Greiner *et al.* 1996; Schluep *et al.* 1998) y electroforéticas (Brown *et al.* 1987; Niebroj-Dobosz *et al.* 2006). En el presente trabajo, llevando a cabo un estudio de correlación entre varios de los parámetros mencionados previamente, se encontró una asociación significativa entre la unión de las IgGs a la PNM y su correspondiente interacción con las motoneuronas espinales (**Figura 5.13B**). Esta relación sugeriría la posibilidad de que el antígeno presente en la PNM que reacciona con las IgGs-ELA también esté presente en el soma de las motoneuronas. Como puede apreciarse en la **Figura 5.14**, la falta de variación en la inmuno-marcación de la médula espinal entre los ratones  $\text{Ca}_v2.1^{+/+}$  y  $\text{Ca}_v2.1^{-/-}$  (a diferencia de lo que ocurre en la PNM) indicaría que, o bien se trata de antígenos diferentes, o bien es la misma molécula pero su presencia en el soma motoneuronal es en principio independiente de la expresión del canal P/Q.

Resultaría de gran utilidad indagar en más detalle en futuras aproximaciones experimentales sobre la identidad de este antígeno de expresión heterogénea en el soma de motoneuronas. De esta manera se podría dilucidar si guarda correlación con alguna característica fisiológica distintiva de este sub-grupo de neuronas motoras, así como también su relevancia en la patofisiología de ELA.

### 6.2.2 - Cerebelo

Existen extensos reportes indirectos de la interacción de los anticuerpos de ELA con componentes cerebelares. En un estudio hecho en células de Purkinje disociadas en forma aguda, se detectó un aumento en las corrientes de  $Ca^{2+}$  de tipo P/Q inducido por las IgGs-ELA (Llinas *et al.* 1993). Asimismo se ha visto que la fracción de inmuno-proteínas del suero de pacientes con ELA disminuye las corrientes de  $Ca^{2+}$  de alto voltaje de activación en células granulares en cultivo (Zhainazarov *et al.* 1994), sugiriendo un posible efecto dependiente del tipo celular. A nivel de la reactividad de las IgGs-ELA hacia estructuras cerebelares, se ha detectado la presencia de estos anticuerpos en la capa molecular y sustancia blanca de cerebelo de ratones sometidos a un protocolo de transferencia pasiva (Schluep *et al.* 1998).

Estos reportes concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo, donde encontramos una amplia reactividad de las IgGs-ELA hacia células residentes en el cerebelo (**Figura 5.8**), donde hemos detectado una importante inmuno-tinción en el soma de las neuronas de Purkinje.

El análisis más detallado de la marca en la capa granular reveló no solo unión de IgGs-ELA a neuronas granulares NeuN<sup>+</sup> (**Figura 5.11**) sino también una importante asociación a interneuronas GABAérgicas con expresión de GAD<sup>65/67</sup> (**Figura 5.12**). Éstas podrían tratarse tanto de células Lúgaro como de neuronas de Golgi (Sillitoe y Joyner 2007), aunque por su ubicación alejada de la capa de Purkinje, es probable que se trate de estas últimas.

En cuanto al estudio análogo de la capa molecular, encontramos una importante marca asociada al citoplasma de neuronas NeuN<sup>+</sup> (**Figura**

## 6 - DISCUSIÓN

---

**5.11**). Estas células muy probablemente se traten de neuronas granulares ya que se ha reportado que la mayoría de las neuronas que expresan el marcador NeuN en la capa molecular son células granulares localizadas ectópicamente (Mullen *et al.* 1992). Por su parte, el marcador GAD<sup>65/67</sup> nos permitió apreciar la intensa tinción de las dendritas principales de las neuronas de Purkinje (**Figura 5.12**).

Todos estos resultados sugieren que los anticuerpos de ELA estarían reaccionando con proteínas exclusivamente presentes en el linaje neuronal, aunque tendrían una distribución bastante amplia dentro de este grupo. Sin embargo, la ausencia de correlación entre la inmuno-tinción de las neuronas de Purkinje y los efectos y marca en la PNM (**Figuras 5.13C y 5.13E**) sumada a la invariabilidad en la interacción de la mayoría de las muestras con las rodajas de cerebelo de los animales Ca<sub>v</sub>2.1<sup>-/-</sup> (**Figura 5.15**) sugieren un rol menos específico para estos anticuerpos.

Los datos arriba mencionados en relación al cerebelo (**Figura 5.15**) y la médula espinal (**Figura 5.14**) contrastan significativamente con los cambios observados en los ensayos de inmuno-fluorescencia desarrollados en la PNM (**Figura 5.5**), y de esta manera también enfatizan la especificidad de los resultados obtenidos en los terminales motores. En este sentido, se podría especular que el antígeno que interactuaría con los anticuerpos de ELA en la PNM se expresaría selectivamente en esta estructura, respecto de otras como el cerebelo o el asta ventral espinal. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que en el soma de las motoneuronas y las células de Purkinje haya una importante expresión de proteínas reactivas que enmascaren la presencia del antígeno detectado en la PNM. Además, la presencia en el suero de anticuerpos reactivos hacia el

## 6 - DISCUSIÓN

---

sistema nervioso central podría ser consecuencia de la exposición del contenido intracelular debido a la injuria neuronal. Esta exposición patológica estimularía la producción de anticuerpos contra componentes propios del organismo (algunos de los cuales podrían ser antígenos comunes a otros tipos neuronales) y justificarían la amplia distribución de reactividad encontrada hacia el sistema nervioso central. De esta manera se podría explicar la presencia de los anticuerpos contra las estructuras nerviosas centrales incluso en las muestras que no evidenciaron afinidad hacia la PNM (ELA6-8), teniendo en cuenta la degeneración motoneuronal característica de la enfermedad y presente en todos los pacientes, en mayor o menor medida.

### 6.2.3 - Corteza cerebral

Las motoneuronas superiores residen en la capa V de la corteza motora primaria y están involucradas en el control del movimiento por su influencia sobre los circuitos locales en el tallo cerebral y la médula espinal. Se sabe que esta área representa un blanco temprano durante el desarrollo de la patología de ELA. Adicionalmente, experimentos de inmuno-histoquímica han revelado la presencia de las IgGs en las células piramidales de los pacientes con esta enfermedad (Engelhardt y Appel 1990) y en corteza de ratones sujetos a un esquema de transferencia pasiva (Schluep *et al.* 1998), sugiriendo una posible interacción *in vivo* entre los anticuerpos y los componentes motoneuronales. Esta interacción se podría producir mediante mecanismos activos que promuevan la endocitosis de las IgGs-ELA en la PNM y el posterior transporte axonal retrógrado hacia estructuras neurales superiores (Fabian y Petroff 1987; Fratantoni *et al.* 1996).

## 6 - DISCUSIÓN

---

En nuestros ensayos no pudimos detectar la unión de las IgGs-ELA a las rodajas de la corteza cerebral conteniendo la región motora primaria, en ninguna de las muestras analizadas (datos no mostrados). A pesar de que estos resultados parecen ser contrarios a los ensayos mencionados previamente, no podemos excluir la posibilidad de que la interacción de los anticuerpos con las motoneuronas sea dependiente de procesos activos (como los mencionados en el párrafo precedente), los cuales se encontrarían ausentes en el tejido fijado utilizado en este estudio. Por otro lado, estos resultados avalan la especificidad de la interacción de los anticuerpos con la PNM y se encuentran esencialmente en concordancia con los ensayos realizados en sinaptosomas corticales (Thomas y Dunn 1997). En este estudio los autores no pudieron detectar cambios en el influjo de  $Ca^{2+}$  luego de la incubación con las IgGs-ELA.

### 6.2.4 - *Astroцитos*

Los estudios de inmuno-tinción utilizando el marcador GFAP revelaron que algunas de las muestras de ELA contenían anticuerpos contra componentes astrocíticos. En principio, la señal encontrada co-localizaría solo parcialmente con la correspondiente al marcador citoesqueletario, por lo que no se trataría del marcador en sí. Estas IgGs fueron capaces de unirse a la astrogliá tanto de médula espinal (**Figura 5.9A**) como de cerebelo (**Figura 5.9B**), por lo que sería una proteína expresada en el linaje astrocítico en diversas regiones del sistema nervioso. Sin embargo, cabe recalcar que este fenómeno no estuvo presente en la totalidad de las muestras analizadas, sugiriendo que no estaríamos frente a una característica universal de la enfermedad.

## 6 - DISCUSIÓN

---

Existen extensas evidencias que documentan una posible disfunción astrocítica en la patología de ELA. Entre ellas se puede mencionar la disminución de la liberación de factores tróficos (Ekestern 2004), el compromiso en la regulación de la concentración extracelular de  $K^+$  (Neusch *et al.* 2007), la deficiencia en la eliminación de glutamato de la hendidura sináptica (Shaw *et al.* 1994; Rothstein *et al.* 1995) y la acumulación de agregados de la proteína superóxido dismutasa en núcleos gliales de pacientes con ELA (Forsberg *et al.* 2011). A esto se suma la presencia de astrocitos reactivos adyacentes a las motoneuronas en proceso de degeneración (Hirano 1996). Además, estudios recientes con modelos transgénicos de ELA<sub>f</sub> han revelado que la toxicidad hacia las motoneuronas podría derivarse de un daño ejercido sobre células gliales, más precisamente sobre los astrocitos (Nagai *et al.* 2007; Di Giorgio *et al.* 2007).

