



**POTENCIACIÓN SINÁPTICA MEDIADA POR
ANTICUERPOS DE PACIENTES CON
ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA**

Tesis Presentada para Optar al Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Autor: Mario Rafael Pagani

Director de tesis: Osvaldo Daniel Uchitel

Consejero de Estudios: Eduardo Arzt

**Laboratorios de Fisiología y Biología Molecular.
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular.
Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFYBINE)
CONICET.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.**

Buenos Aires, 2005

**POTENCIACIÓN SINÁPTICA MEDIADA POR
ANTICUERPOS DE PACIENTES CON
ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA**

Jurados:

Arturo Romano

Alberto Dubrovski

Adriana Losavio

Jurado Suplente:

Diana Jerusalinski

POTENCIACIÓN SINÁPTICA MEDIADA POR ANTICUERPOS DE PACIENTES CON ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una patología neurodegenerativa que afecta particularmente motoneuronas. Un número de evidencias sugiere que podrían estar involucrados mecanismos autoinmunes mediados por anticuerpos. Sin embargo, la importancia de estos anticuerpos (IgG-ELA) en la enfermedad y los mecanismos subyacentes es desconocida. Este trabajo muestra que las IgG-ELA, purificadas del 50 % de los pacientes con ELA esporádica, interaccionan con terminales presinápticos motores y modulan la transmisión sináptica espontánea y asincrónica. La inmunoreactividad contra terminales motores correlacionó con la capacidad de modular la transmisión sináptica. Un número de controles descartó la posibilidad que la modulación sináptica fuese mediada por efectos inespecíficos. Nuestros resultados nos permitieron postular que las IgG-ELA inducen la liberación de Ca^{2+} a través de receptores de IP3 y rianodina, lo cual promueve la potenciación sináptica. Esta movilización de Ca^{2+} fue activada a través de PLC y una señal de Ca^{2+} no-constitutiva a través del canal de calcio $Ca_{v2.2}$.

Además, la ausencia de inmunoreactividad de los anticuerpos provenientes de pacientes con “ELA hereditaria” señala la especificidad y relevancia de los anticuerpos del grupo de paciente con ELA esporádico. Así, la inmunoreactividad puede ser utilizada para distinguir dos grupos de pacientes que deben ser considerados como diferentes en futuros estudio y ensayos terapéuticos.

Palabras Claves: Esclerosis Lateral Amiotrófica, Unión neuromuscular, Potenciación sináptica, Vías de señalización, Canales de Calcio, PLC, RyR, IP3R.

SYNAPTIC POTENTIATION MEDIATED BY ANTIBODIES FROM PATIENTS WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that affects particularly motoneurons. Several pieces of evidence suggested the involvement of autoimmune mechanisms mediated by antibodies in ALS. However, the significance of those antibodies in the disease and the underlying mechanisms are unknown. Here we showed that IgG purified from a group of ALS patients specifically interact with the presynaptic membrane of motoneurons through an antigen-antibody reaction and modulated synaptic transmission. Immunoreactivity against nerve terminals showed strong correlation with synaptic modulation ability. In addition, several controls have ruled out the possibility for this synaptic modulation to be mediated through proteases or nonspecific effects. We postulate that this antigen-antibody interaction induces Ca^{2+} release from intracellular stores through the activation of IP3 and ryanodine receptors leading to a potentiation of spontaneous and asynchronous transmitter release. Said intracellular Ca^{2+} signals were activated through PLC and a non-constitutive Ca^{2+} influx mediated by $\text{Ca}_{v2.2}$ channel.

Consistent with the notion that ALS is heterogeneous disorder, our results reveal that in ~50 % of ALS patients, motor nerve terminal constitutes a target for autoimmune response. The lack of immunoreactivity of IgGs from familial ALS patients highlights the specificity and relevance of pathogenic IgGs in a group of sporadic ALS patients. Therefore, immunochemistry and electrophysiological assays can be instrumental to distinguishing two groups of ALS patients, which should be considered different in future studies and therapeutic approaches.

Key words: Amyotrophic Lateral Sclerosis, Nueromuscular Junctio, Synaptic Potentiation, Signaling pathways, Calcium channels, PLC, RyR, IP3R.

Agradecimientos:

Le agradezco a mis compañeros de laboratorio y amigos por compartir incontables horas de trabajo, discusión y alegría. No tengo dudas que estos años serán intensamente extrañados.

Dedicatorias

Con todo mi afecto, a mi hijita Bárbara.

INDICE

Pagina de Jurados	I
Título, Resumen y Palabras Claves en Castellano	II
Título, Resumen y Palabras Claves en Inglés	III
Agradecimientos	IV
Dedicatoria	V
INTRODUCCIÓN	1
PARTE I: Neuronas Motoras y el sistema motor	2
Corteza motora	2
Transmisión de las señales desde la corteza hasta los músculos	4
Tallo Encefálico en el Control de la Función Motora	4
Organización de circuitos motores en la medula espinal	5
Unidad Motora	5
Unión Neuromuscular	7
PARTE II: Transmisión Sináptica	10
El Potencial de Acción	12
Los canales de calcio dependientes de Voltaje	13
Las vesículas sinápticas y el Reciclado vesicular	17
Señalización mediada por Ca ²⁺	19
Mecanismos de entrada del ion Ca ²⁺	21
Mecanismos de liberación del ión Ca ²⁺ desde reservorios intracelulares	22
Organización espacial y temporal de las señales de Ca ²⁺	25
Mecanismos que modulan las señales de Ca ²⁺	27
Liberación del Neurotransmisor	29
PARTE III: La Esclerosis Lateral Amiotrófica	32
Generalidades de la Esclerosis Lateral Amiotrófica	32
Patología	35
ELA Esporádica o Clásica	35
Características Anatómico Patológicas del Sistema Motor	35
Motoneuronas Superiores en la Corteza Motora	35
Motoneuronas Superiores en el Tracto Corticoespinal	36
Motoneuronas Inferiores	36
Características Anatómico Patológicas de Regiones Extra-motoras	38
Características Patológicas de Tejidos No Neuronales	39
Patogénia	39
Evidencias Que Sugieren La Existencia De:	
Desorganización Del Citoesqueleto	40
Toxicidad Mediada Por Glutamato	42
Neurotoxicidad Mediada Por Microglia	43
Estrés Oxidativo	44
Disfunción Mitocondrial	46

Mecanismos Auto-inmunes	47
Efecto de los anticuerpos provenientes de pacientes con ELA sobre motoneuronas	48
Anticuerpos contra canales de calcio	48
Otros anticuerpos	51
Síndrome autoinmune similar a ELA	51
Efecto de la inmunosupresión	52
HIPÓTESIS DE TRABAJO	53
Objetivos del trabajo de tesis	55
MATERIALES Y MÉTODOS	57
Pacientes con ELA y pacientes control	57
Purificación de Anticuerpos	57
Animales y preparación neuromuscular	58
Electrofisiología	59
Análisis	61
Preparación del tejido e inmunohistoquímica	62
Microscopia y registro de imágenes	63
Reactivos	64
RESULTADOS	66
IgG-ELA induce potenciación de la transmisión sináptica espontánea de forma específica y reversible	66
Análisis de la capacidad de las IgG-ELA para modificar la transmisión sináptica espontánea	66
Evaluación de la dependencia de las IgG-ELA en la inducción de la potenciación sináptica en la transmisión espontánea	68
Análisis de parámetros electrofisiológicos de la actividad sináptica espontánea durante ps-IgG-ELA	72
IgG-ELA aumenta el contenido cuántos, la liberación asincrónica y la liberación retrasada de forma dependiente de la frecuencia de actividad sináptica	74
Efecto de las IgG-ELA sobre el contenido cuántico a frecuencias de estimulación fisiológica	75
Análisis de la capacidad moduladora de las IgG-ELA sobre la plasticidad sináptica de corto termino	77
Evaluación del efecto de las IgG-ELA sobre la liberación asincrónica y retrasada a 1, 20 y 40 Hz de estimulación	80
-Liberación asincrónica y retrasada a 1 Hz de estimulación	81

-Liberación asincrónica a 20 y 40 hz. de estimulación	82
-Liberación retrasada a 20 y 40 hz. de estimulación	85
Identificación de la inmunoreactividad de las IgG-ELA y localización de su antígeno	87
Diferenciación de la localización del blanco molecular para IgG-ELA entre las membranas pre o postsináptica	89
Análisis de la correlación entre la inmunoreactividad de las IgG-ELA y la capacidad moduladora sobre sinapsis neuromusculares	91
Evaluación de los Mecanismos que participan en la modulación sináptica mediada por las IgG-ELA	93
Evaluación de la Participación del complejo de Complemento en la ps-IgG-ELA	94
Estudio del requerimiento de calcio extracelular para la ps-IgG-ELA	95
Evaluación de la participación de vías de señalización intracelulares en la ps-IgG-ELA	99
Evidencias que sugieren que los anticuerpos que modulan la transmisión sináptica no son una consecuencia de la Patología	105
Mecanismo hipotético de la inducción de la potenciación sináptica mediada por anticuerpos	106
DISCUSIÓN	108
Potenciación sináptica mediada por IgG-ELA	108
Vías de señalización que regulan la potenciación sináptica mediada por IgG-ELA	115
Rol funcional Potencial de las IgG-ELA en pacientes con ELA	119
REFERENCIAS	123

INTRODUCCIÓN

El estudio de las patologías neurodegenerativas es tal vez una de las tareas prioritarias de las neurociencias. Una enfermedad neurodegenerativa que aflige a un individuo nos impulsa a la búsqueda de una pronta solución. Sin bien, el conocimiento necesario para implementar una terapia efectiva nunca llega pronto, ya hemos conseguido solución a problemas tan preocupantes como la rabia, la viruela o la poliomielitis.

En este trabajo de tesis se muestra un grupo de experimentos dirigidos a entender la importancia de los anticuerpos en un mecanismo que podría encontrarse involucrado en la Esclerosis Lateral Amiotrófica. Básicamente se hipotetiza que los anticuerpos de los enfermos podría afectar la transmisión sináptica de las motoneuronas y esto de alguna forma afectar al sistema motor.

Para una mejor comprensión y valoración de este trabajo de tesis será necesario introducir algunos aspectos básicos relacionados con el trabajo de investigación. En consecuencia este capítulo introductorio se dividirá en tres partes que trataran de las neuronas motoras y el sistema motor, la transmisión sináptica y la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

PARTE I:

Las Neuronas Motoras y el Sistema Motor

El sistema nervioso (SN), junto con el sistema endocrino, ejerce la mayor parte de las funciones de control del organismo. Para realizar estas funciones recoge información sensitiva de todo el organismo y transmite esta información a través de nervios a la medula y el encéfalo. Ambos responden inmediatamente o luego de una integración con una respuesta motora enviando señales a los músculos y órganos internos. En el hombre y animales superiores la corteza cerebral y el tallo encefálico en asociación a los ganglios basales y al cerebelo controlan los movimientos complejos. Prácticamente todos los movimientos voluntarios comprenden la actividad en la corteza y la subsiguiente actividad de los ganglios basales, cerebelo, tallo encefálico y medula. Estos dos últimos controlan la contracción muscular. Sin embargo, para algunos tipos de movimientos la corteza tiene una vía casi directa a las motoneuronas de la medula espinal, en especial para el control de los movimientos hábiles de manos y dedos.

Corteza Motora

La corteza motora ubicada por delante del surco central del cerebro, se divide en tres subáreas, cada una de las cuales tiene su propia representación topográfica de todos los músculos del cuerpo: a- corteza motora primaria, b- área premotora y c- área motora suplementaria.

La corteza motora primaria (CMP), localizada inmediatamente por delante del surco central (Área 4 de Brodman), muestra las diferentes representaciones topográficas de las diferentes áreas musculares. Este mapa se ha construido por estimulación eléctrica de la corteza motora. Más del 50 % de toda la CMP está relacionada con el control de los músculos de las manos y el habla. La estimulación de la CMP provoca la contracción de un músculo individual o parte de un músculo. Por otra parte, el área premotora (APM) (Área 6 de Brodman) contiene una representación topográfica similar a la CMP. La actividad localizada en la APM produce patrones de movimientos que requieren grupos de músculos. Esto se logra por medio de señales enviadas directamente a la CMP o a través de los ganglios basales y el tálamo.

El área motora suplementaria (AMS) muestra una representación topográfica diferente para el control motor. La estimulación requerida en esta área, para obtener contracción muscular, es de mayor intensidad que en la CMP o en el APM. Sin embargo, cuando se provocan contracciones, frecuentemente suelen ser bilaterales y no unilaterales como en respuesta a la estimulación en otras áreas motoras.

Transmisión de las señales desde la corteza hasta los músculos: Tracto corticoespinal

Las señales motoras son transmitidas de forma directa desde la corteza a la medula por el tracto corticoespinal (también llamado piramidal) y

en forma indirectas por varias vías accesorias. Estas últimas utilizan los ganglios basales, el cerebelo y los núcleos del tallo encefálico. Las vías directas son de gran utilidad para los movimientos de alta precisión de manos y dedos por ejemplo.

El tracto corticoespinal se origina en un 30 % de la corteza motora primaria, un 30 % de las áreas premotora y motora suplementaria, y un 40 % de las áreas sensitivas somáticas.

Las fibras mielínicas de mayor tamaño (16 μm) son las que permiten la mayor velocidad de conducción desde la corteza a la medula (70m/seg). Estas fibras provienen de las células piramidales gigantes (células de Betz) que sólo se encuentran en la corteza primaria. En cada tracto sólo un 3 % provienen de las células de Betz. Finalmente, los estímulos que partieron de la corteza alcanzarán las motoneuronas inferiores (MNI) con sus somas localizados en el tallo encefálico o la medula espinal. Estas MNI harán contacto con los músculos en sitios especializados denominados como unión neuromuscular (UNM).

Tallo Encefálico en el Control de la Función Motora

El tallo encefálico está compuesto por el bulbo, la protuberancia y el mesencéfalo. Al igual que la medula el tallo encefálico contiene núcleos motores y sensitivos que controlan regiones del rostro y la cabeza. Por otro lado también controlan funciones complejas como la respiración, el sistema cardiovascular, el sistema gastrointestinal, movimientos estereotipados del cuerpo, el equilibrio y el movimiento ocular.

Organización de circuitos motores en la medula espinal

La sustancia gris de la medula espinal es el área integradora para los reflejos medulares y otras funciones motoras. Las señales sensitivas ingresan a la medula por la raíz dorsal y generan dos ramas. Una rama termina en la sustancia gris y produce reflejos segmentarios locales y la otra rama envía información a niveles superiores tanto en la medula como en el tallo y la corteza. Los tipos celulares en la medula son básicamente 3: neuronas de relevo, interneuronas y motoneuronas.

Las motoneuronas muestran sus cuerpos localizados en la sustancia gris en el asta ventral, dando origen a las fibras que inervarán las fibras musculares. Estas motoneuronas pueden ser de tipo alfa (α) o de tipo gama (γ). Las alfa motoneuronas dan origen a fibras grandes (entre 10 a 20 μm de diámetro) que inervan las grandes fibras musculares esqueléticas. La estimulación de una fibra excita desde unas pocas a varios cientos de fibras musculares, iniciado la contracción muscular. Por otro lado, las motoneuronas gama de menor tamaño transmiten impulsos a fibras musculares especiales muy pequeñas, denominadas fibras intrafusales que constituyen el huso muscular.

Unidad Motora

Las motoneuronas que inervan músculos esqueléticos (las denominadas MNI) tienen sus cuerpos neuronales en la medula espinal y tallo encefálico, y envían axones hacia los músculos. Todas las fibras musculares inervadas por una única motoneurona se denominan

unidad motora. Todos los movimientos se realizan en términos de unidades motoras y no de fibras musculares únicas. El tamaño de la unidad motora, es decir el número de fibras musculares inervadas por motoneurona varía de 2 a cientos de fibras musculares. Al mismo tiempo el tamaño de las unidades motoras muestra una variación que posibilita controlar la fuerza de contracción. La intensidad o fuerza de contracción se regula por el número de unidades motoras que participan (*sumación de fibras*), y por la frecuencia de contracción (*sumación de frecuencia*). Cuando la frecuencia de contracción aumenta al punto que una se suma a la siguiente se genera una contracción suave y continua (*tetanización*), y luego a medida que aumenta la frecuencia, también lo hace la fuerza de contracción. La contracción prolongada e intensa produce fatiga muscular debido a la depleción de glucógeno en el músculo o depleción de vesículas sinápticas. Sin embargo, en la unión neuromuscular normal es raro observar fatiga por depleción de vesículas. La alta o baja actividad sináptica y consecuente contracción muscular promueven el aumento (*hipertrofia*) o disminución de la masa muscular (*atrofia*) respectivamente. Cuando un músculo pierde su inervación, ya no recibe las señales contráctiles necesarias para mantener un volumen muscular normal. En consecuencia la atrofia comienza de inmediato. Después de unos 2 meses también se comienzan a observar cambios degenerativos en el músculo. Si la inervación se restituye, suele ocurrir un retorno completo de la función muscular en 3 meses, pero desde ese momento en adelante la

capacidad de retorno funcional cada vez es menor y después de 1 a 2 años ya no retorna la funcionalidad.