En relación con los resultados presentados en este trabajo, Stenovec y col. han encontrado recientemente que las IgGs-ELA aumentaron la movilidad de vesículas lisosomales/endosomales marcadas con el compuesto *Lysotracker*, en cultivos primarios de astrocitos de rata (Stenovec *et al.* 2011). Los autores asociaron estos datos a un posible incremento en la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  por liberación desde depósitos intracelulares. Otro grupo ha detectado la presencia selectiva de anticuerpos de ELA en varias regiones del sistema nervioso central de ratones, luego de un esquema de transferencia pasiva de las IgGs humanas (Schluep *et al.* 1998). La reactividad en este caso se vio asociada tanto a neuronas como a astrocitos y se encontró ausente en experimentos usando muestras controles. Sin embargo, los astrocitos de cultivos primarios mixtos

## 6 - DISCUSIÓN

---

de médula espinal han mostrado ser menos susceptibles que las motoneuronas a la muerte celular apoptótica inducida por exposición a las IgGs-ELA (Demestre *et al.* 2005). Por tal motivo se cree que el rol que jugaría la astrogliá en la patogénesis de ELA estaría relacionado con la generación de un ambiente tóxico para las motoneuronas.

Si bien la identidad del antígeno astrocítico permanece desconocida y sería necesario profundizar el estudio para establecer la distribución, funcionalidad y relevancia de estos anticuerpos, nuestras evidencias favorecen la hipótesis de que los astrocitos jugarían un papel en la degeneración de las neuronas motoras en la patología de ELA.

### 6.3 - Canales de $\text{Ca}^{2+}$ de tipo P/ Q y N

Los CCDVs de tipo P/Q son los principales mediadores de la transmisión sináptica en la PNM de los mamíferos (Uchitel *et al.* 1992b; Katz *et al.* 1997). Por otro lado, existen numerosas evidencias que sugieren una interacción entre las IgGs-ELA y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Llinas *et al.* 1993; Smith *et al.* 1994; Carter y Mynlieff 2003). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestro próximo paso consistió en analizar el efecto de la ausencia de la subunidad  $\text{Ca}_v2.1$  sobre la potenciación sináptica y la reactividad de los anticuerpos de ELA en la PNM, utilizando músculos diafragma de los animales carentes de esta subunidad.

Nuestros resultados mostraron que la ausencia de la subunidad formadora del poro del canal de tipo P/Q produjo una disminución significativa en la unión de las IgGs-ELA a la PNM de ratón (**Figura 5.5**), junto con una completa supresión del efecto sobre la liberación espontánea de acetilcolina (**Tabla 5.1**). Esta inhibición de la acción de los anticuerpos

## 6 - DISCUSIÓN

---

no fue consecuencia del deterioro de la preparación, ya que la misma fue capaz de responder satisfactoriamente a un estímulo despolarizante (KCl 15 mM, 10 min), luego de varios lavados, incrementando su frecuencia de actividad espontánea (**Tabla 5.2**) a niveles similares a los de preparados *WT* tratados con las IgGs-ELA potenciadoras (**Tabla 5.1**).

Por lo tanto, los datos sugieren que los anticuerpos de ELA interactúan con la subunidad  $Ca_v2.1$  misma o con una proteína cuya expresión -o al menos su localización en la PNM- se ve francamente disminuida como consecuencia de la delección genética de esta subunidad formadora del poro. Adicionalmente, se deduce de los resultados que la presencia de esta subunidad sería esencial para la modulación sináptica inducida por las IgGs-ELA. De hecho, se sabe que estos ratones carentes de la subunidad  $Ca_v2.1$  presentan alteraciones en el patrón de expresión de otros genes, además de la subunidad misma (Piedras-Renteria *et al.* 2004).

Por otro lado, existen reportes que sugieren que el influjo de  $Ca^{2+}$  a través del canal de tipo P/Q -y por lo tanto, su presencia y funcionalidad- podría actuar como un potente inductor de la transcripción. Este es el caso de varias proteínas sinápticas, entre las que se puede mencionar la proteína que forma parte del complejo SNARE (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*), sintaxina 1A (Sutton *et al.* 1999; Barbado *et al.* 2009).

Otro dato interesante a tener en cuenta es la relación que se ha encontrado entre la expresión del canal de  $Ca^{2+}$  de tipo P/Q y la susceptibilidad de diferentes músculos durante el desarrollo de ELA. Mediante un análisis de microarreglos diseñado para el estudio del gen *Cacna1a* de rata (que codifica para la subunidad  $\alpha_{1A}$  del canal P/Q), se ha

## 6 - DISCUSIÓN

---

detectado un nivel de ARN mensajero para Ca<sub>v</sub>2.1 siete veces mayor en un músculo típicamente esquelético (*Tibialis anterior*) comparado con el músculo extraocular (Fischer *et al.* 2002). Es sabido que durante la progresión de la enfermedad este último tejido resulta ser relativamente poco vulnerable, reteniendo sus funciones hasta estadíos muy avanzados de la neurodegeneración (Leveille *et al.* 1982). Además, el músculo extraocular ha mostrado resistencia a la acción de las IgGs-ELA en ensayos de transferencia pasiva (Mosier *et al.* 2000).

A pesar de los antecedentes arriba mencionados, nuestros experimentos de inmuno-precipitación y *western blot* utilizando células HEK293 transfectadas con las subunidades del canal de tipo P/Q no sugieren una interacción directa de los anticuerpos de ELA con el canal mismo (**Figuras 5.16 y 5.17**), al menos en las condiciones analizadas en este estudio. Por otro lado, es improbable que ocurra una alteración en la corrientes de Ca<sup>2+</sup> de tipo P/Q por efecto de las IgGs-ELA, ya que se ha encontrado que los anticuerpos de ELA no se unen a los canales marcados con <sup>125</sup>I- $\omega$ -conotoxina MVIIC (Drachman *et al.* 1995), mientras que la inhibición específica de estos canales por  $\omega$ -agatoxina IVA no previene la potenciación sináptica inducida por los anticuerpos (Pagani *et al.* 2006).

Todos estos resultados sugieren que la proteína que interactúa con las IgGs-ELA necesitaría la expresión y/o actividad del canal de Ca<sup>2+</sup> de tipo P/Q para estar presente en la PNM de ratón. También se desprende de estos datos que en otras estructuras neuronales -como el cerebelo y la médula espinal- su presencia sería en principio menos dependiente de la expresión del gen *Cacna1a*.

## 6 - DISCUSIÓN

---

Un aspecto significativo que merece ser mencionado es la ausencia de cambio en la unión de los anticuerpos de los controles enfermos a la PNM de los ratones  $Ca_v2.1^{-/-}$ , comparado con aquellos *WT* (**Figura 5.5**). Esta invariabilidad en la inmuno-tinción adiciona relevancia a los resultados encontrados para las IgGs-ELA, resaltando su especificidad hacia un *subset* de pacientes y el hecho de que no se trata de un fenómeno generalizado. Además, se puede descartar que las diferencias encontradas en los animales carentes del canal de tipo P/Q sean consecuencia del proceso de delección genética en sí, ya que en otro modelo transgénico similar (los ratones  $Ca_v2.2^{-/-}$ ) no se detectaron dichas diferencias.

El hecho de que la muestra DC1 (un paciente con el síndrome miasténico de Lambert-Eaton) haya exhibido niveles de interacción similares con la PNM de los ratones  $Ca_v2.1^{+/+}$  y  $Ca_v2.1^{-/-}$  (**Figura 5.5**), podría parecer contradictorio a primera vista dada la etiología propuesta para esta patología. Sin embargo, debería considerarse que la muestra podría contener -además de anticuerpos contra el canal de tipo P/Q- IgGs con afinidad hacia el canal de tipo N (Takamori *et al.* 1995; Motomura *et al.* 1997). Se sabe que este último canal puede compensar la falta del canal de tipo P/Q, tanto a nivel funcional (Urbano *et al.* 2003) como a nivel proteico (Pagani *et al.* 2004), y por lo tanto podría explicar la invariabilidad observada en los experimentos de inmuno-fluorescencia del músculo diafragma.

Por otro lado, se ha encontrado que la activación de los canales de  $Ca^{2+}$  de tipo N es relevante para la inducción de la actividad sináptica espontánea por los anticuerpos de ELA (Pagani *et al.* 2006). Sin embargo, este efecto no sería consecuencia de una interacción directa entre los

## 6 - DISCUSIÓN

---

anticuerpos y el canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , dado que la ausencia de la subunidad  $\text{Ca}_v2.2$  no modificó significativamente la interacción de la mayoría de las IgGs-ELA con la PNM de ratón (**Figura 5.6**). Lo que es más, en animales  $\text{Ca}_v2.1^{-/-}$ , donde se sabe que hay una compensación funcional en la transmisión neuromuscular por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N (Urbano *et al.* 2003), al igual que un incremento en los niveles de la proteína (Pagani *et al.* 2004), se pudieron detectar cambios substanciales en la inmuno-reactividad de algunas de las muestras de los pacientes con ELA (**Figura 5.5**). En su conjunto, estos resultados no apoyarían la hipótesis de una interacción directa entre los anticuerpos de ELA y el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N, sino que sugerirían un efecto indirecto de las IgGs sobre la actividad del canal, por ejemplo a través de una vía de señalización de segundos mensajeros, como ha sido extensivamente reportado (Lipscombe *et al.* 1989; Werz *et al.* 1993; Martin *et al.* 2006). De hecho, Pagani *et al.* (2006) detectaron un requerimiento de la activación de fosfolipasa C, el receptor de rianodina y el receptor de inositol trifosfato, para que se produzca la potenciación sináptica mediada por las IgGs-ELA. En un trabajo reciente también se ha reportado que los anticuerpos de ELA inducen la movilización de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo endoplásmico en ovocitos de *Xenopus laevis* que sobre-expresan las subunidades del receptor de NMDA (Texido *et al.* 2011).