Unión Neuromuscular

Los músculos esqueléticos están inervados por grandes fibras mielínicas que se originan en las motoneuronas del asta ventral de la medula espinal. Cada fibra nerviosa se ramifica e inerva muchas fibras musculares. En individuos adultos cada fibra muscular está inervada por una única motoneurona. En animales de laboratorio, inicialmente cada fibra muscular puede estar inervada por varias motoneuronas, pero luego de algunos días después del nacimiento la inervación pasa a ser única.

La unión neuromuscular (UNM) es una sinapsis química y como tal está constituida por un terminal presináptico y una membrana postsináptica. Pocas decenas de micrómetros antes que el nervio haga contacto con el músculo, los axones pierden la vaina de mielina, se ramifica y se generan los terminales que se ponen en estrecho contacto con la superficie de la fibra muscular a inervar (Couteaux, 1974). Los terminales sinápticos pueden tener un tamaño y forma que variará dependiendo del tipo de músculo y su actividad.

En la UNM, el terminal motor hace contacto con la fibra muscular en una porción especializada de la fibra muscular. Esta zona de la fibra muscular se encuentra elevada y al mismo tiempo describe una serie de invaginaciones aumentando la superficie donde puede actuar el neurotransmisor acetilcolina, ya que es ahí donde se localizan los

receptores colinérgicos postsinápticos.

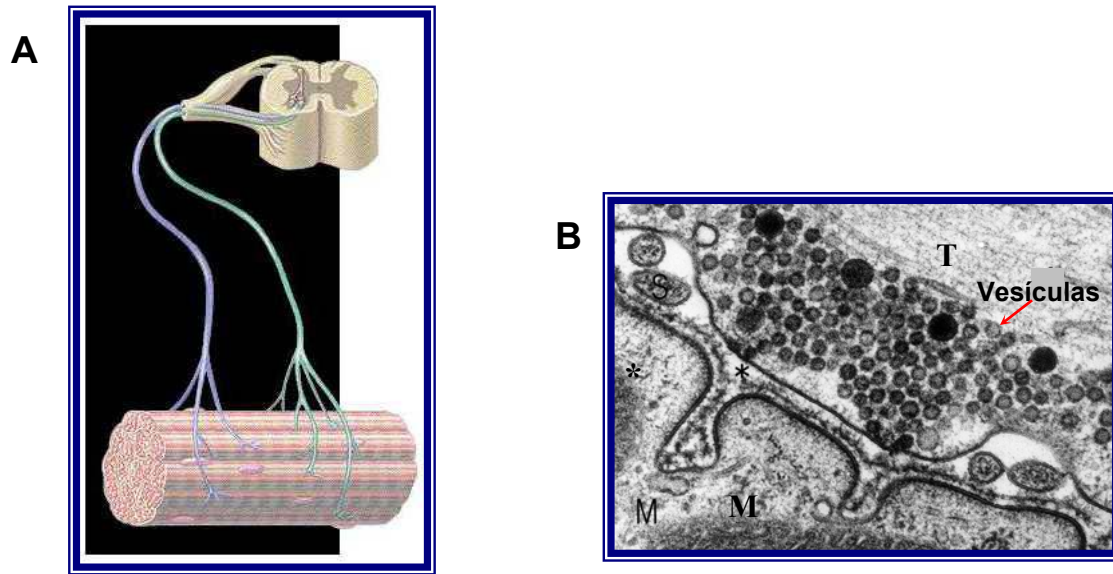


Fig. 1. Motoneuronas y UNM.

(A) Motoneurona con su cuerpo celular en el asta ventral de la medula espinal proyecta un nervio motor e inerva fibras varias musculares. (B) Ultra-estructura de la UNM. M: fibra muscular, *: brecha sináptica y T: terminal motor. Note: el gran número de vesículas sinápticas indicadas por una flecha.

En el citoplasma de los terminales sinápticos, se sintetiza la acetilcolina la cual es transportada rápidamente al interior de las numerosas vesículas sinápticas (en promedio 300.000 vesículas por terminal). A su vez, cada vesícula sináptica contiene entre 2000 y 10.000 moléculas de acetilcolina. La energía para la síntesis y transporte de la acetilcolina al interior de las vesículas sinápticas proviene del gran número de mitocondrias presentes en el terminal.

Toda la estructura sináptica está revestida por una o más células de Schwann que la aísla de los líquidos circundantes. En el espacio entre las membranas pre y postsináptica (de 20 a 30 μm) se encuentra la lámina basal que es una capa de fibras reticulares esponjosas a través

de las cuales difunde el líquido extracelular. Unidas a la matriz de la lamina basal se encuentran grandes cantidades de acetilcolinesterasa, la encima responsable de degradar la acetilcolina en el espacio sináptico. Esta degradación rápida posibilita mensajes químicos de corta duración. En el compartimiento neuronal se encuentran unas barras densas y a sus lados se encuentran partículas proteicas que se cree que serían canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) que permitirían la entrada del ión Ca^{2+} para la liberación de neurotransmisor.

PARTE II:

Transmisión Sináptica.

Con el término transmisión sináptica (TS) se hace referencia al intercambio de información entre células por medio de estructuras altamente especializada conocidas como sinapsis, como la UNM descrita en la sección anterior. Las sinapsis posibilitan la comunicación entre neuronas, o entre neuronas y células efectoras como células musculares o glandulares. Los términos “sinapsis” y “neuronas” fueron acuñados y desarrollado por el fisiólogo británico Sir Charles Scott Sherrington algunos años antes ser galardonado con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1932.

Las sinapsis están constituidas por un botón presináptico que envía información, un espacio o hendidura sináptica (entre las células) y una membrana postsináptica que recibe la señal de naturaleza química o eléctrica. La naturaleza de la señal que se emplee permite dividir a las sinapsis en dos grandes grupos, sinapsis químicas y sinapsis eléctricas. Las sinapsis eléctricas están constituidas por pares de hemicanales proteicos de células vecinas. Estos canales posibilitan el flujo de corrientes iónicas y metabolitos entre dos células vecinas. Si bien las sinapsis eléctricas recientemente han cobrado gran importancia debido a su gran selectividad y sus funciones de integración y coordinación, escapan al interés de este trabajo (Söhl et al., 2005).

Las sinapsis químicas son las que utilizan para la transferencia de información una sustancia química denominada neurotransmisor como la acetilcolina, noradrenalina y dopamina entre otras (Fig. 1). El tipo de señal química permite clasificarlas como sinapsis colinérgicas, noradrenérgicas o dopaminérgicas etc. Estas sinapsis químicas se encuentran distribuidas por todo el sistema nervioso y se las han estudiado extensamente. Sin embargo año tras año se reconocen nuevos y poderosos mecanismos regulatorios de la TS. La función básica de una sinapsis química es permitir la transformación de una señal eléctrica en una señal química y posibilitar la transferencia de información a una célula contigua. De esta forma el neurotransmisor liberado alcanza los receptores específicos en la membrana postsináptica. Esta transformación de la señal presináptica, liberación del neurotransmisor, recepción de la señal por los receptores postsinápticos constituye la transmisión sináptica.

Esquemáticamente la TS puede dividirse en los siguientes eventos: 1- La llegada de un potencial de acción al botón presináptico, 2- la despolarización de la membrana presináptica, 3- la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, 4- el ingreso del ión calcio, 5- la reorganización espacial de las proteínas de la maquinaria excitotóxica, 6- la fusión de la membrana de las vesículas sinápticas a la membrana de la célula con la consecuente liberación del neurotransmisor y 6- recepción del neurotransmisor por los receptores postsinápticos (Fig. 18). Los elementos que participan en esta sucesión de eventos son sitios blancos de regulación, y en conjunto hacen de la TS un proceso

extremada y exquisitamente regulado. Consecuentemente, a continuación se dará mayor detalle de la estructura y función de los componentes claves que participan en la TS.

El Potencial de Acción

El potencial de membrana es la diferencia de cargas acumuladas a cada lado de una membrana biológica. Así, todas las células poseen potencial de membrana. Sin embargo, las células nerviosas y musculares son excitables, es decir que son capaces de autoregenerar impulsos electroquímicos en sus membranas. El potencial de membrana en reposo estará determinado por la relación de concentraciones del ión K^+ entre el espacio intra y extracelular, y en menor grado por la difusión de Na^+ hacia el interior celular. En términos generales el potencial de membrana de las grandes fibras nerviosas así como el de las fibras musculares es de aproximadamente -90 mV, mientras que en las pequeñas células es menor, de aproximadamente entre -40 y -60 mV.

Este potencial de membrana es el que permite la transmisión de señales en células nerviosas, ya que estas son transmitidas por cambios rápidos en el potencial de membrana denominados potencial de acción. Cada potencial de acción se inicia como un cambio rápido ($0,1$ ms) del potencial de reposo a un potencial de membrana mas positivo (despolarización) y se finaliza con otro cambio casi tan rápido ($0,2 - 0,4$ ms) a su valor de reposo (repolarización). De esta forma, un potencial de acción que se inicia en el axón de una motoneurona, podrá alcanzar el terminal sináptico que inerva a una fibra muscular varios centímetros e

incluso hasta más de un metro en unos pocos milisegundos. El potencial de acción que llega al terminal sináptico es la señal de voltaje que activará a los CCDV que participan en la liberación de neurotransmisor.

Los canales de calcio dependientes de Voltaje

Los canales de calcio dependientes de voltaje son miembros de una superfamilia de genes que codifican para canales catiónicos dependientes de voltaje e incluye a los canales de Ca^{2+} , K^+ y Na^+ . Estos CCDV son complejos multimoleculares compuestos por cinco polipéptidos capaces de ser modificados postraducionalmente por el agregado de glúcidos, ácidos grasos y grupos fosfatos. Si bien recientemente se comenzó a conocer la importancia de estas modificaciones, éstas parecen ofrecer un nuevo y dinámico nivel de regulación sobre las funciones de los CCDV y los fenómenos Ca^{2+} dependientes como la transmisión sináptica (Catterall, 2000; Bhavé y Gereau, 2004).

Un CCDV tipo esta constituido por una subunidad principal (190 – 250 Kd) denominada α_1 que forma el poro del canal a través del cual los iones Ca^{2+} pueden ingresar a la célula por su gradiente electroquímico. Al mismo tiempo cada canal esta formado por tres subunidades regulatorias denominadas $\alpha_2\delta$, β y γ (Fig. 2). Se conocen 10 genes que codifican para subunidades α_1 y a su vez estos muestran variantes de maduración de RNA mensajeros. Estos 10 genes se han dividido por su

grado de homología polipeptídica en 3 familias de nominadas: Ca_{v1} , Ca_{v2} y Ca_{v3} . Dentro de cada familia se pueden encontrar varios miembros (Fig. 3).

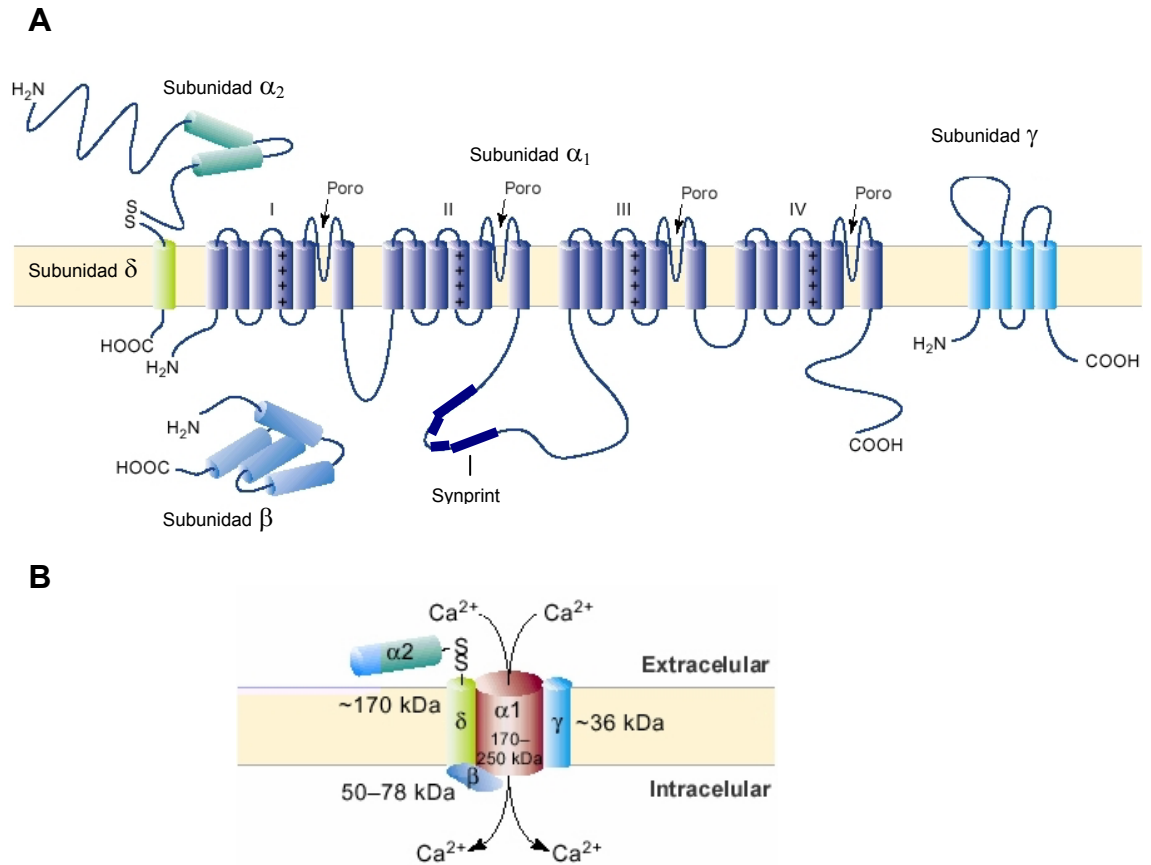


Fig. 2. Representación esquemática de la estructura de los CCDV.

(A) Topología de transmembrana propuesta para las subunidades que componen un canal. De izquierda a derecha se muestra la subunidad $\alpha_2\delta$ con el segmento α_2 extracelular. La subunidad α_1 formada por cuatro dominios transmembrana (I-IV), formados cada uno por 6 hélices alfa denominados como S 1-6. El segmento S4 contiene aminoácidos cargados positivamente (+++++) y funcionan como sensor de voltaje. En el lazo que conecta los dominios II y III se indica la región synprint que posibilita la interacción directa entre el canal y la maquinaria excitotónica. Entre S5 y S6 se localiza el segmento que formaría la pared del poro. La subunidad γ con cuatro regiones transmembrana y subunidad β citoplasmática interaccionan con la subunidad α_1 y modulan las propiedades biofísicas del canal. (B) Representación esquemática de la organización espacial que tomaría un canal en la membrana. **Tomado de Trends in Pharc Sci 2001.**

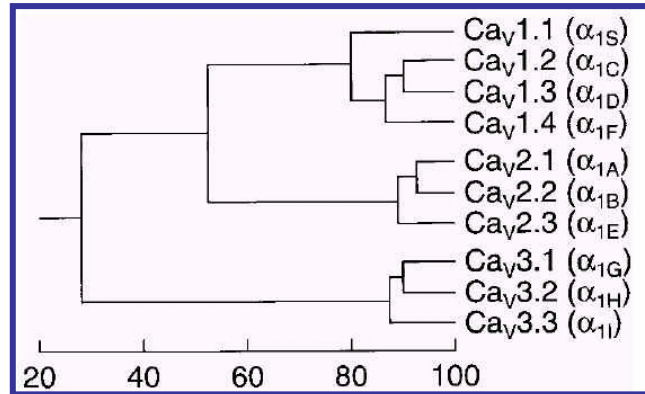


Fig. 3 Dendrograma mostrando la homología de secuencia aminoacídica para los CCDV.

El gráfico muestra la relación filogenética entre los diez genes deducido por de secuencia de aminoácidos en las subunidades α_1 . Los CCDV se dividieron en 3 familias Cav1, Cav2 y Cav3 con varios miembros en cada familia por medio del análisis de secuencia de un segmento de 350 aminoácidos. Se definieron tres familias con una identidad entre los miembros de cada familia superior a 80%. Por medio de la identificación de una secuencia consenso se definió una identidad entre las 3 familias del 52%. La escala muestra el porcentaje de homología usando el algoritmo de análisis CLUSTAL. Modificado de Ertel et al., (2000).