### 6.4 - Otras proteínas presinápticas

Numerosos reportes han documentado la presencia de anticuerpos humanos en el soma y los terminales motoneuronales de los ratones inyectados con las IgGs-ELA (Fratantoni *et al.* 1996; Engelhardt *et al.* 2005). Estos

## 6 - DISCUSIÓN

---

antecedentes nos llevaron a hipotetizar una posible interacción de los anticuerpos con componentes pre-sinápticos. Para testear esta posibilidad utilizamos ensayos de inmuno-precipitación con las IgGs-ELA para estudiar su unión a varias proteínas presinápticas purificadas de extractos crudos de membrana de sinaptosomas de cerebelo. En estos experimentos encontramos que ninguna de las muestras ELA analizadas mostró afinidad hacia las proteínas presentes en los terminales sinápticos, tales como sinaptotagmina I, syntaxina 1A, sinaptofisina y sinaptobrevina II, a pesar de que todas se pudieron detectar fácilmente en el lisado original (**Figura 5.18**). Otros candidatos a testear en futuros experimentos incluyen moléculas de matriz extracelular, receptores de neurotrofinas y proteínas involucradas en la sinaptogénesis y guiado de axones, dado su rol propuesto durante la neurodegeneración (Glas *et al.* 2007; Dawbarn y Allen 2003; Schmidt *et al.* 2009).

Otro enfoque experimental consistió en estudiar de una manera más general las proteínas que interactuaban con las IgGs-ELA. Para ello utilizamos la técnica de inmuno-precipitación para aislar aquellos complejos proteicos reconocidos por los anticuerpos de ELA en diversas preparaciones. En particular, realizamos una comparación entre los animales de genotipo  $Ca_v2.1^{+/+}$  y  $Ca_v2.1^{-/-}$  partiendo de extractos crudos de membrana cerebelar, proteínas totales de cerebelo, purificados de *rafts* o preparaciones de músculo, ya sea focalizando el estudio en los sueros que mostraron afinidad hacia la PNM o comparando éstos con los no moduladores.

En ninguna de las condiciones experimentales testeadas con proteínas cerebelares pudimos encontrar alguna banda diferencial que sugiriera la presencia de una proteína interactuante con niveles inferiores

## 6 - DISCUSIÓN

---

en los extractos de los animales transgénicos (**Figuras 5.19A, 5.19B y 5.23**). En general, las diferencias detectadas correspondieron a proteínas con una mayor expresión en los animales  $Ca_v2.1^{-/-}$ , respecto de los salvajes. Esto podría deberse a que el antígeno de la PNM -de estar presente en los sinaptosomas de cerebelo- muestre una afinidad poco estable o menor hacia las IgGs-ELA y de este modo se imposibilite su purificación por ensayos de precipitación.

En lo que respecta a la PNM (**Figura 5.19C**), se podría especular que los resultados negativos obtenidos utilizando esta preparación derivan de la probable pobre representación de proteínas pre-sinápticas en el extracto final. Uno de los factores que contribuye a esta situación puede ser la gran desproporción de proteínas musculares respecto de las presentes en el terminal motor. Lamentablemente no se dispone actualmente de ninguna técnica análoga a la purificación de sinaptosomas del sistema nervioso central que nos permita realizar un enriquecimiento selectivo en proteínas pre-sinápticas de la placa motora.

### **6.5 - Proteómica comparativa de la sinapsis $Ca_v2.1^{+/+}$ y $Ca_v2.1^{-/-}$**

Existen escasos reportes donde se estudien cambios en la expresión génica como consecuencia de la delección de la subunidad  $Ca_v2.1$ . Se ha publicado un solo trabajo que analiza de manera sistemática la expresión de los ARN mensajeros en el hipocampo por medio de un ensayo de microarreglos (Piedras-Renteria *et al.* 2004).

Desafortunadamente, en esta publicación los autores se centraron principalmente en aquellas proteínas que aumentaban sus niveles de mensajeros en ausencia del canal. Además, debido a todos los procesos

## 6 - DISCUSIÓN

---

regulatorios que ocurren posteriormente a la transcripción de un gen, se sabe que un cambio en la cantidad de ARN mensajero no necesariamente se traduce en una modificación en los niveles de la proteína que codifica. Ante la falta de reportes a nivel proteico, decidimos emprender un estudio global para detectar e identificar cambios de expresión por medio de técnicas de proteómica, y centrar dicho estudio en la sinapsis.

El análisis comparativo de ambos proteomas reveló que la mayoría de las proteínas presentes en los sinaptosomas de cerebelo mantuvo sus niveles invariantes en respuesta a la delección del gen *Cacna1a*, como se observa en la **Figura 5.20**. Sin embargo, algunos componentes de la muestra sí evidenciaron cambios sustanciales en ausencia del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q, los cuales se vieron reflejados en la cuantificación de su intensidad (**Figura 5.21**). Todas las proteínas diferenciales -con excepción de la muestra número 3- pudieron ser identificadas satisfactoriamente por espectrometría de masa y correspondieron a siete productos génicos diferentes (**Figura 5.22 y Tabla 5.3**).

Las proteínas que mostraron niveles alterados en sinaptosomas de ratones carentes del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q incluyeron moléculas involucradas en el metabolismo energético (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y ATP sintetasa mitocondrial), la dinámica citoesquelética (sustrato de quinasa C rico en alanina miristoilado, cofilina-1 y proteína ácida soluble de cerebro-1), la señalización regulada por  $\text{Ca}^{2+}$  (calmodulina) y la exocitosis (secernina-1).

La modificación en los niveles de ciertas proteínas detectado en la sinapsis de los ratones  $\text{Ca}_v2.1^{-/-}$  podría representar una activación de mecanismos compensatorios ante la falta de esta importante vía de entrada

## 6 - DISCUSIÓN

---

de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la actividad neuronal. Por ejemplo, las disminuciones observadas se podrían deber a que algunas proteínas necesiten de la expresión y/o actividad del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q para expresarse y/o estar presentes en los terminales sinápticos. De hecho, Piedras Rentería (2004) ha reportado modificaciones en la cantidad de ARN mensajeros de numerosos genes en el hipocampo de estos animales transgénicos.

Otro aspecto a tener en cuenta es el rol que se ha propuesto para el  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa a las células por los CCDVs en la regulación de la transcripción (Barbado *et al.* 2009). Esta modulación puede ser tanto positiva como negativa y provee una asociación interesante entre la actividad neuronal y la expresión génica. Además de la inducción transcripcional inducida por el canal de tipo P/Q mencionada anteriormente, se ha visto que el  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa a las células a través del canal de tipo L controla la expresión del receptor de inositol trifosfato por medio de la activación de calcineurina (Genazzani *et al.* 1999). También se ha reportado que el canal de tipo N puede estimular la transcripción de la tirosina hidroxilasa en neuronas sensoriales (Brosenitsch y Katz 2001). Otros procesos susceptibles de ser regulados por cambios en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  son los mecanismos post-transcripcionales que controlan el *splicing* y la estabilidad de los ARN mensajeros (Barbado *et al.* 2009).

### 6.5.1 - Metabolismo energético

La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa es una enzima tetramérica que cataliza una reacción crucial de la vía glucolítica, llevando a la producción de

## 6 - DISCUSIÓN

---

ATP. Además de su rol en la glucólisis, se ha reportado que esta enzima está involucrada en muchos otros procesos celulares como la reparación del ADN, la exportación de ARN de transferencia, el transporte y la fusión de membranas, la dinámica citoesqueletaria y la muerte celular (Tristan *et al.* 2011).

Con respecto a la relación entre el  $\text{Ca}^{2+}$  y la energética mitocondrial, se ha visto que en las neuronas, las mitocondrias se encuentran frecuentemente agrupadas en los sitios de alta actividad de los canales del retículo endoplásmico que liberan  $\text{Ca}^{2+}$  (receptor de rianodina y receptor de inositol trifosfato). Se cree que la alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en estos sitios de liberación induce la producción mitocondrial de ATP por medio de la activación de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs (piruvato,  $\alpha$ -cetoglutarato e isocitrato deshidrogenasas), las cuales son sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  (Clapham 2007).