Los CCDV localizados estratégicamente muestran la capacidad de generar discretas y precisas señales de Ca^{2+} tanto en el tiempo (curso temporal) como en el espacio (dominios subcelulares). De forma características estos se encuentran acoplados físicamente con proteínas efectoras que responderán a la señal de Ca^{2+} . En el caso de la transmisión sináptica, las proteínas efectoras son las que componen la maquinaria excitotónica. Los canales de la familia 2, Ca_v2 , poseen una región especializada denominada “Synprint” que permiten la asociación física entre el canal y la maquinaria excitotónica. Esta interacción física posibilita un acoplamiento funcional de alta precisión entre la entrada de Ca^{2+} y la liberación de neurotransmisor. Si bien los canales de las familias 1 y 3, no poseen synprint pueden participar en la liberación de

neurotransmisor en condiciones que no requieren una alta regulación temporal.

Los CCDV se han clasificado también por sus propiedades biofísicas y farmacológicas en canales de tipo L, P/Q, N, R y T (McCleskey, 1994) (tabla 1). Para una revisión de la estructura, función y mecanismos de regulación de los CCDV ver Catterall (2000).

Los estudios farmacológicos han permitido distinguir estos canales por su sensibilidad a diferentes bloqueantes como las DHP y un grupo de toxinas. Los canales de las familias 1 y 2 son activables por estímulos de alto voltaje (potenciales de membrana cercanos a -10 mV). Los canales de la familia 3 son activados por estímulos despolarizantes de menor magnitud (-40 mV). Los canales de la familia 1 son altamente regulados por fosforilación y los canales de la familia 2 son altamente regulados por proteína G, mientras que la familia 3 muestra una pobre regulación por ambos mecanismos. Sin embargo estos mecanismos no son excluyentes (Catterall, 2000). Las subunidades α_1 definen las propiedades farmacológicas y en gran parte las propiedades biofísicas. Sin embargo las subunidades β , γ y $\alpha_2\delta$ modulan fuertemente sus propiedades biofísicas de activación, inactivación y recuperación de la inactivación (Walker y De Waard, 1998).

Tabla 1.

Nomenclatura, propiedades y perfil farmacológico de los CCDV neuronales.						
Ca _v	I _{Ca²⁺} Tipo	Subunidad α1	Voltaje dependencia	Bloqueantes específicos	Principal mecanismo regulatorio	Función Principal
1.2	L	1C	HVA	DHP	P	E-C y Regulación Génica
1.3	L	1D	HVA	DHP	P	Secreción Hormonal y Regulación Génica
1.4	L	1F	HVA	DHP		TS tónica
2.1	P/Q	1A	HVA	ω- IVA	G-Prot	TS, transcientes de Ca ²⁺ en dendritas
2.2	N	1B	HVA	ω- GVIA	G-Prot	TS, transcientes de Ca ²⁺ en dendritas
2.3	R	1E	HVA	SNX-482	G-Prot	TS, PA dependiente de Ca ²⁺
3.1	T	1G	LVA	-	P y G-Prot *	Repetición de ciclos
3.2	T	1H	LVA	-	P y G-Prot *	Repetición de ciclos
3.3	T	1I	LVA	-	P y G-Prot *	Repetición de ciclos

I_{Ca²⁺}: Tipo de corrientes de Ca²⁺; HVA: del ingles, High Voltage Activated; LVA: del ingles, Low Voltage Activated; DHP: Dihidropiridinas; ω-agatoxina IVA, ω-conotoxina GVIA y SNX-482: son toxinas polipeptídicas provenientes de invertebrados; P: fosforilación; G-Prot: proteína G; E-C: Acoplamiento entre la excitación y la contracción; TS: transmisión sináptica; PA: Potencial de Acción; *: Cav3.3 muestran una pobre regulación por medio de fosforilación y proteína G. **Modificado de Catterall 2000.**

Se han identificado cuatro genes para las subunidades regulatorias β (β₁-β₄), tres para las α₂-δ y cinco para las γ (Walker y De Waard, 1998); (Lory 2004). Al mismo tiempo estas subunidades regulatorias pueden asociarse a las distintas subunidades α₁, brindando una gran diversidad de canales con propiedades funcionales diferentes.

Las vesículas sinápticas y el Reciclado vesicular

El neurotransmisor que se liberará durante la TS está contenido en organelas esféricas membranosas de aproximadamente 50 nm de diámetro denominadas vesículas sinápticas. Durante la TS, la

membrana de estas vesículas se fusiona a la membrana plasmática del terminal nervioso en sitios especializados denominados sitios activos que se encuentran enfrentados a la membrana postsináptica. La fusión de membranas es iniciada por la entrada de Ca^{2+} a través de CCDV y mediada por la maquinaria de liberación. Esta maquinaria está constituida por un grupo de proteínas localizadas en la membrana de la vesícula sináptica (sinaptotagmina y sinaptobrevina) y en la membrana plasmática (SNAP-25 y syntaxina). La maquinaria de liberación posibilita que las vesículas se localicen en el sitio activo junto a CCDV. Así, cuando el ión Ca^{2+} ingresa a la célula el sensor de Ca^{2+} , sinaptotagmina, desencadena la fusión vesicular con lo que el neurotransmisor contenido en vesículas queda libre en el espacio sináptico y puede alcanzar los receptores postsinápticos (Agustine, 2001). Como consecuencia, el neurotransmisor será liberado siempre en cantidades discretas y más o menos fijas, es decir la cantidad de neurotransmisor contenido en una vesícula o múltiplos de esa cantidad. Así, la liberación del contenido de una vesícula equivale a la liberación de un cuánta (Katz y Miledi, 1979) .

Por otra parte, todas las vesículas presentes en un terminal no muestran la misma probabilidad de liberación. Esto es dado porque la distribución espacial de las vesículas se encuentra altamente regulada. Si bien existe controversia acerca de cómo es la organización exacta de los grupos de vesículas, existe consenso acerca de la presencia de al menos 3 grupos distintos de vesículas (De Camilli, 1996; Neher, 1998; Rizzoli y Betz, 2005). Estos 3 grupos de vesículas se diferencian por el

modo en el que pueden ser liberadas. Los 3 grupos son denominados como: 1- de vesículas inmediatamente liberables (VIL) 2- de vesículas de reciclado (VRec) y 3- de vesículas de reserva (VRes) (Rizzoli y Betz, 2005). Las VIL se supone que se encuentran listas para ser liberadas en los sitios activos, componen el 1 -2 % de todas las vesículas y son completamente liberadas en menos de 1 seg. Las Vrec componen entre el 10 al 20 % de todas las vesículas y serían liberadas en unos pocos segundos de estimulación, y finalmente las Vres componen entre el 80 al 90 % de las vesículas y serían liberadas en decenas de segundos a minutos. Sin embargo, en la UNM normal es raro observar depleción vesicular, y virtualmente se podrían liberar vesículas durante horas en una preparación ex vivo (Rizzoli y Betz, 2005). En la UNM de rana el número total de vesículas se estima en un valor aproximado de 500.000 vesículas (Rizzoli y Betz, 2005).

Señalización mediada por Ca²⁺

El ión Ca²⁺ es una señal intracelular extremadamente versátil que puede iniciar y regular un gran número de procesos celulares tan distintos como la excitabilidad, contracción, exocitosis, fecundación, apoptosis y expresión génica (Berridge et al., 2003).

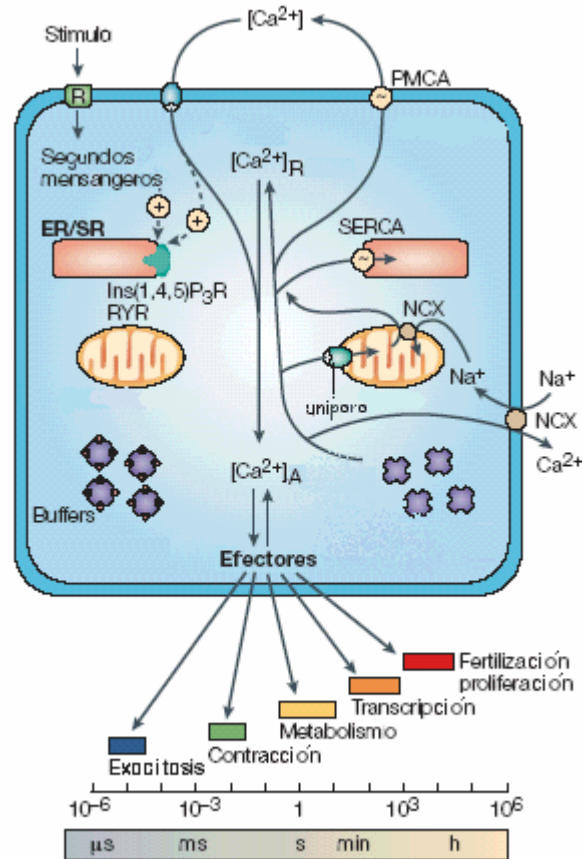


Fig. 4. Representación simplificada del sistema de señalización por Ca^{2+} y rango funcional. Las señales de Ca^{2+} se diferencian por su concentración, localización y curso temporal. **Tomado de Berridge et al., 2003, Nat. Review.**

Para lograr esta versatilidad el sistema de señalización por Ca^{2+} opera en una variedad de formas sobre un amplio rango dinámico (Fig. 4). Estas señales multidimensionales definidas por su intensidad, duración y localización subcelular pueden lograr un exquisito grado de regulación sobre los mecanismos efectores (Berridge et al., 2003).

Las señales de Ca^{2+} provienen de desde reservorios intracelulares de Ca^{2+} o desde el medio extracelular (Fig. 4). El influjo de Ca^{2+} está mediado por canales de la membrana plasmática que responden a estímulos como la despolarización, estiramiento, estímulos nocivos,

agonistas extracelulares, mensajeros intracelulares y depleción de reservorios intracelulares de Ca^{2+} .

✓ **Mecanismos de entrada del ion Ca^{2+}**

La principal fuente de Ca^{2+} es el espacio extracelular (Fig. 4). La entrada de Ca^{2+} a la célula está mediada por el gran gradiente electroquímico a través de la membrana. La entrada de Ca^{2+} a través de CCDV es el mecanismo más conocido y de esencial importancia en la actividad sináptica. Estas señales se caracterizan por su asociación de procesos celulares rápidos como la contracción y la exocitosis en terminales sinápticos. Sin embargo, existen otros canales que median la entrada de Ca^{2+} y operan en respuesta a diferentes señales extracelulares. Ejemplos de ellos son los canales que responden a ligando (conocidos como ROCs, del inglés receptor-operated channels) como los de NMDA¹, los que responden a segundos mensajeros (conocidos como SMOCs, del inglés second-messenger-operated channels) como los canales sensibles a nucleótidos cíclicos y ácido araquidónico (Mignen y Shuttleworth, 2000). Además existe un grupo de canales que se han comenzado a conocer más recientemente. Estos canales de la membrana plasmática pueden abrirse en respuesta al vaciamiento de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} , (conocidos como SOCs, del inglés store-operated channels) a la temperatura y al estiramiento. Muchos de estos canales pertenecen a la familiar de canales TRP ² (Clapham, 2001).

¹ NMDA: N-metil-D-aspartato

² TRP: Del inglés Transient Receptor Protein, son canales iónicos de baja conductancia.

✓ **Mecanismos de liberación del ión Ca^{2+} desde reservorios intracelulares**

La liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares depende del Ca^{2+} almacenado en el retículo endoplásmico (ER), y es controlada por el mismo ión Ca^{2+} , el inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3), ADP cíclico ribosa (cADPR), ácido nicotínico adenil dinucleótico fosfato (NAAPD) y la esfingosina-1-fosfato (S1P), que estimulan o modulan la liberación de este catión a través de receptores sensibles a IP3 (IP3R) o a cafeína y rianodina (RyR). Ambos tipos de receptores, IP3R y RyR, debido a su sensibilidad al Ca^{2+} median un mecanismo auto-regenerativo denominado liberación de Ca^{2+} mediada por Ca^{2+} (CICR) (Fig. 5). Estos receptores, son inactivos a concentraciones de 10-100 nM de Ca^{2+} y activos a concentraciones de 10 -100 μM de Ca^{2+} . La inactivación de los receptores depende tanto de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, como del tipo particular de receptor y un grupo de factores regulatorios (Fill, 2003). Este mecanismo de CICR posibilita a un rápido aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por un estímulo. La unión del IP3 a su receptor aumenta la sensibilidad del receptor al Ca^{2+} . Además estos receptores son regulados por un número de factores que operan tanto desde el lado citoplasmático como desde el lumen del ER.

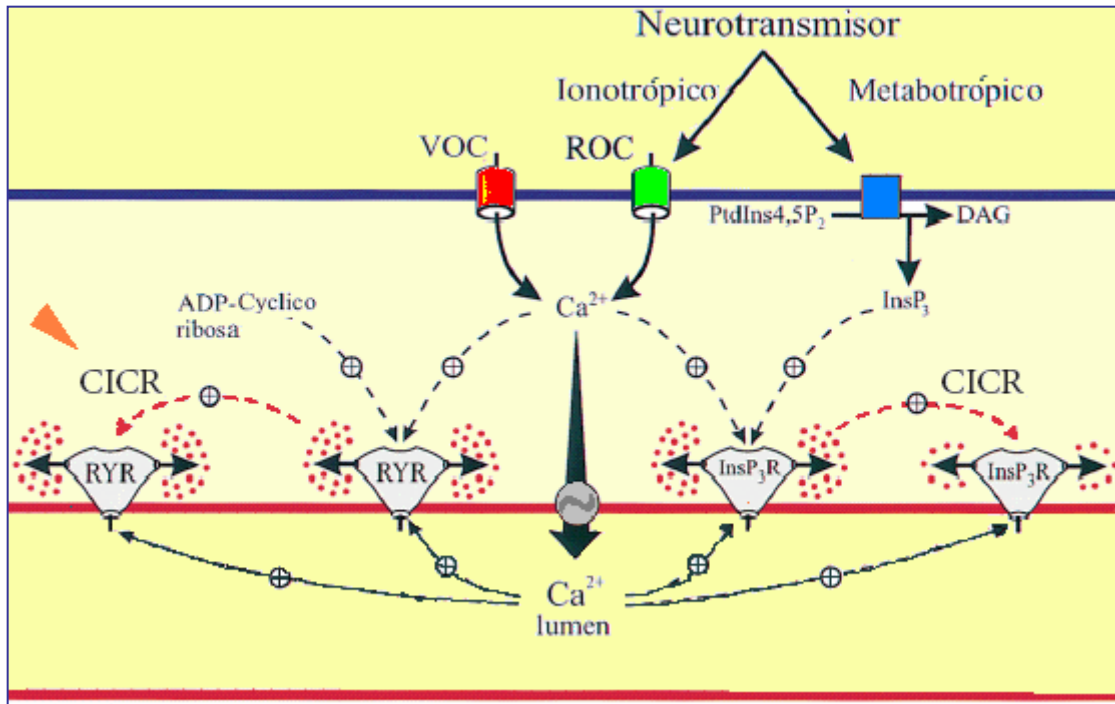


Fig. 5. Liberación de Ca²⁺ mediada por Ca²⁺.

El ingreso del ión Ca a la célula puede activar RYR y a través de esto se inicia la liberación de que a su vez puede estimular la activación de receptores vecinos. Por medio de este mecanismo se genera una señal desde los reservorios pudiendo regenerarse.

En el caso de los IP₃R, los factores activadores son la molécula de IP₃ y el Ca²⁺. La regulación por medio de la [Ca²⁺] puede estar dada de forma directa a través del ión Ca²⁺ o por medio de calmodulina (CaM) con un efecto activador o inhibidor. Además el Ca²⁺ puede sensibilizar a los IP₃R desde el lumen del ER por medio de la interacción física de proteínas que unen Ca²⁺ (calreticulina y la calnexina) con los IP₃R. Al mismo tiempo la regulación de RyR e IP₃R por quinasas y fosfatasas juega un papel decisivo (Marks, 1997). De esta forma la generación de IP₃ resulta una molécula clave para el control de la señalización por Ca²⁺. Una variedad de estímulos afecta la generación de IP₃ por medio

de la activación de la fosfodiesterasa, fosfolipasa C (PLC) (Berridge et al., 2003).

Al igual que los IP3R, los RYR están codificados por 3 genes (RYR 1-3), y son regulados desde el lado citoplasmático por $[Ca^{2+}]_i$, PKA, PKC y PKG y por la $[Ca^{2+}]$ luminal del ER. Al mismo tiempo los RYR son complejos multimoleculares constituidos por los receptores, las quinasas y fosfatasa que modulan al receptor, las proteínas que reclutan a quinasas y fosfatasa cerca del RYR y un CCDV que suele proporcionar el Ca^{2+} que activa estos receptores.