El aumento observado en los niveles de la subunidad  $\alpha$  de la ATPasa podría ser consecuencia de una menor activación de algunas enzimas del ciclo de Krebs acoplada a la disminución en los niveles de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, detectada en este trabajo. De hecho, se sabe que en los animales  $\text{Ca}_v2.1^{-/-}$  la corriente de calcio total en neuronas cerebelares está disminuida entre un 65 y 70 % (Jun *et al.* 1999). Se podría especular que para mantener la producción de ATP en estas condiciones sería necesario incrementar la cantidad de la enzima responsable de la síntesis de ATP. No obstante, para saber si el cambio detectado representa un incremento real en el número de moléculas de ATPasa sería imperioso estudiar si este aumento también implica a las otras subunidades que componen la enzima.

### 6.5.2 - Citoesqueleto

Tres de las proteínas que mostraron cambios significativos en sus niveles sinápticos están involucradas en la dinámica citoesqueletaria. MARCKS actúa como una proteína entrecruzadora de actina F modulada por proteína quinasa C y el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (Hartwig *et al.* 1992) mientras que BASP-1 regula el citoesqueleto de actina y el crecimiento de neuritas (Frey *et al.* 2000). Por su parte se ha propuesto que cofilina-1 cumple funciones en el desensamblado, la nucleación y la estabilización de los filamentos de actina dependiendo de la concentración local que presente (Andrianantoandro y Pollard 2006).

El hecho de que varias proteínas que regulan el mismo proceso hayan mostrado una disminución en los animales que carecen del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q sugiere la ocurrencia de un desbalance en la dinámica citoesqueletaria en este modelo experimental. Sin embargo, no se ha reportado que estos ratones tengan alguna alteración evidente en su citoarquitectura en regiones como el cerebelo o la PNM donde hay una alta expresión del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Jun *et al.* 1999; Urbano *et al.* 2003; Miyazaki *et al.* 2006). Además, como las moléculas que se encontraron alteradas cumplen funciones diversas, resulta difícil predecir cuál sería el resultado neto de la ausencia de este canal de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la estructura citoesqueletaria. Por lo tanto, se podría especular que los cambios en estas proteínas se compensarían mutuamente, minimizando el impacto de las modificaciones sobre los filamentos de actina.

### 6.5.3 - Señalización de $Ca^{2+}$

Existen numerosas asociaciones entre el canal de tipo P/Q y proteínas sensoras de  $Ca^{2+}$ , entre las que se destaca la calmodulina, una de las macromoléculas que ha mostrado un aumento en sus niveles sinaptosomales en este trabajo.

Se ha reportado que la calmodulina se une a un dominio C-terminal en la subunidad  $Ca_v2.1$  e induce la inactivación y la facilitación dependiente de  $Ca^{2+}$  del canal (Lee *et al.* 1999; Lee *et al.* 2000). Se cree que esta regulación es importante para los fenómenos de plasticidad sináptica dependientes de actividad. Interesantemente, otra molécula implicada en estos mecanismos regulatorios -la calmodulina quinasa II $\alpha$ - también ha mostrado un incremento significativo en sus niveles de ARN mensajero en el hipocampo de ratones  $Ca_v2.1^{-/-}$  (Piedras-Renteria *et al.* 2004). Todos estos antecedentes sugieren una posible inducción de varios componentes de la vía involucrada en la regulación de la plasticidad sináptica en este modelo experimental.

### 6.5.4 - Exocitosis

La secernina-1 es una proteína citosólica que estimula la exocitosis en los mastocitos (Way *et al.* 2002) por mecanismos que todavía no se conocen con exactitud. Curiosamente, la fusión de vesículas en este tipo celular se encuentra mediada por la misma maquinaria exocitótica que opera en las neuronas y las células neuroendócrinas (Guo *et al.* 1998). Además, experimentos de hibridización *in situ* han revelado la presencia del ARN mensajero para esta proteína en varias regiones del sistema nervioso, como el cerebelo, el hipocampo y la médula espinal (Allen Brain Atlas; [118](http://www.brain-</a></p></div><div data-bbox=)

## 6 - DISCUSIÓN

---

map.org), datos que sugerirían un rol en otros tipos celulares. Adicionalmente, se sabe que la maquinaria de liberación en las sinapsis hipocampales de los animales  $Ca_v2.1^{-/-}$  presenta una mayor sensibilidad al  $Ca^{2+}$  (Piedras-Renteria *et al.* 2004).

Suponiendo que secernina-1 también desempeñe funciones excitóticas en células neuronales, se podría especular que esta mayor liberación en respuesta a la entrada de  $Ca^{2+}$  se podría explicar en parte por el aumento en los niveles de esta proteína detectado en el presente estudio.

### 6.5.5 - *BASP-1*

La proteína ácida soluble de cerebro-1 (*BASP-1/NAP-22/CAP-23*) es una macromolécula de membrana que se encuentra altamente expresada en neuronas en el adulto y se localiza en regiones sinápticas tales como la membrana presináptica y la membrana vesicular (Maekawa *et al.* 1993; Iino *et al.* 1999). Está especialmente enriquecida en los microdominios abundantes en colesterol conocidos como *rafts* a los cuales se une por un grupo miristoilo (Maekawa *et al.* 1999) y donde se cree que cumple funciones relacionadas con la organización de la membrana, en particular con la maduración de los filamentos de actina. Además, se vio que la expresión de *BASP-1* aumenta cuando los axones se encuentran en proceso de elongación y su sobre-expresión en neuronas adultas promueve la ramificación axonal (Caroni 1997). Un trabajo publicado recientemente también propone un rol para *BASP-1* en la regulación de la endocitosis debido a su interacción e inhibición de sinaptojanina-1, una fosfatasa clave para el desprendimiento de las vesículas recubiertas de clatrina (Takaichi *et al.* 2012). Otras funciones reportadas para esta proteína incluyen la

## 6 - DISCUSIÓN

---

participación en procesos como la regulación de la transcripción (Green *et al.* 2009), la apoptosis (Sanchez-Nino *et al.* 2010) y la formación de canales (Ostroumova *et al.* 2011).

La expresión de BASP-1 en el sistema nervioso es bastante amplia, destacándose en regiones del cerebro anterior como la corteza cerebral, la formación hipocampal, el bulbo olfatorio, los ganglios basales y el tálamo. En el cerebelo la inmuno-reactividad de BASP-1 ha sido observada principalmente en las células granulares y en estructuras que se cree son los terminales de las fibras musgosas (Iino *et al.* 1999). A nivel de la médula espinal se ha detectado claramente la expresión del ARN mensajero en el soma de las grandes neuronas del asta ventral (motoneuronas inferiores), así como también la presencia de la proteína tanto en terminales sinápticos que rodean los somas de las motoneuronas como en la PNM (Iino y Maekawa 1999; Frey *et al.* 2000; Iino *et al.* 2004).

Los ratones que tienen genéticamente delecionada la expresión de BASP-1 presentan una alta tasa de mortalidad post-natal, anomalías severas en el sistema nervioso y malformaciones a nivel de la PNM (Frey *et al.* 2000). Todas estas evidencias indican que esta proteína está involucrada en forma crítica en procesos fisiológicos normales.

Una de las características bioquímicas distintivas de BASP-1 (que también es compartida por MARCKS) es su comportamiento anómalo en separaciones electroforéticas, lo cual lleva a que el peso molecular observado difiera significativamente del esperado y a que dependa del porcentaje de acrilamida utilizado (Maekawa *et al.* 1993). Esto explicaría las discrepancias encontradas en el peso molecular al momento de realizar las identificaciones por espectrometría de masa de estas dos proteínas.

## 6 - DISCUSIÓN

---

De todos los productos génicos analizados comparativamente entre animales  $Ca_v2.1^{+/+}$  y  $Ca_v2.1^{-/-}$ , BASP-1 se destaca como uno de los candidatos más interesantes a ser el antígeno reconocido por las IgGs-ELA, por varias razones: 1) presenta una disminución significativa en sus niveles en paralelo a la ausencia del canal de  $Ca^{2+}$  de tipo P/Q (resultados del presente trabajo), 2) se expresa en altos niveles tanto en terminales sinápticos de cerebelo como en la PNM (Iino *et al.* 1999; Iino y Maekawa 1999; Frey *et al.* 2000; Iino *et al.* 2004), 3) su localización subcelular incluye la membrana presináptica y la membrana vesicular (Maekawa *et al.* 1993; Iino *et al.* 1999), y 4) está involucrada en la regulación de la endocitosis vesicular (Takaichi *et al.* 2012). Por lo tanto, BASP-1 es una de las proteínas cuya interacción con los anticuerpos de ELA será evaluada con más detalle en futuros abordajes experimentales.

### 6.6 - Perspectivas futuras

La correlación encontrada entre la ausencia del canal P/Q y la falta de unión y efecto de las IgGs-ELA sobre la PNM aporta una herramienta importante para el direccionamiento de futuros estudios tendientes a dilucidar la identidad del antígeno de ELA. Sin embargo, todavía restan realizar estudios funcionales más detallados para clarificar la relevancia funcional de la delección del canal de  $Ca^{2+}$  en el contexto de la patología. Por ejemplo, se debería estudiar si los ratones  $Ca_v2.1^{-/-}$  son menos susceptibles que los salvajes a la disfunción neuromuscular inducida por la transferencia pasiva de las IgGs-ELA. Además, se podría testear en experimentos *in vitro* si los preparados de músculo de estos ratones presentan un menor influjo de  $Ca^{2+}$

## 6 - DISCUSIÓN

---

o liberación desde depósitos intracelulares, en respuesta a la incubación con los anticuerpos de ELA.

Los estudios de proteómica de la sinapsis realizados en este trabajo sugieren como un candidato interesante a ser el antígeno de ELA a la proteína BASP-1. No obstante, resultaría imperioso llevar a cabo un análisis más detallado a fin de establecer su posible interacción con las IgGs-ELA. Por ejemplo, se podrían utilizar sistemas de expresión transiente para enriquecer los lisados celulares en la proteína de interés y así favorecer su detección en los ensayos de inmuno-precipitación.

Asimismo, se debería evaluar la unión de las IgGs-ELA a cada una de las otras macromoléculas que mostraron una expresión disminuida en terminales de ratones  $Ca_v2.1^{-/-}$  (MARCKS, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, cofilina-1). En este sentido, también representaría un aporte valioso la validación de los resultados de proteómica empleando metodologías alternativas y más sensibles, como la de ITRAQ (*isobaric peptide tags for relative and absolute quantification*) o 2D-DIGE (*two-dimensional difference gel electrophoresis*). Estas técnicas permitirían además ampliar la lista de proteínas candidato a ser evaluadas y facilitarían el camino hacia una eventual identificación.

### 6.7 - Conclusiones generales

Los resultados mostrados en este trabajo aportan evidencias relevantes a favor de la hipótesis de auto-inmunidad como uno de los posibles mecanismos que contribuyen a la patología de ELA. También sugieren por primera vez que los auto-anticuerpos en el suero de algunos pacientes se unirían a una(s) proteína(s) cuya presencia en la PNM se encontraría

## 6 - DISCUSIÓN

---

asociada a la expresión de la subunidad formadora del poro del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q ( $\text{Ca}_v2.1$ ), pero no a la del tipo N ( $\text{Ca}_v2.2$ ). Adicionalmente, nuestros datos indican que este antígeno se localizaría preferentemente en la PNM de ratón, a diferencia de lo que ocurre en el soma de las células de Purkinje, motoneuronas superiores e inferiores, donde su expresión sería menor y/o menos dependiente de la presencia de la subunidad  $\text{Ca}_v2.1$ .

Las evidencias aquí presentadas contribuirán a establecer el valor de las IgGs como marcadores biológicos en ELA, así como también su rol en el desarrollo de la patología. También ayudarán en la identificación de los antígenos potencialmente relevantes para la etiología de la enfermedad y en la orientación de futuras investigaciones hacia el descubrimiento e implementación de tratamientos terapéuticos más efectivos que los empleados en la actualidad.

---

Lic. Laura E. González

---

Dr. Osvaldo D. Uchitel

---

Dra. Mónica L. Kotler

# Referencias Bibliográficas





- Aidley D. J. (1989) The physiology of excitable cells. Cambridge University Press, Reino Unido.
- Alexianu M. E., Ho B. K., Mohamed A. H., La Bella V., Smith R. G. y Appel S. H. (1994) The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **36**, 846-858.
- Alexianu M. E., Kozovska M. y Appel S. H. (2001) Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurol.* **57**(7), 1282-1289.
- Andrianantoandro E. y Pollard T. D. (2006) Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol. Cell.* **24**, 13-23.
- Angleson J. K. y Betz W. J. (2001) Intraterminal  $Ca^{2+}$  and spontaneous transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Neurophysiol.* **85**, 287-294.
- Appel S. H., Stockton-Appel V., Stewart S. S. y Kerman R. H. (1986) Amyotrophic lateral sclerosis: associated clinical disorders and immunological evaluation. *Arch. Neurol.* **43**, 234-238.
- Appel S. H., Engelhardt J. I., Garcia J. y Stefani E. (1991) Immunoglobulins from animal model of motor neurons disease and from human amyotrophic lateral sclerosis patients passively transfer physiological abnormalities to the neuromuscular junction. *P.N.A.S. USA* **88**, 647-651.

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Appel S. H., Smith R. G., Englehardt J. I. y Stefani E. (1993) Evidence for autoimmunity in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **118**, 169-174.

Appel S. H., Beers D., Siklos L., Engelhardt J. I. y Mosier D. R. (2001) Calcium: the Darth Vader of ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* **2**, S47-S54.

Arikkath J. y Campbell K. P. (2003) Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**(3), 298-307.

Arsac C., Raymond C., Martin-Moutot N., Dargent B., Couraud F., Pouget J. y Seagar M. (1996) Immunoassays fail to detect antibodies against neuronal calcium channels in amyotrophic lateral sclerosis serum. *Ann. Neurol.* **40**, 695-700.



Barbado M., Fablet K., Ronjat M. y De Waard M. (2009) Gene regulation by voltage-dependent calcium channels. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 1096-1104.

Bensimon G., Lacomblez L. y Meininger V. (1994) A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N. Engl. J. Med.* **330**(9), 585-591.

Bowling A. C., Schulz J. B., Brown R. H. y Beal M. F. (1993) Superoxide dismutase activity, oxidative damage and mitochondrial energy

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **61**, 2322-2325.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brogden R. N. y Markham A. (1997) Mibefradil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in the management of hypertension and angina pectoris. *Drugs* **54**(5), 774-793.
- Brooks B. (1994) El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial 'Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis' workshop contributors. *J. Neurol. Sci.* **142**, 96-107.
- Brosenitsch T. A. y Katz D. M. (2001) Physiological patterns of electrical stimulation can induce neuronal gene expression by activating N-type calcium channels. *J. Neurosci.* **21**, 2571-2579.
- Brown R. H., Johnson D., Ogonowski M. y Weiner H. L. (1987) Antineural antibodies in the serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol.* **37**, 152-155.
- Brown R. H., Meininger V. y Swash M. (2000) Amyotrophic Lateral Sclerosis. Primera edición. Martin Dunitz Ltd., Londres.

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Bruijn L. I., Miller T. M. y Cleveland D. W. (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 723-749.



Caroni P. (1997) Intrinsic neuronal determinants that promote axonal sprouting and elongation. *Bioessays* **19**, 767-775.

Carriedo S. G., Yin H. Z. y Weiss J. H. (1996) Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J. Neurosci.* **16**, 4069-4079.

Carter J. R. y Mynlieff M. (2003) Amyotrophic lateral sclerosis patient IgG alters voltage dependence of Ca<sup>2+</sup> channels in dissociated rat motoneurons. *Neurosci. Lett.* **353**, 221-225.

Catterall W. A. (2000) Structure and regulation of voltage gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **16**, 521-555.

Catterall W. A., Perez-Reyes E., Snutch T. P. y Striessnig J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 411-425.

Catterall W. A. y Few A. P. (2008) Calcium Channel Regulation and Presynaptic Plasticity. *Neuron* **59**, 882-901.

Chung C. y Kavalali E. T. (2006) Seeking a function for spontaneous neurotransmission. *Nat. Neurosci.* **9**(8), 989-990.

Clapham D. E. (2007) Calcium Signaling. *Cell* **131**, 1047-1058.

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Couratier P., Yi F. H., Preud'homme J. L., Clavelou P., White A., Sindou P., Vallat J. M. y Jauberteau M. O. (1998) Serum autoantibodies to neurofilament proteins in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **154**, 137-145.



Davies A., Hendrich J., Van Minh A. T., Wratten J., Douglas L. y Dolphin A. C. (2007) Functional biology of the  $\alpha_2\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 220-228.

Dawbarn D. y Allen S. J. (2003) Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* **29**, 211-230.

DeLong M. R. y Strick P. L. (1974) Relation of basal ganglia, cerebellum, and motor cortex units to ramp and ballistic movements. *Brain Res.* **71**, 327-335.

Demestre M., Pullen A., Orrell R. W. y Orth M. (2005) ALS-IgG-induced selective motor neurone apoptosis in rat mixed primary spinal cord cultures. *J. Neurochem.* **94**, 268-275.

Di Giorgio F. P., Carrasco M. A., Siao M. C., Maniatis T. y Eggan K. (2007) Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat. Neurosci.* **10**(5), 608-614.

Dolphin A. C. (2003)  $\beta$  subunits of voltage-gated calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* **35**, 599-620.

Dolphin A. C. (2009) Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channels subunits. *Curr. Opin. Neurobiol.* **19**, 237-244.

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Drachman D. B. y Kuncl R. W. (1989) Amyotrophic lateral sclerosis: an unconventional autoimmune disease? *Ann. Neurol.* **26**, 269-274.

Drachman D. B., Fishman P. S., Rothstein J. D., Motomura M., Lang B., Vincent A. y Mellits E. D. (1995) Amyotrophic lateral sclerosis: an autoimmune disease? *Adv. Neurol.* **68**, 59-65.



Ekester E. (2004) Neurotrophic factors and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener. Dis.* **1**, 88-100.

Engelhardt J. I. y Appel S. H. (1990) IgG reactivity in the spinal cord and motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* **47**, 1210-1216.

Engelhardt J. I., Appel S. H. y Killian J. M. (1990) Motor neuron destruction in guinea pigs immunized with bovine spinal cord ventral horn homogenate: experimental autoimmune gray matter disease. *J. Neuroimmunol.* **27**, 21-31.

Engelhardt J. I., Tajti J. y Appel S. H. (1993) Lymphocytic infiltrates in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* **50**(1), 30-36.