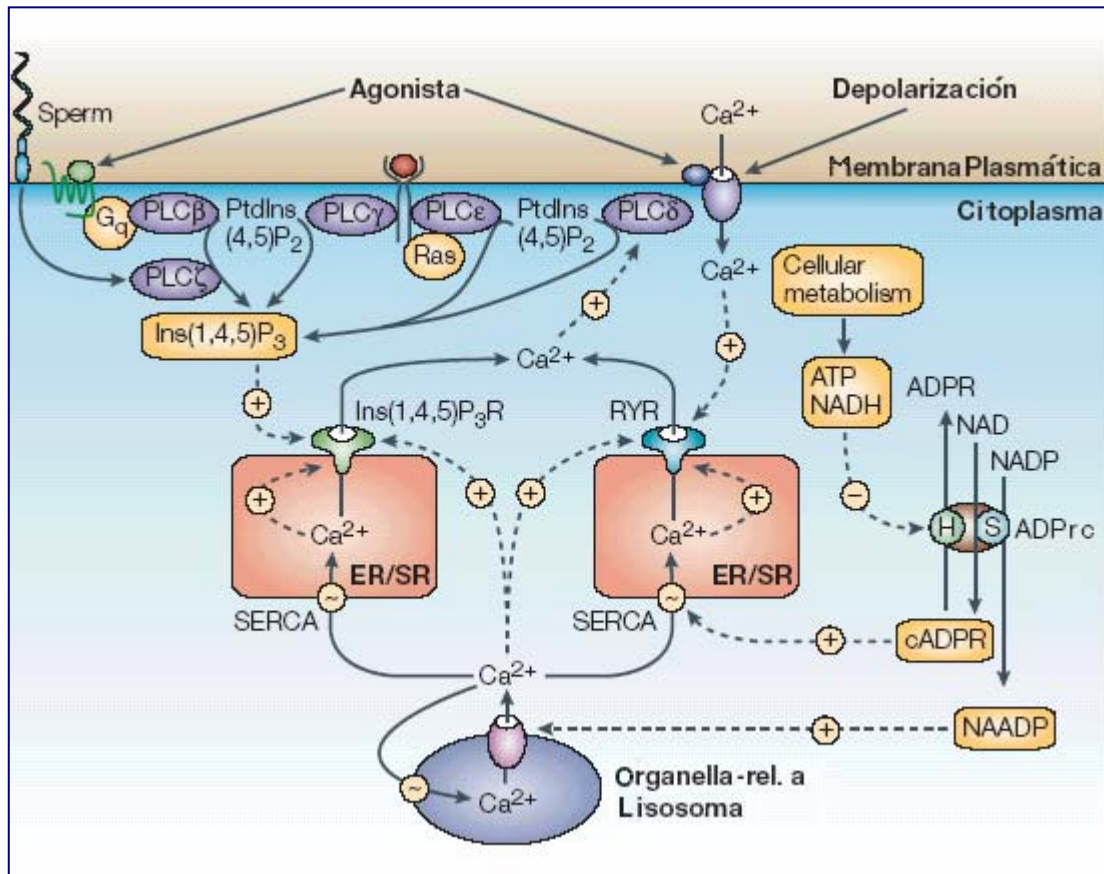


Fig. 6. Vías de señalización que intervienen en generación de IP3 y activación de RYR e IP3R. Diferentes estímulos pueden activar IP3R y RYR por medio de distintas isoformas de PLC o Ca^{2+} . El tipo particular de estímulo define la intensidad, localización y curso temporal de la señal intracelular de Ca^{2+} . **Tomado y modificado de Berridge et al., 2003, Nat. Review.**

✓ **Organización espacial y temporal de las señales de Ca²⁺**

Factores de importancia que contribuyen a la versatilidad de la señal de Ca²⁺ son la organización espacial y temporal de estas señales. En este sentido, una señal de Ca²⁺ será interpretada de forma muy distinta en el cuerpo neuronal o en un terminal sináptico e incluso en distintas espinas neuronales.

Las propiedades espaciales son de particular relevancia en las respuestas rápidas al Ca²⁺, donde los elementos activados por el ión y los mecanismos efectores posteriores se encuentran estrechamente asociados. Esta situación se ilustra al considerar algunas de nuestras propias investigaciones en la UNM. En los terminales motores se han detectado los CCDV Ca_{v2.1}, Ca_{v2.2} y el Ca_{v1.3} (Pagani et al., 2004). Estos CCDV se abren y permiten la entrada de Ca²⁺ como respuesta a la despolarización de membrana cuando llega un potencial de acción al terminal. Sin embargo, la liberación de Ach en la UNM, evocada por un potencial de acción, está mediada exclusivamente por el canal Ca_{v2.1} (Uchitel et al., 1992). Este canal, al igual que otros de la familia 2 de CCDV (Ca_{v2}), poseen una secuencia aminoacídica denominada “synprint” que permite que los CCDV se asocien físicamente a la maquinaria excitotónica. Esto ejemplifica que la entrada de Ca²⁺ al terminal sináptico por un canal no es suficiente para mediar la liberación del neurotransmisor, sino que es necesario un estrecho acoplamiento entre la señal de Ca²⁺ y los componentes efectores.

Por el otro lado, en las respuestas más lentas a las señales de Ca^{2+} , la estrecha continuidad física es menos aparente. En procesos tales como la regulación transcripcional y la proliferación celular suelen operar repetitivas señales de Ca^{2+} y ondas de Ca^{2+} . Sin embargo, una vez más, son canales específicos (tipo Cav1.2) los que se encuentran asociados a estos procesos (Catterall, 2000).

Al mismo tiempo las señales de Ca^{2+} transitorias, durante una estimulación prolongada, se transforman en oscilaciones de Ca^{2+} regulares, y pueden controlar procesos como la activación de ovocitos en la fertilización, migración de los conos de crecimiento, crecimiento axonal, migración neuronal, establecimiento del tipo de neurotransmisor de un terminal, desarrollo muscular y otros procesos en animales y plantas (Gomez, 1995; 2001; Komuro, 1996; Ehrhardt et al., 1996). En la decodificación de la frecuencia de las señales de Ca^{2+} las quinasas CaMKII y PKC juegan un papel decisivo (De Koninck 1998; Oancea et al., 1998).

Estas oscilaciones de Ca^{2+} dependen de IP3R o RYR localizados sobre el RE. La apertura de un grupo de receptores da lugar a un moderado aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ local ($\sim 50 - 600 \text{ nM}$) con una influencia espacial de (~ 2 a $6 \mu\text{m}$), la cual refleja la apertura de canales durante algo menos de un segundo (Niggli et al., 1999; Thomas et al., 2000). De esta forma el Ca^{2+} liberado por un grupo de receptores puede activar a un grupo de receptores vecinos iniciando oscilaciones de Ca^{2+} y en algunos casos puede pasar de una célula a una contigua (Yashiro y Duling, 2000).

✓ **Mecanismos que modulan las señales de Ca^{2+}**

Los mecanismos que acotan las señales de Ca^{2+} en el tiempo y en el espacio son de fundamental importancia para la modulación de la intensidad y la distribución espacial de las señales de Ca^{2+} y el mantenimiento de su homeostasis en la célula. Esta modulación de la señal está dada por los mecanismos de extracción del ión y un grupo de proteínas que unen Ca^{2+} . En el genoma humano se han reconocido 200 genes que codifican para estas proteínas, las cuales funcionan como efectoras o como tampones (Carafoli E. et al. Mol. Biol. 36, 107-260, 2001). Los tampones que se cargan con Ca^{2+} durante la generación de una señal modifican las propiedades espacio-temporales de la señal de Ca^{2+} . Ellos pueden alterar tanto la amplitud como el tiempo de recuperación de las señales transitorias. Estos tampones tienen diferentes propiedades y patrones de expresión. Algunos por ejemplo son tampones rápidos (calbindina D-28 y la calreticulina) mientras que otros (parvalbumina) muestran una cinética de unión mucho más lenta y una alta afinidad por el Ca^{2+} . Estos, como otros tampones móviles, incrementan el rango difusional de la señal (John, 2001). La constante que expresa la capacidad para unir Ca^{2+} (K_s) es utilizada para comparar la capacidad tampón de distintas células. Las neuronas motoras por ejemplo muestran un K_s de ~ 40 , mientras que las células de Purkinje poseen valores de ~ 2000 (Palecek et al., 1999). La baja

capacidad tampón de las motoneuronas les permite generar señales de Ca^{2+} rápidas. Sin embargo, esta propiedad las hace más susceptibles al estrés por el ión, lo cual puede contribuir a patologías de las motoneuronas (Palecek et al., 1999).

En conjunto tanto las proteínas efectoras como los tampones móviles y fijos son responsables de generar dominios de alta concentración de Ca^{2+} (~100 μM a 100 mM) en la boca de los CCDV (Simon y Llinas, 1985). Estos dominios de Ca^{2+} , de dimensiones nanométricas, posibilitan que la señal a través de un canal active los mecanismos excitotóxicos en un área restringida, en tanto que otros mecanismos sensibles al Ca^{2+} no se verán afectados. Debido a las dimensiones de estos dominios, se lo conocen como nanodominios (Chad y Eckert, 1984). Sin embargo, estos dominios pueden ser generados por un grupo de canales que a su vez podrán generar dominios de mayor tamaño y concentración, en donde se cree que el gradiente generado por difusión tendrá un papel esencial en la organización espacial de las proteínas que unen Ca^{2+} (Graef et al., 1999; Genazzani et al., 1999).

Otro importante grupo de moduladores de las señales de Ca^{2+} lo constituyen las bombas e intercambiadores que secuestran el ión del citoplasma. Estos tienen esencial importancia en el mantenimiento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ de reposo (~100 nM), y aseguran que los reservorios intracelulares se mantengan cargados. Existen cuatro mecanismos básicos responsables de la remoción del Ca^{2+} del citoplasma: 1- la Ca^{2+} - ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), 2- el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), 3- la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico o

endoplásmico (SERCA), 4: el UNIPORTER mitocondrial y 5- Ca^{2+} -ATPasa de vías secretorias (SPCAs) (Fig. 4). Estas moléculas son codificadas, al menos por 3 genes diferentes y muestran variantes de splicing. Estos cinco mecanismos muestran propiedades diferentes y complementarias. Las PMCA y SERCA poseen una baja tasa de transporte pero una alta afinidad, lo cual les confiere la propiedad de responder a modestas modificaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y así mantener los niveles de reposo. El NCX y el uniporter mitocondrial muestran una mayor tasa de transporte del ión y pueden actuar en un amplio rango de concentraciones.

Cabe notar que el Ca^{2+} es un potente activador de la actividad transcripcional directamente a través de factores de transcripción dependientes de Ca^{2+} (NFATc1-4, CREB, DREAM y CBP) o indirectamente a través de quinasas (CaMKII y IV) y fosfatasa (calcineurina) que afectan factores de transcripción. Al mismo tiempo la señalización mediada por Ca^{2+} modifica la tasa de expresión de los elementos que participan en la señalización por Ca^{2+} , tales como bombas, canales, efectores y tampones para el Ca^{2+} .

Liberación del Neurotransmisor en Terminales Motores

En condiciones normales la liberación de neurotransmisor puede darse de diversas formas. Normalmente cuando un terminal nervioso no está activo muestra una liberación basal de neurotransmisor. Esta liberación se da de forma espontánea sin necesidad de un estímulo, y

debido a esto se la conoce como liberación espontánea. La liberación espontánea consiste en la liberación del neurotransmisor contenido en una vesícula única (un cuanto), lo que genera una respuesta postsináptica miniatura (Fatt y Katz, 1952). En la UNM estas respuestas son los denominados potenciales de placa miniatura (MEPPs), que pueden observarse en una tasa de unos pocos a varias decenas por minuto. Si bien la liberación espontánea no requiere de un estímulo, la liberación de MEPPs es dependiente de Ca^{2+} extracelular, intracelular y además existe un componente que es independiente de Ca^{2+} (Katz et al. 1996; Losavio y Muchnick, 1997).

Por otra parte la liberación de neurotransmisor por la llegada de un potencial de acción al terminal motor produce la liberación de un grupo de cuantos simultáneamente que dará una respuesta postsináptica denominada potenciales de placa (EPPs). La amplitud de éste EPPs dependerá de la cantidad de cuantos liberados, y la liberación de éstos dependerá de la probabilidad de liberación. Si esta despolarización alcanza el umbral de activación de los canales de sodio de la fibra muscular, se iniciará una despolarización a lo largo de la fibra muscular y la consecuente contracción del músculo. En condiciones experimentales la probabilidad de liberación suele reducirse disminuyendo la $[\text{Ca}]^{2+}$ y aumentando la $[\text{Mg}]^{2+}$, a fin de evitar la contracción muscular y obtener EPPs de una amplitud menor a 10 mV. Este valor de amplitud es requisito para que la sumación de cuantos sea lineal y la amplitud del EPP refleje el número de cuantos liberados por el terminal motor. La iniciación del potencial de acción que

alcanzará el terminal motor se realiza por medio de la estimulación eléctrica en el nervio moto. En la UNM la liberación de neurotransmisor que genera EPPs depende de la entrada de Ca^{2+} a través del CCDV de tipo P/Q (Uchitel et al., 1992). Tanto los MEPPs como los EPPs pueden observarse localmente en la UNM en la fibra muscular.

Por otra parte durante un tren de estímulos a alta frecuencia, se observa entre los consecutivos EPPs un número de potenciales miniatura (liberación asincrónica), como consecuencia de fusión de vesículas sinápticas algunos milisegundo después de la liberación que generó los EPPs (Fig. 10) (Otsu et al., 2004).

PARTE III:

La Esclerosis Lateral Amiotrófica

Generalidades de la Esclerosis Lateral Amiotrófica

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una patología neurodegenerativa que se manifiesta en el 99 % de los casos en adultos y en un 1 % en adolescentes. De forma característica los enfermos de ELA sufren pérdida de neuronas motoras sin afectar otros tipos neuronales, ni funciones cognitivas. La muerte de neuronas motoras tiene lugar por medio de apoptosis o necrosis.

En el censo del año 2002 sobre la población estadounidense se estimó una incidencia de 5.600 nuevos casos al año y una prevalencia de 5 enfermos por cada 100.000 personas. Normalmente la patología lleva al fallecimiento del enfermo dentro de 1 a 5 años después del diagnóstico. De forma característica con la muerte de motoneuronas se observa una progresiva atrofia muscular que conduce a debilidad muscular e incapacidad para realizar funciones motoras como locomoción, masticación, deglución, respiración etc. La muerte de las motoneuronas que controlan la actividad de los músculos respiratorios suele ser el evento fatal (Cleveland and Rothstein, 2001; Strong, 2003).

Si bien ésta patología fue descrita en 1869 por Jean-Martin Charcot, y desde entonces se han realizado numerosas investigaciones acompañadas por un enorme avance tecnológico y del conocimiento

científico en general, hasta la fecha no se conoce ningún tratamiento efectivo.

Por otro lado, se conocen varias formas de ELA, las que podemos dividir en dos grandes grupos, la ELA hereditaria denominada como familiar (ELAf) y la forma idiopática normalmente llamada ELA esporádica (ELA). La ELAf representa un 10 % de todos los casos, mientras que la ELA representa el 90 % restante de los casos (Tabla 2). Dentro de la población de ELAf, un ~20 % de estos pacientes (2 % de la población general ELA), posee una mutación en el gen de la superóxido dismutasa 1 (SOD1), y hasta la fecha se han reportado 99 mutaciones distintas en el gen SOD1 en pacientes con ELAf (Strong, 2003). El ~80 % de los casos restante de ELAf se asocian a una serie de genes potenciales (Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001).

En los enfermos ELA no se conoce ningún factor de riesgo asociado que pueda explicar el origen o el desarrollo de la patología, si bien factores de riesgo como la exposición al plomo o a ciertos ambientes y consumo de ciertas drogas podría modular algunos aspectos de la patología (Kamel et al., 1999; Armon, 2001; Kamel et al., 2002; Li and Sung, 2003).

Existen algunas hipótesis acerca de los mecanismos involucrados en la muerte selectiva de las neuronas motoras en ELA (Tabla 3). Sin embargo, para la ELA esporádica no existe suficiente evidencia para apoyar o refutar de forma definitiva ninguna de las hipótesis.

Tabla 2. Características generales de las distintas formas de Esclerosis Lateral Amiotrófica.

Patología	Herencia	Ligamiento	Gen/Proteína involucradas	Grupo Etario	Características
ELA Esporádica	Ausente	Ausente	CCVD, NF	Adultos	Incluye > 90 % de los casos
ELA Familiar					
ELAd	Dominante	21q22.1	SOD-1	Adultos	Mas de 90 mutaciones reportadas
ELA con demencia frontotemporal	Dominante	9q21-22	1	Adultos	Demencia
ELA con Demencia/Parkinson	Dominante	17q21	TAU	Adultos	Demencia y movimientos parkinsonianos.
ELAx	Ligada al X	Xp11-Xq12	2	Adultos	¿Hombres?
Juvenil tipo 1	Recesiva	15q15-22	3	Adolescentes	Progresión lenta
Juvenil tipo 3	Recesiva	2q33	4	Adolescentes	Progresión lenta
Juvenil	Dominante	9q34	5	Antes de los 25 años	Progresión lenta

Tomado y modificado de: Cleveland DW y Rothstein JD Nat. Rev. Neurosci. 2001. Los números indican referencias en la bibliografía. CCDV: Canales de calcio dependientes de voltaje, NF: Neurofilamentos, ELAd: ELA dominante, ELAx: ELA ligada al sexo, TAU: proteína tau asociada a microtubulos. Nota: En la ELA esporádica se considera a los CCDV como proteínas involucradas debido a evidencias que sugieren la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra éstas.