Engelhardt J. I., Siklós L., Kömüves L., Smith R. G. y Appel S. H. (1995) Antibodies to calcium channels from ALS patients passively transferred to mice selectively increase intracellular calcium and induce ultrastructural changes in motoneurons. *Synapse* **20**(3), 185-199.

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Engelhardt J. I., Soos J., Obal I., Vigh L. y Siklos L. (2005) Subcellular localization of IgG from the sera of ALS patients in the nervous system. *Acta Neurol. Scand.* **112**, 126-133.

**F**

Fabian R. H. y Petroff G. (1987) Intraneuronal IgG in the central nervous system: uptake by retrograde axonal transport. *Neurol.* **37**(11), 1780-1784.

Fatt P. y Katz B. (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol.* **117**(1), 109-128.

Fischer M. D., Gorospe J. R., Felder E., Bogdanovich S., Pedrosa F., Ahima R. S., Rubinstein N. A., Hoffman E. P. y Khurana T. S. (2002) Expression profiling reveals metabolic and structural components of extraocular muscles. *Physiol. Genomics.* **9**, 71-84.

Flucher B. E. y Daniels M. P. (1989) Distribution of Na<sup>+</sup> channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kd protein. *Neuron* **3**, 163-175.

Forsberg K., Andersen P. M., Marklund S. L. y Brannstrom T. (2011) Glial nuclear aggregates of superoxide dismutase-1 are regularly present in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* **121**(5), 623-634.

Fratantoni S. A., Dubrovsky A. L. y Uchitel O. D. (1996) Uptake of immunoglobulin G from amyotrophic lateral sclerosis patients by motor nerve terminals in mice. *J. Neurol. Sci.* **137**, 97-102.

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Frey D., Laux T., Xu L., Schneider C. y Caroni P. (2000) Shared and Unique Roles of CAP23 and GAP43 in Actin Regulation, Neurite Outgrowth, and Anatomical Plasticity. *J. Cell Biol.* **149**(7), 1443-1453.



Genazzani A. A., Carafoli E. y Guerini D. (1999) Calcineurin controls inositol 1,4,5-triphosphate type 1 receptor expression in neurons. *P.N.A.S. USA* **96**, 5797-5801.

Glas M., Popp B., Angele B., Koedel U., Chahli C., Schmalix W. A., Anneser J. M., Pfisterand H. W. y Lorenzl S. (2007) A role for the urokinase-type plasminogen activator system in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* **207**(2), 350-356.

Gray E. G. y Whittaker V. P. (1962) The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J. Anat.* **96**, 79-88.

Green L. M., Wagner K. J., Campbell H. A., Addison K. y Roberts S. G. E. (2009) Dynamic interaction between WT1 and BASP1 in transcriptional regulation during differentiation. *Nucleic Acids Res.* **37**, 431-440.

Greiner A., Schmausser B., Petzold K., Kruger H. y Marx A. (1996) Neuronal targets of serum and cerebrospinal fluid autoantibodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* **91**, 67-71.

Grillner S. y Wallen P. (1985) Central pattern generators for locomotion, with special reference to vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.* **8**, 233-261.

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Groenewegen H. J. (2003) The basal ganglia and motor control. *Neural Plast.* **10**, 107-120.

Gros-Louis F., Gaspar C. y Rouleau G. A. (2006) Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1762**, 956-972.

Guo Z. H., Turner C. y Castle D. (1998) Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellipodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells. *Cell* **94**, 537-548.

**H**

Hartwig J. H., Thelen M., Rosen A., Janmey P. A., Nairn A. C. y Aderem A. (1992) MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* **356**, 618-622.

Hirano A. (1996) Neuropathology of ALS: an overview. *Neurol.* **47**, S63-S66.

Hofmann F., Lacinova L. y Klugbauer N. (1999) Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **139**, 33-87.

Hubbard J. I., Jones S. F. y Landau E. M. (1968) On the mechanism by which calcium and magnesium affect the spontaneous release of transmitter from mammalian motor nerve terminals. *J. Physiol.* **194**, 355-380.

### J

Iino S. y Maekawa S. (1999) Immunohistochemical demonstration of a neuronal calmodulin-binding protein, NAP-22, in the rat spinal cord. *Brain Res.* **834**, 66-73.

Iino S., Kobayashi S. y Maekawa S. (1999) Immunohistochemical localization of a novel acidic calmodulin-binding protein, NAP-22, in the rat brain. *Neurosci.* **91**, 1435-1444.

Iino S., Taguchi K., Maekawa S. y Nojyo Y. (2004) Motor, sensory and autonomic nerve terminals containing NAP-22 immunoreactivity in the rat muscle. *Brain Res.* **1002**, 142-150.

Iwasaki S. y Takahashi T. (1998) Developmental changes in calcium channel types mediating synaptic transmission in rat auditory brainstem. *J. Physiol.* **509**, 419-423.

### J

Johnston C. A., Stanton B. R., Turner M. R., Gray R., Blunt A. H., Butt D., Ampong M. A., Shaw C. E., Leigh P. N. y Al-Chalabi A. (2006) Amyotrophic lateral sclerosis in an urban setting: a population based study of inner city London. *J. Neurol.* **253**(12), 1642-1643.

Jun K., Piedras-Renteria E. S., Smith S. M., Wheeler D. B., Lee S. B., Lee T. G., Chini H., Adams M. E., Scheller R. H., Tsien R. W. y Shin H. S. (1999) Ablation of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel currents, altered synaptic transmission,

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

and progressive ataxia in mice lacking the  $\alpha_{1A}$ -subunit. *P.N.A.S. USA* **96**, 15245-15250.

### K

Katz E., Ferro P. A., Weisz G. y Uchitel O. D. (1996) Calcium channels involved in synaptic transmission at the mature and regenerating mouse neuromuscular junction. *J. Physiol. (Lond.)* **497**, 687-697.

Katz E., Protti D. A., Ferro P. A., Rosato Siri M. D. y Uchitel O. D. (1997) Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker neurotoxins on transmitter release and presynaptic currents at the neuromuscular junction. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 1531-1540.

Kawamata T., Akiyama H., Yamada T. y McGeer P. L. (1992) Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am. J. Pathol.* **140**(3), 691-707.

Kiernan J. A. y Hudson A. J. (1993) Anti-neurone antibodies are not characteristic of amyotrophic lateral sclerosis. *NeuroReport* **4**, 427-430.

Kim K. K., Adelstein R. S. y Kawamoto S. (2009) Identification of Neuronal Nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J. Biol. Chem.* **284**(45), 31052-31061.

### L

Lacomblez L., Bensimon G., Leigh P. N., Guillet P. y Meininger V. (1996) Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis.

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet*. **347**(9013), 1425-1431.
- Lang B. y Vincent A. (2009) Autoimmune disorders of the neuromuscular junction. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 336-340.
- Lee A., Wong S. T., Gallagher D., Li B., Storm D. R., Scheuer T. y Catterall W. A. (1999) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. *Nature* **399**(6732), 155-159.
- Lee A., Scheuer T. y Catterall W. A. (2000) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent facilitation and inactivation of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Neurosci.* **20**(18), 6830-6838.
- Leveille A. J., Ciernan A. J., Goodwin J. A. y Antel J. (1982) Eye movements in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* **39**, 684-686.
- Lipscombe D., Kongsamut S. y Tsien R. W. (1989) Alpha-adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating. *Nature* **340**(6235), 639-642.
- Llano I., Gonzalez J., Caputo C., Lai F. A., Blayney L. M., Tan Y. P. y Marty A. (2000) Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients. *Nat. Neurosci.* **3**, 1256-1265.
- Llinas R., Sugimori M., Hillman D. E. y Cherksey B. (1992) Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci.* **15**(9), 351-355.
- Llinas R., Sugimori M., Cherksey B. D., Smith R. G., Delbono O., Stefani E. y Appel S. (1993) IgG from amyotrophic lateral sclerosis patients increases current through P-type calcium channels in mammalian

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

cerebellar Purkinje cells and in isolated channels protein in lipid bilayer. *P.N.A.S. USA* **90**, 11743-11747.

Losavio A. y Muchnik S (1997) Spontaneous acetylcholine release in mammalian neuromuscular junctions. *Am. J. Physiol.* **273**, C1835-C1841.

Lou X., Scheuss V. y Schneggenburger R. (2005) Allosteric modulation of the presynaptic Ca<sup>2+</sup> sensor for vesicle fusion. *Nature* **435**, 497-501.

### M

Maekawa S., Maekawa M., Hattori S. y Nakamura S. (1993) Purification and molecular cloning of a novel acidic calmodulin binding protein from rat brain. *J. Biol. Chem.* **268**, 13703-13709.

Maekawa S., Sato C., Kitajima K., Funatsu N., Kumanogoh H. y Sokawa Y. (1999) Cholesterol dependent localization of NAP-22 on a neuronal membrane microdomain (raft). *J. Biol. Chem.* **274**, 21369-21374.

Martin S. W., Butcher A. J., Berrow N. S., Richards M. W., Paddon R. E., Turner D. J., Dolphin A. C., Sihra T. S. y Fitzgerald E. M. (2006) Phosphorylation sites on calcium channel alpha 1 and beta subunits regulate ERK-dependent modulation of neuronal N-type calcium channels. *Cell Calcium* **39**(3), 275-292.