Tabla 3. Evidencia a favor de los mecanismos involucrados en ELA y observaciones.

Hipótesis	Evidencias	Observaciones
Daños oxidativos	Mutación en SOD1 y daños oxidativos en medula y corteza.	Diversos mecanismos pueden conducir a daños oxidativos.
Homeostasis alterada de neurofilamentos.	Acumulación de neurofilamentos en axones de motoneuronas en pacientes con ELA.	La acumulación de neurofilamentos también se observa en otras patologías motoras.
Excitotoxicidad por Glutamato	Niveles de glutamato aumentados en plasma y LCR	Drogas que disminuyen la liberación de Glutamato no mejoran al paciente.
Mecanismos autoinmunes	Infiltrado de linfocitos en medula y Anticuerpos anticanales de calcio, anti- FAS, anti -GM1 etc.	Otros investigadores no confirman todos los resultados, y los inmunodepresores no mejoran al paciente.

LCR: Liquido cefalorraquídeo.

Patología

✓ **ELA Esporádica o Clásica**

El cuadro clínico que denota afección en MNI y MNS es predominante en la ELA, y refleja los cambios de degeneración en el sistema motor. Las características histopatológicas más evidentes, y que al mismo tiempo correlaciona con las manifestaciones clínicas son dos. 1- La reducción en el número y tamaño de las MNI en el asta ventral de la medula espinal y los núcleos bulbares, y 2- La deposición de mielina en los tractos corticoespinales.

Las alteraciones en las MNS (células de Betz) son mucho más variables. En el estudio de estas alteraciones, utilizando tinciones clásicas, histoquímica e inmunohistoquímica, se ha descrito un gran número de características histopatológicas.

✓ **Características Anatómico Patológicas del Sistema Motor.**

▪ **Motoneuronas Superiores en la Corteza Motora**

El grado en que pueden ser demostrados los cambios patológicos en tejidos de pacientes en la corteza motora es altamente variable, incluso en casos típicos con signos de MNS. En los casos más severamente afectados se observa una clara ausencia de las células gigantes de Betz en la capa cortical 5 acompañada de gliosis reactiva. Esta gliosis es identificable por inmunohistoquímica como astrocitos positivos para

proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) y como una difusa microgliosis positiva para dos marcadores de astrositos activados (CD68 y HLA-DR) (Brownell et al., 1970). No obstante en algunos casos típicos de ELA, con una evolución de varios años se ha encontrado una morfología normal de la corteza motora.

- **Motoneuronas Superiores en el Tracto Corticoespinal**

La mayoría de los casos de ELA, cuando se examinan secciones histológicas, muestran mielina pálida en los tractos corticoespinales en algún nivel de la vía. Sin embargo, existe una predominancia de casos en los que no se observa esta mielina pálida en niveles superiores a la medula, incluyendo los casos con alteraciones en la corteza motora (Brownell et al., 1970). Esto ha llevado a la hipótesis que las alteraciones en MNS surgirían predominantemente debido a una patología axonal con muerte retrograda periférica (Brownell et al., 1970). Más recientemente otras evidencias apoyan esta hipótesis (Fischer, 2004; Shefner, 1999).

- **Motoneuronas Inferiores**

Se considera que el recuento de motoneuronas afectadas, por medio de técnicas histológicas simples, suele subestimar el número de motoneuronas afectadas. Esto es debido a que en los recuentos neuronales se detectan como células vivas un grupo de pequeñas motoneuronas (Tomlinson et al., 1973). Recientemente, se ha detectado

que estas pequeñas neuronas muestran características bioquímicas de células apoptóticas (Martin, 1999, 2001). Al mismo tiempo, el estudio de una o unas pocas secciones de medula espinal muestran un valor escaso debido a la gran variación en el número de somas neuronales que pueden observarse de una sección a la siguiente (Tomlinson et al., 1973). Sin embargo, los estudios histológicos a cerca de la pérdida de motoneuronas pueden dar respuesta a los mecanismos que median la propagación dinámica de degeneración neuronal. En este sentido, en ELA se ha observado que las motoneuronas afectadas muestran un continuo desde células típicamente apoptóticas a típicamente necróticas (Troost et al., 1995; Martin, 2001), en donde el tipo de muerte neuronal puede estar regulado por la intensidad del estímulo que promueve la muerte celular (Martin et al., 1998; Martin, 2001). Independientemente del tipo de muerte celular, el recuento de pérdida de MNI muestra valores tan elevados como del 50 % o superiores (Ekbom, 1992; Ince et al., 1995; Cwik et al., 1998; Arasaki et al., 2002).

Si bien todas las MNI parecen igualmente susceptibles, existen algunas motoneuronas considerablemente menos susceptibles. Estas MN son las del núcleo sacro de Onufrowitz (también llamados Onuf), que inervan músculos del piso pélvico y esfínteres, lo cual explica la capacidad de los pacientes para retener orina y heces (Iwata and Hirano, 1978). Un segundo grupo de MN que típicamente no se ven afectadas son las del tercero, cuarto y sexto para craneal que inervan los músculos que controlan los movimientos oculares (Alexianu et al., 1994). La ausencia de vulnerabilidad de estas MNs podría deberse a

una combinación de características fisiológicas y propiedades biológicas como las siguientes: La expresión de tampón citoplasmáticos de Ca^{2+} , la asimétrica arquitectura celular, la ausencia de innervación corticoespinal directa monosináptica, diferencias en la transmisión glutamatérgica y el metabolismo del oxido nítrico (Ince et al., 1993; Morrison et al., 1998; Shaw et al., 1999; Shaw and Eggett, 2000).

✓ ***Características Anatómico Patológicas de Regiones Extra-motoras***

Alteraciones en el SNC en regiones extra-motoras parece ser una característica constante en una pequeña proporción de pacientes con ELA. Existe un número de casos en los que se asocian características típicas de degeneración en ELA con alteraciones en vías sensoriales, en tractos espinocerebral ascendentes y degeneración en sustancia nigra (llamado como Parkinsonismo sub-clínico). Una característica más ampliamente distribuida entre los pacientes y aceptada es que un 5 % de los pacientes desarrollan un síndrome de demencia frontotemporal inmediatamente antes o después de la aparición de signos motores (Mitsuyama, 1993, 2000). Además, se considera que la atrofia del lóbulo frontotemporal es prominente (Morris et al., 2001). La característica más consistente es la degeneración espongiiforme de las capas corticales 2 y 3 (Noda et al., 1999). Tanto el tipo como el patrón de degeneración y las propiedades de las inclusiones observadas no son específicos de ELA. Sin embargo, algunos estudios sugieren que la degeneración que subyace la demencia frontotemporal es el resultado de la extensión de

procesos de degeneración como parte del espectro observado en ELA, y no un fenómeno discreto superpuesto a la degeneración típica de ELA (Wilson et al., 2001).

✓ ***Características Patológicas de Tejidos No Neuronales***

En pacientes con ELA se conocen alteraciones patológicas que afectan órganos fuera del sistema nervioso. Particularmente evidentes y constantes son las alteraciones en el colágeno de la piel. Entre ellas se han reportado alteraciones en los enlaces cruzados en las fibras de colágena, en la proporción de fibras inmaduras y ausencias de la organización típica, asociadas a una mayor tasa de degeneración de la elastina (Ono, 2000).

Patogenia

Si bien no se conoce cual es el mecanismo (o un grupo de mecanismos) responsable de la degeneración neuronal en los pacientes con ELA, existe un grupo de mecanismos hipotéticos que podrían tener una mayor o menor importancia en la patogenia de la ELA. Algunos estudios han enfatizado la importancia de un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Engelhardt et al., 1995; Siklos et al., 1996; Pullen et al., 2004), la excitotoxicidad mediada por glutamato (Rothstein, 1996; Cleveland and Rothstein, 2001), o la generación de radicales libres (Bowling and Beal, 1995; Liu, 1996). Sin embargo, todos estos mecanismos pueden

participar como un elemento en una cascada de eventos que conduce a la muerte de las motoneuronas. De hecho un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ puede exaltar la producción de radicales libres y liberación de glutamato, el cual a su vez puede incrementar la $[Ca^{2+}]_i$ (Beal, 1998; Orth and Schapira, 2001). Al mismo tiempo cabe destacar que todas las observaciones realizadas dan evidencia que un mecanismo en particular podría estar involucrado, pero desafortunadamente no es posible distinguir si éste es causa (mecanismo patogénico) o consecuencia de la enfermedad (epifenómeno). En consecuencia una tarea clave es identificar que mecanismos inician la cascada de eventos que conducen a la ELA, ya que no existe suficiente evidencia a favor de ninguno de los mecanismos que se presentaran a continuación, e inevitablemente permanecemos alejados de comprender como y porque mueren las motoneuronas en la ELA.

✓ ***Evidencias Que Sugieren La Existencia De Desorganización Del Citoesqueleto***

Una de las características típicas en la ELA es la pérdida de MN acompañada de cúmulos de neurofilamentos altamente fosforilados, esferoides axonales, inclusiones inmunoreactivas (ir) para ubiquitina y fragmentación del aparato de golgi (Carpenter, 1968; Hirano et al., 1984; Leigh and Swash, 1991; Leigh et al., 1991; Gonatas et al., 1992). La base molecular de la vulnerabilidad selectiva puede ser debida a un grupo de variables, entre ellas la desmesurada asimetría celular. Esto es, un cuerpo celular de 50 μm y un axón que puede alcanzar 1 metro

de longitud ($1 \times 10^6 \mu\text{m}$). De esta forma los neurofilamentos (NF), pueden jugar un papel de importancia en la vulnerabilidad ya que es la proteína estructural más abundante en estas enormes células. La idea que la acumulación aberrante de NF podía jugar un papel en el progreso de la enfermedad surge de la observación que la acumulación de NF es un marcador de distintas patologías neurodegenerativa, ELA, atrofia muscular espinal infantil y neuropatía sensorio-motora hereditaria (Hirano et al., 1984; Leigh and Swash, 1991; Xu et al., 1993). Sin embargo, una pregunta clave es si las alteraciones en la organización de neurofilamentos pueden llevar a agregación y consecuente muerte celular. Para responder esta pregunta se han generado distintos ratones mutantes para las distintas subunidades que componen los NF. Así se logró obtener mutantes para NF tipo L con selectiva muerte de motoneuronas y características típicas de los pacientes con ELA (Lee et al., 1994). Sin embargo, estas mutaciones no se pudieron hallar de forma diferencial en pacientes ELA (Figlewicz et al., 1994; Al-Chalabi et al., 1999). De esta forma, se cree que las variaciones en la secuencia de NF no son capaces de provocar un fenotipo patológico por si solas, sino que pueden tener un rol de importancia cuando se encuentran asociadas con factores ambientales o fisiológicos (Strong, 2003).

✓ **Evidencias Que Sugieren La Existencia De Toxicidad Mediada Por Glutamato**

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante del SNC, y su propiedad neurotóxica es conocida desde la década del 50 (Lucas and Newhouse, 1957). A causa de la propiedad excitatoria y neurotóxica del glutamato, la toxicidad mediada por glutamato se la denominada excitotoxicidad. El aumento de glutamato extracelular puede inducir excitotoxicidad por medio de dos mecanismos durante la despolarización de la membrana, (a) un aumento en la entrada de Na⁺, Cl⁻ con la consecuente entrada de agua y lisis osmótica y / o (b) un aumento en la entrada de Ca²⁺ con una subsiguiente disfunción mitocondrial y / o activación de enzimas dependientes de Ca²⁺ como fosfolipasa A2, xantino oxidasa, óxido nítrico sintetasa (Robberecht y Vianney de Jong, 2000⁶). Estas alteraciones a su vez pueden aumegntar la generación de oxido nítrico, peroxinitritos, radicales oxidrilo y el anión superóxido los cuales causarán daños en el DNA, peroxidación de lípidos y disfunción mitocondrial (Meldrum and Garthwaite, 1990).

La primera evidencia que sugirió excitotoxicidad fue la detección de un incremento en los niveles de glutamato y aspartato en plasma y LCR de pacientes con ELA (Plaitakis and Caroscio, 1987; Rothstein et al., 1990). Si bien estos resultados no han sido consistentemente reproducidos por distintos laboratorios (Spink and Martin, 1991), otros grupos de trabajo han detectado un aumento en los niveles de glutamato en una población (49 %) de pacientes con ELA (Shaw et al., 1995). Este aumento en la concentración de glutamato no es

consecuencia de la degeneración de células que lo contienen, ya que no se detecta alta concentración de otros aminoácidos presentes en las células motoras. Sin embargo, cabe mencionar que tanto el glutamato como el aspartato es eliminado del espacio extracelular por los mismos transportadores (Arriza et al., 1994). Adicionalmente la captación de ácido glutámico está reducida en preparaciones de vesículas de médula espinal y corteza motora de pacientes (Rothstein et al., 1992). Debido a estas evidencias se invirtieron esfuerzos en la detección de alteraciones en los transportadores de glutamato. Si bien se detectaron alteraciones del transportador ETTA2 (Rothstein et al., 1995; Lin et al., 1998) estos resultados no han sido consistentemente reproducidos por distintos laboratorios (Meyer et al., 1995; Meyer et al., 1998; Jackson et al., 1999).

✓ ***Evidencias Que Sugieren La Existencia De Neurotoxicidad Mediada Por Microglía***

La proliferación y activación de microglía es una prominente característica en pacientes y varios ratones transgénicos SOD1 (Lampson and Siegel, 1988; Lampson et al., 1990; Kawamata et al., 1992; Troost et al., 1993; Barbeito et al., 2004). En particular se ha observado la presencia de microglía fagocítica asociada a los tractos en degeneración y microglía activada en asta ventral asociada a las motoneuronas afectadas. Esta asociación con motoneuronas puede explicarse debido a que las neuronas dañadas muestran la capacidad de activar la microglía (Barron et al., 1990; Streit, 1993). Las células

microgliales adyacentes a motoneuronas que han sufrido axotomía aumentan la expresión del receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Raivich et al., 1991), el cual promueve la proliferación y diferenciación de la microglía (Fischer et al., 1993). Luego de la axotomía, la inhibición de los receptores de GM-CSF inhibe la activación y proliferación de microglía, lo que promueve una mayor tasa de regeneración axonal (Thanos, 1991; Thanos et al., 1993). Además, existe un gran número de evidencias consistentes y reproducibles tanto in vitro como in vivo (e incluso en distintos modelos animales) mostrando que la microglía determina y modula la recuperación y muerte neuronal (Ghezzi et al., 1998; Hall et al., 1998; Alexianu et al., 2001; Boillee et al., 2001; Elliott, 2001). Adicionalmente, induciendo muerte neuronal mediada por estrés oxidativo, se ha detectado un papel regulatorio similar por parte de la microglía (He et al., 2002). Si bien, recientemente se ha comenzado a entender la relación entre neuronas y microglía, y es posible que una vez iniciado el daño celular la microglía sea un factor determinante de la muerte neuronal, ésta interacción celular posee un importante rol en la propagación de la degeneración neuronal en ELA (Barbeito et al., 2004).

✓ ***Evidencias Que Sugieren La Existencia De Estrés Oxidativo***

En muchas reacciones de oxidación del metabolismo celular se generan especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales pueden inducir daños celulares irreparables a través de oxidación y peroxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. En consecuencia células y tejidos mantienen

niveles tolerables de ROS por medio de enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, las cuales metabolizan las ROS en moléculas menos nocivas. Además, moléculas como la vitamina E y C contribuyen con el mantenimiento de niveles tolerables de ROS. Cuando la generación de ROS supera la tasa de remoción se produce estrés oxidativo (Robberecht y Vianney de Jong, 2000). Estos procesos pueden actuar durante el envejecimiento, isquemia y neurodegeneración.

Si bien la mayor fuente intracelular de ROS son las mitocondrias, existen otras fuentes intracelulares (Cleveland and Rothstein, 2001). Adicionalmente, la microglía puede funcionar como una importante fuentes extracelular de ROS por la generación de superóxido y óxido nítrico (Barbeito et al., 2004).

Existe una gran cantidad de evidencia acerca de daño oxidativo tanto en pacientes con ELA esporádica como en modelos animales SOD1. Algunos hallazgos son la oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos, oxidación del DNA y formación de nitrotirosina en agregados de NF (Bowling and Beal, 1995; Chou et al., 1996b; Chou et al., 1996a; Ferrante et al., 1997; Shibata et al., 2001). En ELA ha sido de particular interés la oxidación de proteínas, las cuales pueden mostrar alteraciones en su función e incluso participar en la formación de ROS adicional, con lo que establecen un efecto amplificador (Castagne et al., 1999). Al mismo tiempo, una serie de factores podrían aumentar la probabilidad de sufrir estrés oxidativo en MN: alta actividad metabólica asociada a su gran tamaño y la transmisión sináptica, alta

concentración de lípidos no saturados, gran cantidad de entradas sinápticas glutamatérgicas asociado a un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ y baja capacidad tampón para $[Ca^{2+}]_i$ (Roy et al., 1998; Rao and Weiss, 2004). Sin embargo, a pesar del conocimiento que hemos adquirido de los procesos oxidativos en células neuronales, no es posible distinguir si los daños oxidativos están involucrados en la degeneración neuronal en ELA o si son consecuencia de la patología. Finalmente, debemos recordar que los procesos no son exclusivos de la ELA, y han sido observados en otras patologías neurodegenerativas como Alzheimer's y Parkinson's (Markesberry y Carney, 1999; Dunnett y Björklund, 1999). Estas evidencias podrían estar mostrando que el estrés oxidativo es irrelevante en ELA o que es una vía común por medio de la cual las enfermedades degenerativas evolucionan.

✓ ***Evidencias Que Sugieren La Existencia De Disfunción Mitocondrial***

De forma consistente con el incremento en el daño oxidativo, existe cuantiosa evidencia de disfunción mitocondrial en ELA. Las alteraciones en mitocondrias se relacionan directamente con el consecuente daño oxidativo (Cleveland and Rothstein, 2001). El daño en las mitocondrias lleva a una pérdida de protones y generación de radicales reactivos y pérdida en la homeostasis de Ca^{2+} con la consecuente liberación de citocromo C, y ambos procesos conducen a muerte celular (Alexianu et al., 1994; Elliott and Snider, 1995; Beal, 1998; Siklos et al., 1998).

Morfología anormal de mitocondrias se ha detectado tanto en terminales motores como en músculo y células hepáticas (Siklos et al., 1996; Masui et al., 1985; Wiedemann et al., 1998). Estudios metabólicos han detectado una baja actividad de la citocromo oxidasa y alta actividad en los complejos I y II (Fujita et al., 1996; Bowling et al., 1993; Browne et al., 1998). Por otra parte células no neuronales, como plaquetas y linfocitos de pacientes, también muestran alteraciones mitocondriales (Swerdlow et al., 1998; Curti et al., 1996).

Si bien no existe evidencia que indique que ELA es una patología mitocondrial, la disfunción mitocondrial es un mecanismo de importancia en ELA. Recientemente utilizando minociclina, la cual inhibe la liberación de citocromo C y la actividad de las caspasas 1 y 3, se ha demorado el inicio de la pérdida de MN en dos modelos transgénicos de ELA familiar tipo 1 (Kriz et al., 2002; Zhu et al., 2002).

✓ ***Evidencias Que Sugieren La Existencia De Mecanismos Auto-inmunes***

Estudios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos realizados tanto en pacientes con ELA como en animales de laboratorio sugieren la existencia de mecanismos autoinmunes en ELA. Una gran proporción de las investigaciones se ha realizado utilizando anticuerpos de pacientes con ELA, y en menor grado utilizando tejidos de pacientes.

- Efecto de los anticuerpos provenientes de pacientes con ELA sobre motoneuronas

Se reportó que el suero de pacientes con ELA dañaba o mataban neuronas en cultivo (Field y Hughes 1965; Roisen et al., 1982; Smith et al., 1994). Sin embargo, otros investigadores no pudieron reproducir esos resultados (Horwich et al., 1974; Liveson et al., 1975). Por otro lado, estudios histológicos han mostrado infiltración de linfocitos T en asta ventral de medula espinal de pacientes con ELA (Troost et al., 1990; 1993). Posteriormente se evaluó si las IgG-ELA podían afectar a motoneuronas en la medula espinal, ya que las células en cultivo pueden ser particularmente sensibles a un gran número de estímulos. En excelentes condiciones de cultivos, cortes transversales de medula espinal de ratas de 8 días podían cultivarse por varios meses (Rothstein 1993). En estas condiciones al menos dos grupos de trabajo no observaron ningún efecto de las IgG-ELA (Drachman et al., 1995; Liveson J et al., 1975).

- Anticuerpos contra canales de calcio

La fatiga muscular y alteraciones en la transmisión neuromuscular, como disminución en la frecuencia y en la amplitud de los MEPPs, y un aumento en el QC, en pacientes es bien conocida (Mulder DW et al., 1959; Denys EH y Norris, 1979; Maselli et al., 1993; Berstein Lp y Antel JP, 1981). Sin embargo, las IgG-ELA aumentan la frecuencia de liberación espontánea en la transmisión neuromuscular de ratón tanto en modelos ex vivo como in vivo (Uchitel et al., 1988; Appel et al., 1991; O'Shaughnessy et al., 1998; Muchnik et al., 2002). Al mismo tiempo, a fin de generar un modelo autoinmune de ELA en cobayos, se inocularon

animales con extracto de medula espinal. Estos animales mostraron muerte de motoneuronas, debilidad muscular y un aumento en la frecuencia de MEPPs (Garcias J et al., 1990). Estas observaciones que indican que un factor humoral en los pacientes de ELA pueda alterar la transmisión neuromuscular abre nuevas preguntas. ¿Este factor humoral son los anticuerpos? ¿Cuales son los mecanismos fisiológicos de este fenómeno? Y si ¿Estas alteraciones pueden contribuir a la muerte neuronal y como?

Un grupo de investigadores halló evidencias bioquímicas y electrofisiológicas indicando que los anticuerpos provenientes de pacientes con ELA eran inmunoreactivos contra CCDV de tipo L de fibra muscular (Cav1.1) y reducía la corriente de Ca^{2+} (Delbono et al., 1991; Smith et al., 1992; Delbono et al. 1993; (Kimura et al., 1994). Sin embargo, estas observaciones mostraban algunas inconsistencias para explicar las alteraciones en la transmisión sináptica. En primer lugar con una disminución en las corrientes de Ca^{2+} deberíamos esperar una disminución en la transmisión sináptica y no un aumento. Segundo, los canales de tipo L no se encuentran asociados a la transmisión sináptica (Katz et al., 1997), de hecho en esa época no existía evidencia acerca de canales de tipo L en la UNM. Tercero, el efecto citotóxicos de estos anticuerpos en cultivos de motoneuronas era prevenido con bloquenates CCDV de tipo P/Q y N (Smith et al., 1994). Y cuarto, los tratamientos terapéuticos con bloquenates de CCDV de tipo L como el Verapamil y la nimodipida eran inefectivos (Miller et al., 1996a; 1996b). En particular Kimura y colaboradores (1994), presentaron evidencia

indicando que los anticuerpos de pacientes con ELA se unían a un canal de tipo L y evitaban la interacción de un anticuerpo monoclonal específico para este canal. Mas tarde, Nyormoi (1996) mostró que se prevenía la interacción entre el anticuerpo monoclonal y el $Ca_{v1.1}$ debido a degradación proteolítica del canal, y no debido a los anticuerpos de los pacientes.

No obstante, otros autores detectaron un aumento el las corrientes de Ca^{2+} a través de CCDV de tipo P/Q en células de Purkinje (Linas et al., 1993) o depresión de corrientes de Ca^{2+} en células grano en cultivo (Zhainazarov et al., 1994).

Así, el efecto particular de estos anticuerpos sobre las corrientes de Ca^{2+} parece ser dependiente del tipo celular en estudio, aun en presencia del mismo tipo de CCDV (Mosier et al 1995; Yan et al., 1997; Carter et al., 2003). Sin embargo, otros autores no detectaron anticuerpos dirigidos contra CCDV de tipo N o P/Q utilizando bloqueantes específicos marcados con Iodo radiactivo o anticuerpo contra CCDV y lectura por ELISA (Drachman et al., 1995; Arsac et al., 1996).

Otros autores por medio de técnicas histológicas y microscopia electrónica han mostrado que estos anticuerpos incrementan la $[Ca^{2+}]_i$ asociado a alteraciones estructurales en terminales motores (Engelhardt et al., 1995a; 1997b; Siklos et al., 1996). Sin embargo, este aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ no fue confirmado utilizando el indicador de Ca^{2+} Fura 2 en sinaptosomas de corteza de rata (Thomas et al 1997). Si bien estos resultados muestran una inconsistencia en el efecto de estos

anticuerpos, también sugieren que los anticuerpos pueden tener sitios blancos específicos de acción. En otras palabras los terminales sinápticos de la corteza no sería afectados por los anticuerpos, mientras que los terminales motores sí. Otros experimentos muestran una situación similar. En cultivos organotípicos de medula espinal, los anticuerpos de pacientes con ELA no afectan motoneuronas (Drachman et al., 1995; Liveson J et al., 1975).

- Otros anticuerpos

En distintos trabajos se presentó evidencia indicando que los sueros de pacientes con ELA contienen autoanticuerpos dirigidos contra canales de calcio voltaje dependiente (CCVD), neurofilamentos (NF) receptor FAS (CD95), proteínas musculares fetal y antígenos vasculares. Sin embargo, las investigaciones acerca de autoanticuerpos muestran resultados contradictorios.

- Síndrome autoinmune similar a ELA

Cabe mencionar la existencia de algunos síndromes autoinmunes que mimetiza a la ELA, y entre ellos el mejor caracterizado es la neuropatía motora multifocal (Kornberg AJ et al., 1995). Se manifiesta como debilidad muscular asimétrica de progresión lenta afectando preferencialmente músculos distales. Los pacientes no presentan signos de motoneuronas superiores. El diagnóstico es basado en el bloqueo de la conducción de los nervios motores o un aumento en los niveles de anticuerpos contra el gangliósido GM1. Estos anticuerpos son los

responsables de los cambios fisiológicos típicos de la enfermedad (Roberts M et al., 1995; Newsom-Davis J 1994). Estos pacientes responden bien a inmunoterapia con ciclofosfamida o inmunoglobulina intravenosa (Kornberg AJ et al., 1995).

- Efecto de la inmunosupresión

El objetivo más inminente en las investigaciones de la patogénesis de ELA es desarrollar un tratamiento terapéutico. Si ciertos mecanismos autoinmunes pudieran jugar algún papel en la patología, es de esperar que la adecuada inmunosupresión modifique favorablemente el curso de la enfermedad. Sin embargo, las terapia de inmunosupresión han fallado en al menos retardar la progresión de la patología utilizando corticoesteroides, plasmaféresis, azatioprin, ciclofosfamida y combinaciones de ellos, o irradiación de tejido linfoide (Kelemen J et al., 1986; Brown RH et al., 1986; Tan E et al., 1994; Appel SH et al., 1988; Drachman et al., 1994). Sin embargo, la obtención de una terapia autoinmune adecuada se encuentra seriamente comprometida por el tipo de autoinmunidad y el estado del paciente cuando recibe dicha terapia (Rossini, 2004)

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Existen numerosas observaciones que sugieren que las IgG-ELA podrían estar involucradas en la ELA. Sin embargo, en los ensayos clínicos donde se utilizó inmunosupresores no se observó una modificación de la progresión de la enfermedad. Es factible que la terapia no haya sido adecuada como se ha observado para enfermedades claramente autoinmunes como la diabetes (Rossini, 2004). Desgraciadamente, terapias que disminuirían el estrés oxidativo o la excitotoxicidad por glutamato tampoco fueron efectivos (Dib, 2003; McGeer and McGeer, 2005). Una probable explicación para la falta de efectividad de estas terapias podría ser que los pacientes obtienen un diagnóstico y reciben el tratamiento cuando la patología ha progresado demasiado. De hecho, cuando los pacientes obtienen el diagnóstico, se estima que han perdido el 50 % de las neuronas motoras (Ekblom, 1992). Consecuentemente los pacientes ya no podrían responder favorablemente a ningún tipo de terapia. Esta explicación tentativa sugiere que investigación de eventos tempranos en la patología daría mayores oportunidades de hallar mecanismos con potenciales blancos terapéuticos. Esto se asocia a nuestra hipótesis de trabajo, esto es que la modulación sináptica mediada por anticuerpos podría ser un evento temprano en la ELA. Esto sería debido a que la modulación sináptica es una manifestación del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, la cual podría llevar a muerte celular mediada por Ca^{2+} y disfunción mitocondrial.

Las observaciones que soportan la hipótesis se mencionan a continuación.

1 - La modulación sináptica mediada por anticuerpos se ha observado consistentemente en terminales motores (Uchitel et al., 1988; Mohamed et al., 2002).

2 - En animales de laboratorio tratados con IgG-ELA se ha observado:

2.1 - Un incremento de la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ tanto en somas como en terminales motores asociado a alteraciones ultraestructurales (Engelhardt et al., 1995; Siklos et al., 1996; Pullen and Humphreys, 2000; Pullen et al., 2004).

2.2 - Pérdida de la funcionalidad de terminales motores in vivo, reflejando denervación como se observa en pacientes con ELA (Denys and Norris, 1979; Uchitel et al., 1992; Maselli et al., 1993).

3 - En cultivos de motoneuronas tratadas con IgG-ELA se activa una importante señal apoptótica (caspasa 3) (Demestre et al., 2005).

4 - Los terminales motores se encuentran expuestos a los anticuerpos por localizarse fuera de la barrera hematoencefálica, lo cual los transforma en un blanco para autoinmunidad (Vincent, 1999).

5 - Estos anticuerpos no afectarían terminales de la corteza motora (Thomas and Dunn, 1997), ni tampoco motoneuronas por interacción directa con los somas neuronales (Liveson et al., 1975; Drachman et al., 1995). Sin embargo, estos anticuerpos afectan la liberación de neurotransmisor en células hipocámpales (Andjus et al., 1997), lo que sugiere que los anticuerpos mostrarían especificidad tisular para ciertos tipos neuronales.

6 - En animales modelos de ELA familiar (SOD1) y en pacientes con ELA esporádica primero se observan alteraciones en la porción distal de

la motoneurona y luego en los cuerpos neuronales (Fischer et al., 2004; Shefner, 1999) .

Sin embargo, no existen evidencias que demuestren que los efectos observados son debidos a una acción específicamente mediada por las IgG-ELA. Por el contrario se ha reportado que ciertas observaciones podrían explicarse por la presencia de contaminantes en la fracción de IgG purificadas (Nyormoi, 1996). Estos resultados sugieren que los efectos observados podrían ser debidos a un componente del suero distinto que las IgG-ELA. Por otro lado no se conocen los mecanismos involucrados en los efectos observados por estos anticuerpos, y solo existen escasas evidencias indirectas de los posibles blancos moleculares de los anticuerpos. En suma, la relevancia de las IgG-ELA en los efectos observados se encuentra bajo discusión. En este sentido, un detallado estudio de la modulación sináptica mediada por IgG-ELA puede proporcionar información útil no solo acerca de la relevancia de las IgG en los efectos observados y en la patología, sino también acerca de la prevención de la degeneración específica de motoneuronas.

Objetivos del trabajo de tesis

El objetivo general del trabajo es evaluar si los pacientes con ELA poseen anticuerpos dirigidos contra algún componente celular de neuronas motoras capaces de modular la transmisión sináptica y definir los mecanismos involucrados en dicha modulación.

Como objetivo específico se planteó:

Estudiar si las IgG-ELA de forma específica son capaces de modificar la actividad sináptica de alfa motoneuronas y que mecanismos podrían estar involucrados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes con ELA y pacientes control

Los sueros fueron obtenidos de 13 pacientes con ELA esporádica definitiva (Edad: 42 – 68, 8 varones y 5 mujeres) y 15 controles (Edad: 41 – 70, 8 varones y 7 mujeres).

Los sueros utilizados como controles fueron de dos tipos, controles sanos (s-IgG-Ctrl) (n = 6) y controles enfermos (e-IgG-Ctrl) (n = 9). A lo largo del trabajo los anticuerpos serán identificados individualmente con números arábigos desde “1” a “13” (para IgG-ELA), con letras mayúsculas desde “A” hasta “F” (para s-IgG-Ctrl) y con letras minúsculas cursivas desde “a” hasta “i” (para e-IgG-Ctrl).

Los pacientes utilizados como controles enfermos tenían un diagnóstico de ELA familiar (n = 3, a, b y c), Alzheimer’s (n = 1, d), síndrome miastémico (n = 2, e y f), neuropatía periférica (n = 2, g y h) y Charcot Marie tooth (n = 1, i). Los anticuerpos control e-IgG-Ctrl y s-IgG-Ctrl de forma conjunta serán llamados IgG-Ctrl.

Los pacientes con ELA tenían un diagnóstico de ELA definitivo según EL Escorial (Brook, 1994).