McGeer P. L. y McGeer E. G. (2002) Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* **26**(4), 459-470.

Mendonca D. M. F., Chimelli L. y Martinez A. M. B. (2005) Quantitative evidence for neurofilament heavy subunit aggregation in motor neurons of

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- spinal cords of patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**, 925-935.
- Menzies F. M., Ince P. G. y Shaw P. J. (2002) Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem. Int.* **40**(6), 543-551.
- Mirsky R. y Jessen K. R. (1996) Schwann cell development, differentiation and myelination. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 89-96.
- Mitchell J. D. y Borasio G. D. (2007) Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* **369**, 2031-2041.
- Miyazaki T., Hashimoto K., Shin H. S., Kano M. y Watanabe M. (2006) P/Q-Type  $Ca^{2+}$  Channel  $\alpha_{1A}$  Regulates Synaptic Competition on Developing Cerebellar Purkinje Cells. *J. Neurosci.* **24**(7), 1734-1743.
- Mortz E., Krogh T. N., Vorum H. y Görg A. (2001) Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics* **1**(11), 1359-1363.
- Mosier D. R., Bardelli P. y Delbono O. (1995) Amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins increase  $Ca^{2+}$  current in a motor neuron cell line. *Ann. Neurol.* **37**, 102-109.
- Mosier D. R., Siklos L. y Appel S. H. (2000) Resistance of extraocular motoneuron terminals to effects of amyotrophic lateral sclerosis sera. *Neurol.* **54**, 252-255.
- Motomura M., Lang B., Johnston I., Palace J., Vincent A. y Newsom-Davis J. (1997) Incidence of serum anti-P/O-type and anti-N-type calcium channel

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

autoantibodies in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J. Neurol. Sci.* **147**(1), 35-42.

Muchnik S., Losavio A. y De Lorenzo S. (2002) Effect of amyotrophic lateral sclerosis serum on calcium channels related to spontaneous acetylcholine release. *Clin. Neurophysiol.* **113**, 1066-1071.

Mullen R. J., Buck C. R. y Smith A. M. (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* **116**, 201-211.



Nagai M., Re D. B., Nagata T., Chalazonitis A., Jessell T. M., Wichterle H. y Przedborski S. (2007) Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat. Neurosci.* **10**(5), 615-622.

Neusch C., Bahr M. y Schneider-Gold C. (2007) Glia cells in amyotrophic lateral sclerosis: new clues to understanding an old disease? *Muscle Nerve* **35**, 712-724.

Niebroj-Dobosz I., Dziewulska D. y Kwiecinski H. (2004) Oxidative damage to proteins in the spinal cord in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Folia Neuropathol.* **42**, 151-156.

Niebroj-Dobosz I., Dziewulska D. y Janik P. (2006) Auto-antibodies against proteins of spinal cord cells in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Folia Neuropathol.* **44**, 191-196.

Nolte J. (2001) The human brain. Mosby. Quinta edición. St. Louis.



- Ogata T. (1988) Structure of motor endplates in the different fiber types of vertebrate skeletal muscles. *Arch. Histol. Cytol.* **51**, 385-424.
- Orrenius S., Zhivotovsky B. y Nicotera P. (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Rev.* **4**, 552-565.
- Ostroumova O. S., Schagina L. V., Mosevisky M. I. y Zakharov V. V. (2011) Ion channel activity of brain abundant protein BASP1 in planar lipid bilayers. *FEBS J.* **278**, 461-469.



- Pagani R., Song M., McEnery M., Qin N., Tsien R. W., Toro L., Stefani E. y Uchitel O. D. (2004) Differential expression of  $\alpha 1$  and  $\beta$  subunits of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel at the neuromuscular junction of normal and P/Q  $\text{Ca}^{2+}$  channel knockout mouse. *Neurosci.* **123**, 75-85.
- Pagani M. R., Reisin R. C. y Uchitel O. D. (2006) Calcium signaling pathways mediating synaptic potentiation triggered by amyotrophic lateral sclerosis IgG in motor nerve terminals. *J. Neurosci.* **26**, 2661-2672.
- Paxinos G. y Franklin K. B. J. (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Second edition. Academic Press, Nueva York.
- Perissinotti P. P., Giugovaz-Tropper B. y Uchitel O. D. (2008) L-type calcium channels are involved in fast endocytosis at the mouse neuromuscular junction. *Eur. J. Neurosci.* **27**, 1333-1344.

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Pestronk A., Adams R. N., Cornblath D., Kuncl R. W., Drachman D. B. y Clawson L. (1989) Patterns of serum IgM antibodies to GM1 and GD1a gangliosides in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **25**, 98-102.
- Piedras-Renteria E. S., Pyle J. L., Diehn M., Glickfeld L. L., Harata N. C., Cao Y., Kavalali E. T., Brown P. O. y Tsien R. W. (2004) Presynaptic homeostasis at CNS nerve terminals compensates for lack of a key Ca<sup>2+</sup> entry pathway. *P.N.A.S. USA* **101**, 3609-3614.
- Protti D. A., Szczupak L., Scornik F. S. y Uchitel O. D. (1991) Effect of omega-conotoxin GVIA on neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *Brain Res.* **557**, 336-339.
- Pullen A. H. y Humphreys P. (2000) Ultrastructural analysis of spinal motoneurons from mice treated with IgG from ALS patients, healthy individuals, or disease controls. *J. Neurol. Sci.* **180**(1-2), 35-45.
- Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick D., Katz L. C., Lamantia A. S., McNamara J. O. y Williams S. M. (2004) Neuroscience. Third Edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland.



- Rosato Siri M. D. y Uchitel O. D. (1999) Calcium channels coupled to neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions. *J. Physiol.* **514**, 533-540.
- Rothstein J. D., Martin L. J. y Kuncl R. W. (1992) Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **326**, 1464-1468.

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Rothstein J. D., Van Kammen M., Levey A. I., Martin L. J. y Kuncl R. W. (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **38**, 73-84.

Rowland L. P. (1998) Diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **160**, S6-S24.

Rowland L. P. (2001) How amyotrophic lateral sclerosis got its name: the clinical-pathologic genius of Jean-Martin Charcot. *Arch. Neurol.* **58**(3), 512-515.



Salpeter M. M., Marchaterre M. y Harris R. (1988) Distribution of extrajunctional acetylcholine receptors on a vertebrate muscle: evaluated by using a scanning electron microscope autoradiographic procedure. *J. Cell Biol.* **106**, 2087-2093.

Sanchez-Nino D., Sanz A. B., Lorz C., Grinke A., Rastaldi M. P., Nair V., Egido J., Ruiz-Ortega M., Kretzler M. y Oritz A. (2010) BASP1 promotes apoptosis in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 610-621.

Sanes J. R. y Lichtman J. W. (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 389-442.

Schluep M., Roth-Wicky B. y Regli F. (1998) Amyotrophic lateral sclerosis Ig recognize CNS epitopes when passively transferred to mouse. *Schweizer Archive Fur Neurologie Und Psychiatrie* **149**(4), 178-183.

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Schmidt E. R. E., Pasterkamp R. J. y van den Berg L. H. (2009) Axon guidance proteins: Novel therapeutic targets for ALS? *Prog. Neurobiol.* **88**, 286-301.
- Shaw P. J., Chinnery R. M. y Ince P. G. (1994) <sup>3</sup>H-D-aspartate binding sited in the normal human spinal cord and changes in motor neuron disease: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res.* **655**, 195-201.
- Shaw P. J. y Eggett C. J. (2000) Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* **247**(S1), I17-I27.
- Sillitoe R. V. y Joyner A. L. (2007) Morphology, Molecular Codes, and Circuitry Produce the Three-Dimensional Complexity of the Cerebellum. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 549-577.
- Simpson C. L. y Al-Chalabi A. (2006) Amyotrophic lateral sclerosis as a complex genetic disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1762**, 973-985.
- Smaili S., Hirata H., Ureshino R., Monteforte P. T., Morales A. P., Muler M. L., Terashima J., Oseki K., Rosenstock T. R., Lopes G. S. y Bincoletto C. (2009) Calcium and cell death signaling in neurodegeneration and aging. *An. Acad. Bras. Cienc.* **81**(3), 467-475.
- Smith R. G., Hamilton S., Hoffman F., Schneider T., Nastainczyk W. y Birnbaumer L. (1992) Serum antibodies to L-type calcium channels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *New. Engl. J. Med.* **327**, 1721-1728.
- Smith R. G., Alexianu M. E., Crawford G., Nyormoi O., Stefani E. y Appel S. H. (1994) Cytotoxicity of immunoglobulins from amyotrophic lateral

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

sclerosis patients on a hybrid motoneuron cell line. *P.N.A.S. USA* **91**, 3393-3397.

Stenovec M., Milosevic M., Petrusic V., Potokar M., Stevic Z., Prebil M., Kreft M., Trkov S., Andjus P. R. y Zorec R. (2011) Amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins G enhance the mobility of LysoTracker-labelled vesicles in cultured rat astrocytes. *Acta Physiol.* **203**, 457-471.

Strock J. y Diverse-Pierluissi M. A. (2004)  $Ca^{2+}$  channels as integrators of G protein-mediated signaling in neurons. *Mol. Pharmacol.* **66**, 1071-1076.