Purificación de Anticuerpos

Las proteínas séricas fueron sometidas a precipitación salina con sulfato de amonio y luego dializadas contra tampón fosfato 20 mM (PB). Luego las IgG fueron purificadas por cromatografía de afinidad utilizando una

columna con proteína G recombinante–HiTrap proteína G HP columna- (Amersham Bioscience) según las instrucciones del fabricante. Las IgG despegadas de la columna fueron dializadas contra tampón fosfato salino 10 mM (PBS) utilizando una membrana de poros de 12 Kd, y luego esterilizadas por filtración con un filtro millipore de 2 μm (Millipore). Los anticuerpos fueron conservados en pequeñas volúmenes a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La concentración fue estimada por lectura de la densidad óptica en espectrofotómetro a $\lambda_{280\text{nm}}$ y corrección para IgG humana. El producto de purificación fue analizado por medio de un SDS-PAGE al 10 %. La inactivación del complemento fue realizada por calentamiento a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos.

Anticuerpos anti-gangliósidos no fueron detectados en los IgG estudiadas (letras y números).

Animales y preparación neuromuscular

Los experimentos fueron realizados en músculo diafragma y soleus de ratones machos de la línea Swiss de un peso aproximado de 25 – 30 g.

Los ratones fueron anestesiados con tribromoethanol 2 % y desangrados.

Inmediatamente después se disecaba el músculo a utilizar y se mantenía cubierto con solución de Ringer (RN) (en mM): NaCl 137; KCl 5; CaCl_2 2; MgSO_4 1; NaHCO_3 12; Na_2HPO_4 1 y glucosa 11, en una caja de petri con la base cubierta con silicona sintética, Sylgard (Dow-corning). La solución

de Ringer fue burbujeada de forma constante con gas carbógeno (95% de CO₂ y 5% de O₂). Después de realizar la disección el músculo fue utilizado para experimentos de electrofisiología a 25 °C o para inmunohistoquímica. Cuando el músculo fue utilizado para experimentos electrofisiológicos, éste fue transferido a una cámara de registro que contenía 1000 µl de solución de registro y se evaluaba la actividad sináptica, mientras que para experimentos de inmunohistoquímica se procesaban como se indica más abajo.

Electrofisiología

A fin de evaluar la actividad sináptica espontánea y evocada, se midió potenciales de placa miniatura (MEPPs) y potenciales de placa evocados (EPPs) por medio de registros intracelulares en las fibras musculares. Se preparó microelectrodos a partir de capilares de vidrio (borosilicato de aluminio) con microfilamento, utilizando un estirador de capilares (Sutter Instrument Co.), Modelo P-97). Los microelectrodos con una resistencia apropiada (20-35 MΩ) se llenaron con una solución conductora (3 M KCl). Los microelectrodos se conectan a un amplificador (Warner Instruments, Inc.), la señal de salida del amplificador se envía a un sistema de amplificación y filtrado (Cyberamp 320; Axon Instruments, Inc.) y, de allí, a una interfase analógico-digital (Digidata 1200; Axon Instruments, Inc.). Esta interfase digitaliza las señales que serán enviadas a la computadora

que permite la adquisición y almacenamiento de los registros electrofisiológicos.

Antes de utilizar el músculo disecado en un experimento se confirmó la actividad sináptica normal en RN y luego se aplicó a la solución de registro el anticuerpo o la droga que se fuera a utilizar.

A fin de llevar a cabo un mayor número de experimentos con las IgG-ELA de cada paciente primero se determinó cual era la concentración de anticuerpo capaz de modular la transmisión sináptica, probando desde 100 a 4000 $\mu\text{g/ml}$. Debido a que la concentración efectiva utilizada de 100 a 400 $\mu\text{g/ml}$, requería un tiempo de incubación de 4 horas, las incubaciones se realizaron en una cámara de incubación húmeda a fin de mantener constante el volumen, concentración iónica y pH de incubación. Así, la incubación con los distintos anticuerpos se realizó durante 4 horas. Se realizaron experimentos controles en paralelo con cada IgG o droga utilizada para evaluar su efecto sobre la actividad sináptica, a fin de descartar falsos positivos o negativos. El músculo diafragma fue disecado y alternativamente y el hemi-diafragma izquierdo o derecho fue utilizado para estudiar el efecto de las IgG-ELA o IgG-Ctrl.

Para evocar EPPs, el nervio frénico colocado sobre dos electrodos de platino y cubiertos con grasa (Cornining) fue estimulado eléctricamente. Los electrodos de platino se conectaban a un estimulador (Grass stimulator S8800), que permitía controlar la intensidad y frecuencia (20 y 40 hz.) de estimulación. En los músculos sometidos a estimulación

eléctrica se evitó la contracción muscular por medio del inhibidor específico de los canales de sodio de la fibra muscular (1 μM μ -conotoxina GIIIB), (Alomone Labs, Jerusalén). La liberación de neurotransmisor evocada por estimulación se evaluó en una baja relación iónica $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{Mg}^{2+}]$ a fin de estimar el QC por el método de coeficiente de variación (Hubbard et al. 1969). El QC se estimó después de 6 segundos de estimulación a 20 y 40 hz., con el propósito de evitar la facilitación y depresión inicial en el tren de estimulación.

La facilitación por pulso pareado (PPF) y la potenciación post-tetánica (PTP) fue estudiada en una baja relación iónica $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{Mg}^{2+}]$ (Ca^{2+} 2 mM / Mg^{2+} 6.5 mM) (Katz y Miledi 1968). Para evaluar la PPF se utilizaron 3 protocolos de estimulación diferentes, aplicando dos estímulos con un tiempo de interpulso de 10, 25 ó 50 milisegundos. La PPF fue evaluada por el cambio en la amplitud del segundo EPP normalizado al primero EPP. La PTP se evaluó comparando la respuesta a 10 estímulos a 0,5 hz. antes y después de la estimulación tetánica (500 estímulos a 100 hz.).

Análisis

Para investigar el efecto de los diferentes anticuerpos sobre la actividad sináptica o la facilitación a corto plazo se estudiaron al menos 30 sinapsis de 3 animales distintos en cada condición.

Los valores de actividad sináptica son expresados como media error estándar, y las diferencias entre medias fue evaluada por medio de una t de Student's a una cola.

La amplitud media de los MEPPs en cada sinapsis fue normalizada a -75 mV por el método usado por Magleby y Steven (1972). $A_{Nor} = A \cdot (-75 - E_r)/E_m$, donde A es la amplitud medida en mV, E_r es el potencial de reversión (para los AchR se asume que es de 0 mV), y E_m es el valor medio de potencial de membrana durante el periodo de registro.

Para el análisis de la distribución de descarga de neurotransmisor se midió el tiempo entre los eventos miniatura, se construyó un histograma y se ajustó a una exponencial simple y analizó utilizando una prueba de χ^2 (Microcal Origin 6.0). Todas las mediciones sobre los registros se realizaron utilizando el programa Clampfit 9.0.

Preparación del tejido e inmunohistoquímica

El músculo diafragma o Soleus fue disecado y fijado durante 3 minutos con 4 % de paraformaldehído (PFA) en PB 0,1 M, pH 7 a temperatura ambiente. Luego el tejido fue permeabilizado con triton X 100 1%, lavado nuevamente en PB y finalmente crio-prottegido con sacarosa 30 %. Todos los pasos son realizados a 4 °C excepto donde indique lo contrario. Los segmentos de tejido fueron incluidos en Tissue-Tek (OCT4583; Sakura fine Co. Tokyo) y luego congelado a -20 °C. Se realizaron cortes transversales de los músculos de 40 μ m en criostato, recogiendo los cortes en vidrios gelatinizados y conservando estos a -20 °C hasta su uso.

Los cortes de tejido fueron procesados para realizar una doble tinción por inmunofluorescencia indirecta y una tinción directa con α -Bungarotoxina conjugada con tetrametilrodamina (BgTx-R) (Molecular Probes, Eugene, OR). La visualización de los anticuerpos humanos se lograba a través de un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana conjugado a isotiocianato de fluoresceína y los anticuerpos anti- sinaptotagmina se detectaron con un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 488 (Molecular Probes). Todas las incubaciones fueron realizadas a temperatura ambiente y utilizando PBS 10 mM pH 7,4, excepto donde se indique lo contrario.

Las inmunofluorescencias se realizaban incubando el anticuerpo primario correspondiente durante 19 hs a 4 °C en agitación, éste luego fue lavado durante 90 minutos. Luego el tejido fue incubado con el anticuerpo secundario correspondiente y la BgTx-R durante 105 minutos y nuevamente lavado durante 40 min. Finalmente el tejido fue montado con PBS:glicerina (1:1) o un medio comercial para fluorescencia, ProLong Antifade (Molecular Probes). Para definir el patrón específico de marcación y los niveles de autofluorescencia del tejido se realizaban experimentos control con IgG-Ctrl como anticuerpo o sin anticuerpo primario.

Microscopia y registro de imágenes

Se utilizó un microscopio confocal equipado con láseres de Argón y Helio-Neón verde para la excitación de los fluoróforos. Estos permitieron la

detección de las señales de luz emitidas por el tejido con doble marcación durante el mismo registro.

Para la detección de la emisión de luz se utilizó un espejo dicróico de 570 nm. La luz con longitud inferior a 570 nm se filtró con los filtros 579 y 590, y las longitudes de onda superiores a 570 con un filtro de 605 nm.

La adquisición de imágenes se realizó en modo secuencial y utilizando los mismos parámetros para todas las imágenes. Los valores medios de señal fluorescente se obtuvieron por cuantificación de la densidad óptica luego de substrair las señales inespecíficas utilizando el programa Fluoview 300. Los registros se realizaron a partir de 12 sinapsis por tratamiento provenientes de 3 experimentos independientes utilizando el tejido de 3 animales distintos. La alineación de los láseres fue controlada utilizando Tetra speck microsphere 4.2 μm (Molecular Probes).

Reactivos

Todas las sales y reactivos utilizados fue provenientes de Sigma (St. Louis, MO), excepto cuando se indique lo contrario. Los experimentos con reactivos fotosensibles se realizaron evitando la iluminación directa. Para los experimento de inmunoprecipitación se utilizó IgG anti-humana de cabra e IgG anti-conejo de cabra. El BAPTA-AM se cargó en solución de Ringer modificando divalentes, Ca^{2+} 0 mM y Mg^{2+} 3 mM, durante 30 min. a 25 °C y 30 min. a 37°C, luego se lavó a 25 °C en RN que no contenía Ca^{2+} . El tribroetanol fue de Aldrich (Milwaukee, USA). La nitrendipina fue de RBI (Natick, MA, USA) y los inhibidores de proteasas fueron provenientes de

dos compañías: Sigma (Aprotinina, Pepstatina A y EGTA) y Calbiochem (San Diego, CA, USA) (Aprotinina, Pepstatina A). El BAPTA-AM y los bloqueantes de CCDV ω -conotoxin GVIA y ω -Agatoxina IVA fueron de Alomone Laboratories (Jerusalén, Israel).

RESULTADOS

IgG-ELA induce potenciación de la transmisión sináptica espontánea de forma específica y reversible.

Análisis de la capacidad de las IgG-ELA para modificar la transmisión sináptica espontánea.

Previamente se reportó que las IgG-ELA son capaces de inducir modificaciones estructurales y funcionales en neuronas motoras (Uchitel et al., 1988; 1992; Smith et al., 1992; Pullen et al., 2000; 2004). Sin embargo, no existe evidencia concluyente que muestre que las IgG-ELA son verdaderamente responsables de las modificaciones estructurales y funcionales reportadas. Por el contrario como se detalló en la introducción, ciertos resultados ponen en duda la importancia de las IgG-ELA en las modificaciones observadas después de un tratamiento con IgG-ELA (Nymous, 1996). Para responder a esta pregunta crucial se realizaron experimentos fisiológicos que permitieran identificar los efectos de las IgG-ELA y evaluar su especificidad en sus efectos. Teniendo en cuenta la hipótesis que considera que la ps-IgG-ELA podría ser un mecanismo efector temprano se decidió evaluar los efectos de las IgG-ELA y su relevancia sobre la transmisión neuromuscular.

Para evaluar la capacidad moduladora de las IgG-ELA sobre la actividad sináptica neuromuscular espontánea se estudió la frecuencia de MEPPs antes y después de agregar a la solución de registro IgG-ELA o IgG-Ctrl.

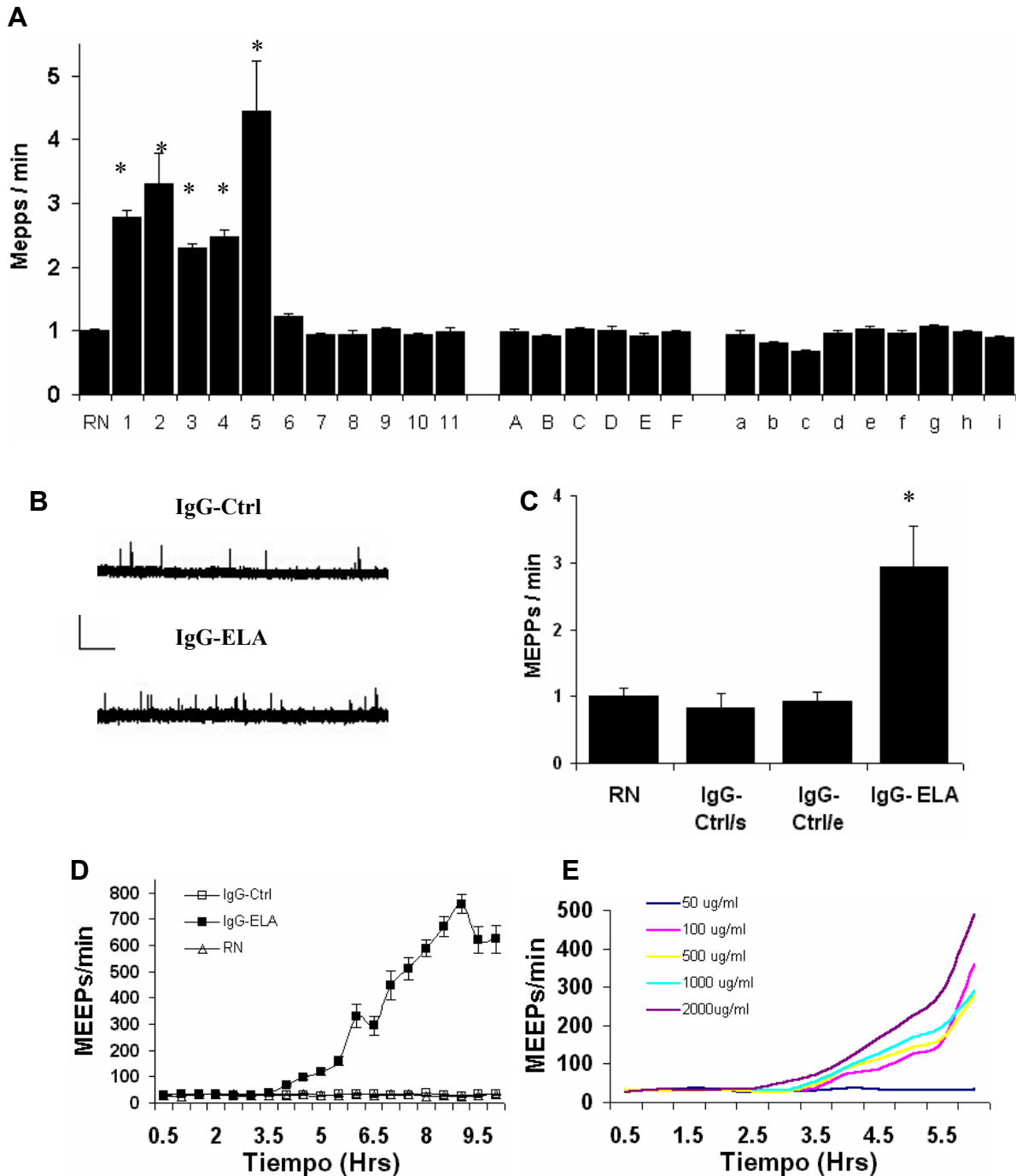


Fig. 7. Evaluación y cuantificación de la actividad sináptica espontánea en la preparación neuromuscular de diafragma de ratón tratada con IgG-ELA o IgG-Ctrl.

(A) Transmisión sináptica normalizada (MEPPs/min) en sinapsis neuromusculares después de 4 hs de incubación en solución normal (RN), o con anticuerpos purificados de pacientes con ELA (de 1 a 11), individuos sanos (de A hasta F) y de pacientes con otras patologías como se describe en la metodología (de a hasta i). Se estudiaron distintos tiempos de incubación (desde 1 a 7 hs). Note que las IgG-ELA

desde el paciente 1 a 5 aumentaron la actividad sináptica de 2,5 a 3 veces en comparación a valores control.