Sun J., Pang Z. P., Qin D., Fahim A. T., Adachi R. y Südhof T. C. (2007) A dual- $Ca^{2+}$ -sensor model for neurotransmitter release in a central synapse. *Nature* **450**, 676-682.

Sutton K. G., McRory J. E., Guthrie H., Murphy T. H. y Snutch T. P. (1999) P/Q-type calcium channels mediate the activity-dependent feedback of syntaxin-1A. *Nature* **401**, 800-804.



Takaichi R., Odagaki S., Kumanogoh H., Nakamura S., Morita M. y Maekawa S. (2012) Inhibitory Effect of NAP-22 on the Phosphatase Activity of Synaptotagmin-1. *J. Neurosci. Res.* **90**(1), 21-27.

Takamori M., Takahashi M., Yasukawa Y., Iwasa K., Nemoto Y., Suenaga A., Nagataki S. y Nakamura T. (1995) Antibodies to recombinant synaptotagmin and calcium channel subtypes in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J. Neurol. Sci.* **133**(1-2), 95-101.

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Takeuchi A. y Takeuchi N. (1960) On the permeability of the end-plate membrane during action of transmitter. *J. Physiol. (Lond)* **154**, 52-67.
- Takeuchi A. y Takeuchi N. (1961) Changes in potassium concentration around motor nerve terminals, produced by current flow, and their effects on neuromuscular transmission. *J. Physiol.* **155**, 46-58.
- Texido L., Hernández S., Martín-Satué M., Povedano M., Casanovas A., Esquerda J., Marsal J. y Solsona C. (2011) Sera from amyotrophic lateral sclerosis patients induce the non-canonical activation of NMDA receptors "in vitro". *Neurochem. Int.* **59**(6), 954-964.
- Thomas M. M. y Dunn S. M. J. (1997) Amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins are ineffective in altering calcium influx through presynaptic voltage-sensitive calcium channels. *Neurol. Res.* **19**, 129-134.
- Thomas P. y Smart T. G. (2005) HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **51**, 187-200.
- Tristan C., Shahani N., Sedlak T. W. y Sawa A. (2011) The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments. *Cell. Signal.* **23**, 317-323.
- Troost D., Van Den Ord J. J. y Vianney De Jong J. M. (1990) Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* **16**, 401-410.

# U

- Uchitel O. D., Appel S. H., Crawford F. y Szczupak L. (1988) Immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients enhance spontaneous transmitter release from motor-nerve terminals. *P.N.A.S. USA* **85**, 7371-7374.
- Uchitel O. D., Scornik F., Protti D. A., Fumberg C. G., Alvarez V. y Appel S. H. (1992a) Long-term neuromuscular dysfunction produced by passive transfer of amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins. *Neurol.* **42**, 2175-2180.
- Uchitel O. D., Protti D. A., Sanchez V., Cherksey B. D., Sugimori M. y Llinas R. (1992b) P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *P.N.A.S. USA* **89**, 3330-3333.
- Urbano F. J. y Uchitel O. D. (1999) L-type calcium channels unmasked by cell-permeant  $Ca^{2+}$ -buffer at mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch.* **437**, 523-528.
- Urbano F. J., Piedras-Rentería E. S., Jun K., Shin H. S., Uchitel O. D. y Tsien R. W. (2003) Altered properties of quantal neurotransmitter release at endplates of mice lacking P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels. *P.N.A.S. USA* **100**, 3491-3496.



Valdmanis P. N., Daoud H., Dion P. A. y Rouleau G. A. (2009) Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **9**, 198-205.

Van Den Bosch L., Van Damme P., Bogaert E. y Robberecht W. (2006) The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1762**, 1068-1082.



Wasser C. R. y Kavalali E. T. (2009) Leaky synapses: regulation of spontaneous neurotransmission in central synapses. *Neurosci.* **158**(1), 177-188.

Way G., Morrice N., Smythe C. y O'Sullivan A. J. (2002) Purification and identification of secernin, a novel cytosolic protein that regulates exocytosis in mast cells. *Mol. Biol. Cell* **13**(9), 3344-3354.

Werz M. A., Elmslie K. S. y Jones S. W. (1993) Phosphorylation enhances inactivation of N-type calcium channel current in bullfrog sympathetic neurons. *Pflugers Arch.* **424**(5-6), 538-545.

Williams D. B. y Windebank A. J. (1991) Motor neuron disease (amyotrophic lateral sclerosis). *Mayo Clin. Proc.* **66**(1), 54-82.

Williamson T. L., Bruijn L. I., Zhu Q., Anderson K. L., Anderson S. D., Julien J. P. y Cleveland D. W. (1998) Absence of neurofilaments reduces the

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

selective vulnerability of motor neurons and slows disease caused by a familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutant. *P.N.A.S. USA* **95**, 9631-9636.



Xu Z., Cook L. C., Griffin J. W. y Cleveland D. W. (1993) Increased expression of new filament subunit NF-1 produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell* **73**, 23-33.

Xu L., Guo Y. S., Liu Y. L., Wu S. Y., Yang C., Wu D. X., Wu H. R., Zhang Y. S. y Li C. Y. (2009) Oxidative stress in immune-mediated motoneuron destruction. *Brain Res.* **1302**, 225-232.



Yee W. C., Pestronk A., Alderson K. y Yuan C. M. (1988) Regional heterogeneity in the distal motor axon: three zones with distinctive intrinsic components. *J. Neurocytol.* **17**, 649-656.



Zhainazarov A. B., Annunziata P., Toneatto S., Cherubini E. y Nistri A. (1994) Serum fractions from amyotrophic lateral sclerosis patients depress voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents of rat cerebellar granule cells in culture. *Neurosci. Lett.* **172**(1-2), 111-114.

Parte de los resultados de esta tesis fueron incluidos en las siguientes publicaciones:

- **Gonzalez L. E.**, Kotler M. L., Vattino L. G., Conti E., Reisin R. C., Mulatz K. J., Snutch T. P. y Uchitel O. D. (2011) Amyotrophic lateral sclerosis-immunoglobulins selectively interact with neuromuscular junctions expressing P/Q-type calcium channels. *J. Neurochem.* **119**(4), 826-838.
- Pagani M. R., **Gonzalez L. E.** y Uchitel O. D. (2012, en prensa) Autoimmunity in Amyotrophic Lateral Sclerosis: past and present. *Neurol. Res. Int.*

La mayoría de estos resultados también fueron presentados en los siguientes congresos:

- 41st Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Washington, DC, USA, Noviembre 12-16, 2011) "Analysis of amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins interaction with pre-synaptic proteins" **L. E. González**, M. L. Kotler, K. J. Mulatz, R. C. Reisin, T. P. Snutch, O. D. Uchitel.
- XXVI Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencia (Huerta Grande, Córdoba, Argentina, Octubre 18-22, 2011) "Analysis of amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins interaction with pre-synaptic proteins" **L. E. González**, M. L. Kotler, K. J. Mulatz, R. C. Reisin, T. P. Snutch, O. D. Uchitel.
- 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, California, USA, Noviembre 13-17, 2010) "Amyotrophic Lateral Sclerosis Immunoglobulins-G interact with calcium channels?" **L. E. González**, L. G. Vattino, M. L. Kotler, R. C. Reisin, O. D. Uchitel.
- II Reunión Conjunta de Neurociencias (IRCN) (Huerta Grande, Córdoba, Argentina, Octubre 8-10, 2010) "P/Q-type calcium channel  $\alpha_1$  subunit is necessary for ALS-IgGs spontaneous synaptic activity modulation on mouse neuromuscular junction" Vattino L. G., **González L. E.**, Kotler M. L., Reisin R. C., Uchitel O. D.
- I Reunión Conjunta de Neurociencias (IRCN) (Huerta Grande, Córdoba, Argentina, Septiembre 4-6, 2009) "Amyotrophic Lateral Sclerosis auto-

antibodies and absence of P/Q-type calcium channels” **González L.**, Kotler M., Sanchez V., Reisin R., Uchitel O.

- Gordon Research Conference - Phosphorylation and G-protein mediated signaling networks (Biddeford, Maine, USA, Junio 7-12, 2009) “Amyotrophic Lateral Sclerosis auto-antibodies and absence of P/Q-type calcium channels” **González L.**, Kotler M., Sanchez V., Reisin R., Uchitel O.
- 3rd Annual Canadian Neuroscience Meeting (Vancouver, British Columbia, Canadá, Mayo 24-27, 2009) “Amyotrophic Lateral Sclerosis auto-antibodies and absence of P/Q-type calcium channels” **González L.**, Kotler M., Sanchez V., Reisin R., Uchitel O.
- Ier Congreso IBRO/LARC de Neurociencias de América Latina, Caribe y Península Ibérica, XXIII Congreso de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (SAN) (Buzios, Río de Janeiro, Brasil, Septiembre 1º-4, 2008) “Searching for auto-antibodies in Amyotrophic Lateral Sclerosis” **Gonzalez L. E.**, Kotler M. L., Sanchez V. N., Reisin R. C., Uchitel O. D.
- X Taller Argentino de Neurociencias (Huerta Grande, Córdoba, Argentina, Abril 9-13, 2008) "Buscando auto-anticuerpos en la Esclerosis Lateral Amiotrófica" **González L.**, Kotler M., Sanchez V., Reisin R., Uchitel O.