(B) Un registro representativo de la actividad sináptica espontánea después de agregar IgG-ELA o IgG-Ctrl (100 μ g/ml). Note que IgG-ELA aumenta el número de MEPPs. La barra de escala representa 1 mV/1000 ms. (C) Cuantificación de la frecuencia de liberación espontánea de Ach en la UNM en solución normal (RN) y luego de tratarla con IgG-ELA o IgG-Ctrl (IgG-Ctrl/s: Control sanos e IgG-Ctrl/e: Control enfermo). (D) Cuantificación de la frecuencia de MEPPs en registros de larga duración. La actividad sináptica aumentó de forma dependiente del tiempo de incubación con las IgG-ELA, mientras que la actividad sináptica en el control permaneció constante. (E) Curvas dosis respuesta mostrando el efecto de las IgG-ELA a diferentes concentraciones y tiempos de incubación.

Las IgG-ELA provenientes del \sim 50 % de los pacientes aumentaron la actividad sináptica aproximadamente de 2 a 5 veces a las 4 hs de incubación en comparación con la actividad sináptica registrada en el tratamiento control (Fig. 7 A-C). No se observó ningún efecto de las IgG-Ctrl sobre la transmisión sináptica (Fig. 7 A - D). La ps-IgG-ELA correlacionó positivamente con el tiempo de incubación ($r = 0,97$) ($P < 0.01$) (Fig. 7 D). La curva dosis respuesta permitió determinar que 100 μ g/ml eran suficientes para modular la actividad sináptica (Fig. 7 E). Utilizando esta concentración de anticuerpos fue posible realizar un mayor número de experimentos con los anticuerpos de cada paciente.

Evaluación de la dependencia de las IgG-ELA en la inducción de la potenciación sináptica en la transmisión espontánea

Con el fin de evaluar si las alteraciones funcionales reportadas previamente (Uchitel et al., 1988) son debidas a las IgG-ELA *per se*, y no a la presencia de uno o más elementos contaminantes en la solución de anticuerpos (Nyormoi, 1996) se realizaron dos grupos de experimentos.

1º Para definir sí la ps-IgG-ELA es mediada a través de la acción proteolítica de peptidasas se estudió la relevancia de la serina proteasa

en la ps-IgG-ELA. Con este objetivo, se midió la actividad sináptica espontánea utilizando anticuerpos (IgG-ELA o IgG-Ctrl) y músculos tratados con un inhibidor específico de serina proteasa (aprotinina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La inhibición de esta proteasa no afectó la capacidad de los anticuerpos para inducir una ps-IgG-ELA de igual magnitud que las IgG-ELA que no fueron tratadas con inhibidor de proteasa (Fig. 8 B). Por otra parte, cuando se realizó el experimento control sin IgG o con IgG-Ctrl conjuntamente con el inhibidor de proteasas no se observó alteraciones de la actividad sináptica normal (Fig. 8 B). Si bien en estos experimentos se utilizó inhibidor de serina proteasa proveniente de dos compañías diferentes en ningún caso se observó ausencia de la ps-IgG-ELA.

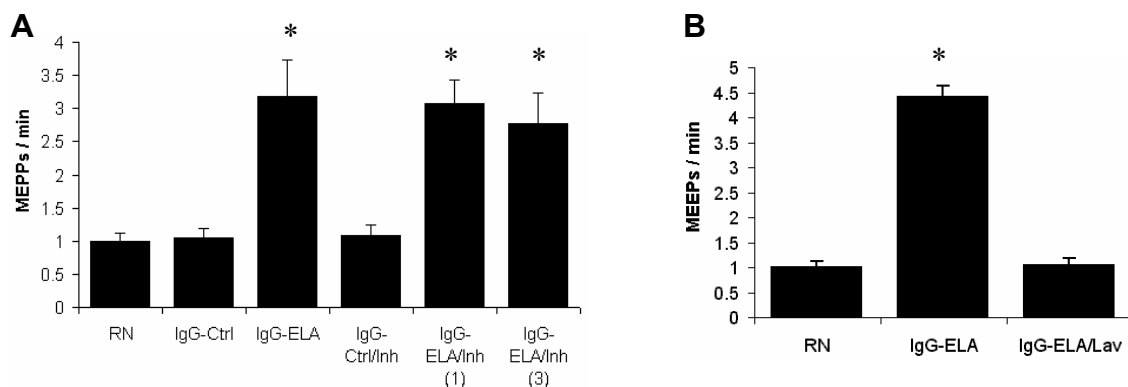


Fig. 8. Evaluación de la reversibilidad de la ps-IgG-ELA y de la participación de proteasas en la modulación sináptica. Cuantificación de la frecuencia de MEPPs normalizada al control. (A) Gráficos de barras mostrando que los inhibidores de proteasas no modifican la frecuencia de MEPPs para ninguno de los tratamientos. La ps-IgG-ELA fue similar a la inducida por anticuerpos pretratados con Aprotinina (IgG-ELA/Inh(1)) o una mezcla de 3 inhibidores (IgG-ELA/Inh(3)). (B) Las barras muestran la actividad antes de agregar IgG-ELA (RN), después de incubarse con los anticuerpos (IgG-ELA) y luego del lavado con solución de registro, mostrando la reversibilidad del efecto de las IgG-ELA.

De forma similar se evaluó si la ps-IgG-ELA podía estar mediada por actividad proteolítica de la aspártico y metalloproteasa utilizando

sendos inhibidores específicos (pepstatina A 10 μ M y EGTA 3 mM). La utilización de estos inhibidores no evitó la inducción de la ps-IgG-ELA incluso cuando se utilizó una mezcla de los 3 inhibidores (aprotinina, pepstatina A y EGTA) (Fig. 8 A).

Si la ps-IgG-ELA fuera mediada por actividad proteolítica, el mecanismo más parsimonioso¹ sería que las proteasas cortasen ciertas proteínas de membrana, y/o de la brecha sináptica, introduciendo un daño que promovería mayor liberación de vesículas sinápticas. De esta forma las modificaciones en la actividad sináptica deberían ser de tipo permanente (irreversibles). Para evaluar esta hipótesis, se indujo ps-IgG-ELA y se analizó si este aumento en la transmisión sináptica era reversible por medio del lavado de las IgG-ELA, utilizando distintos tiempos y volúmenes de solución. Se determinó que 9 cambios del volumen de la solución de registro, por solución sin IgG, distribuidos en un período de 45 minutos eran suficientes para revertir la actividad sináptica a los valores normales (Fig. 8 B). Al mismo tiempo la reversibilidad del efecto muestra que la potenciación sináptica es dependiente del tratamiento.

Estas observaciones indicarían que la ps-IgG-ELA no depende de la actividad proteolítica de enzimas contaminantes, sino de las propias IgG-ELA.

2° - Las IgG-ELA fueron purificadas utilizando una metodología de alta sensibilidad y especificidad, y los análisis por SDS-PAGE no revelaron

¹ El principio de parsimonia establece que ante distintas explicaciones posibles, la explicación más sencilla suele ser la más probable.

la presencia de contaminantes. Sin embargo, podría considerarse la presencia de algún tipo de contaminante que co-purifique con las IgG y no sea detectado por la metodología empleada. En consecuencia, debido a que es experimentalmente insostenible evaluar la participación de todo tipo de contaminante potencial con pruebas específicas, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación antes de evaluar el efecto de las IgG-ELA sobre la actividad sináptica. Estos experimentos permitirían hacer una evaluación altamente específica y a mismo tiempo descartar contaminantes potenciales desconocidos.

Alícuotas de IgG-ELA e IgG-Ctrl fueron tratadas con IgG de cabra anti-IgG humana y luego centrifugadas a fin de eliminar las IgG-ELA o IgG-Ctrl. Las soluciones resultantes (IgG-ELA/Hu o IgG-Ctrl/Hu) se utilizaron para tratar preparaciones neuromusculares y medir la actividad sináptica espontánea. Las IgG-ELA-Hu no mostraron la capacidad de iniciar una ps-IgG-ELA (Fig. 9).

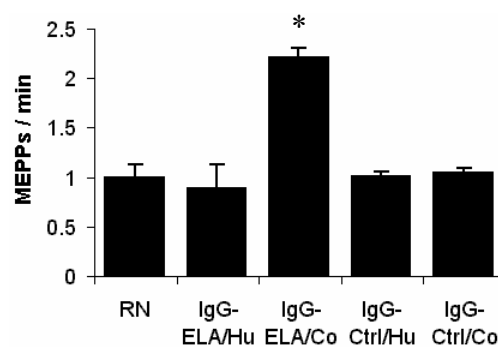


Fig. 9 La inmunoprecipitación de las IgG-ELA impide la ps-IgG-ELA. Frecuencia de MEPPs en músculos en solución normal (RN) y tratados con IgG-ELA o IgG-Ctrl luego de inmunoprecipitar con anticuerpos anti-humanos (IgG-ELA/Hu) o anti-conejo (IgG-ELA/Co). El protocolo de inmunoprecipitación no introdujo modificaciones para los tratamientos control. Note que se impide la ps-IgG-ELA con Ab anti-IgG humana pero con anti-IgG conejo, indicando que la modulación sináptica es dependiente de IgG-ELA.

Sin embargo las IgG-ELA tratadas con IgG de cabra anti-IgG de conejo mostraron una ps-IgG-ELA normal (Fig. 9). Como es de esperar, las IgG-Ctrl-Co o IgG-Ctrl-Hu no modificaron la actividad sináptica normal.

Estos resultados muestran que la ps-IgG-ELA es dependiente de IgG-ELA y no de elementos contaminantes.

Análisis de parámetros electrofisiológicos de la actividad sináptica espontánea durante ps-IgG-ELA

Con el fin de investigar si los cambios en la liberación espontánea representan un aumento en la frecuencia de liberación o existe además alteraciones en la modalidad de liberación, se analizó el efecto de las IgG-ELA sobre la distribución absoluta del número de MEPPs, la amplitud media de los MEPPs y la distribución de los intervalos de tiempo entre los MEPPs.

La distribución absoluta del número de MEPPs se desplaza hacia la derecha como es de esperar con un aumento en la frecuencia de espontáneos (Fig. 10 A y B). Esto indica que la ps-IgG-ELA es debida a un efecto presináptico. Por otra parte, como muestra la figura 10, no se observó un cambio consistente en la distribución de los intervalos de tiempo entre los MEPPs (Fig. 10 C y D) ni en la amplitud media de los MEPPs (Fig. 10 E y F). La ausencia de cambios en estos dos parámetros informa que las IgG-ELA no estaría afectando el modo en que las vesículas sinápticas son liberadas, ni afecta el tamaño cuántico respectivamente.

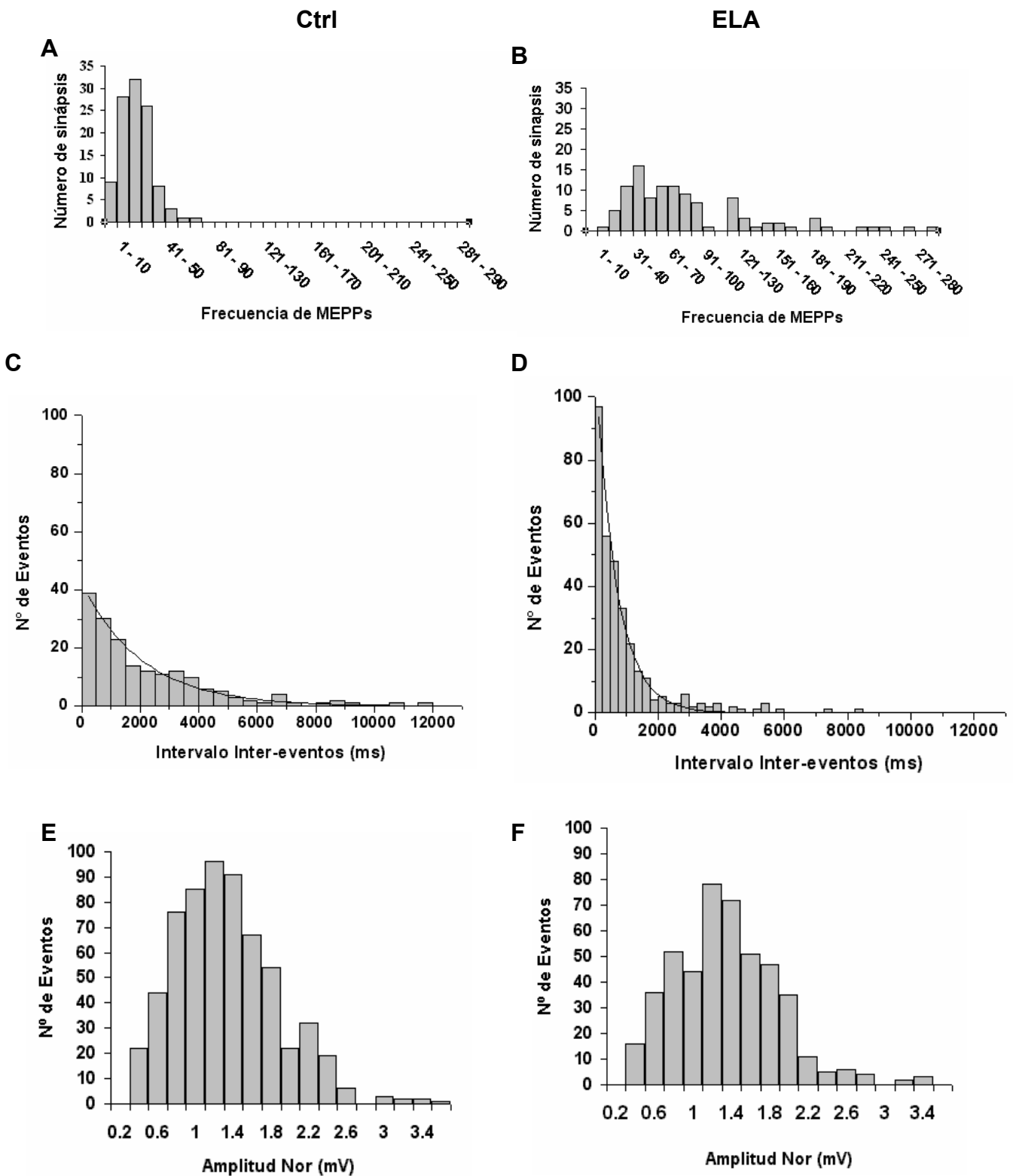


Fig. 10. Propiedades electrofisiológicas de la transmisión sináptica espontánea en músculos tratados con IgG-ELA o IgG-Ctrl.

(A y B) Distribución de la frecuencia de MEPPs, mostrando un incremento en la actividad sináptica en (B) después del tratamiento con IgG-ELA respecto a la distribución control (IgG-Ctrl) en (A) ($P < 0.05$).

(C y D) Distribución del tiempo de intervalos entre eventos espontáneos ajustados a una exponencial simple como se puede esperar para una distribución al azar en la liberación de Ach. (C) $R^2 = 0.98$, $\chi^2 = 2.5$ y (D) $R^2 = 0.98$, $\chi^2 = 5.23$.

(E y F) Distribución de amplitudes de MEPPs normalizadas a -75 mV. El Registro control (E) muestra 450 eventos de 20 sinapsis diferentes y el registro ELA (F) muestra 622 eventos desde 10 sinapsis diferentes. No se detectó diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$).

Las IgG-ELA solo modificarían la tasa en la que son liberadas las vesículas. Sin embargo, con una frecuencia extremadamente baja, se observó durante la ps-IgG-ELA, y no en los registros control, potenciales postsinápticos espontáneos gigantes, con una amplitud que varió entre 10 y 20 mV.

La observación de los MEPPs gigantes sugiere que las IgG-ELA podrían inducir la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) (Balezina et al. 2000).

IgG-ELA aumenta el contenido cuántos, la liberación asincrónica y la liberación retrasada de forma dependiente de la frecuencia de actividad sináptica

En distintos grupos de trabajo se observó que las IgG-ELA afectan la transmisión sináptica espontánea (Uchitel et al., 1988; Engelhardt et al., 1995; Mohamed et al., 2002). No obstante la capacidad moduladora de las IgG-ELA sobre la transmisión sináptica evocada por potenciales de acción fue escasa e incompletamente estudiada. O'Shaughnessy y colaboradores (1998) evaluaron el efecto de las IgG-ELA a baja frecuencia de estimulación y determinaron que el ~ 50 % de las IgG-ELA

aumentaban el contenido cuántico en un 68 %. De esta manera no contamos con información a cerca de la capacidad moduladora de las IgG-ELA sobre la transmisión sináptica evocada por frecuencias de estimulación fisiológica (Norris y Gasteg, 1955; Dasgupta y Simpson, 1962). Al mismo tiempo tampoco sabemos si las IgG-ELA puede afectar de alguna forma la plasticidad sináptica de corto termino. Para obtener una respuesta a estos interrogantes, se estudió sí las IgG-ELA podían modificar algunos de los parámetros de la transmisión sináptica evocada por estimulación eléctrica del nervio motor.

Efecto de las IgG-ELA sobre el contenido cuántico a frecuencias de estimulación fisiológica

Se estudió el contenido cuántico evocado por estimulación eléctrica a 1, 20, 40 y 100 Hz después de incubar las preparaciones neuromusculares con IgG-ELA o IgG-Ctrl. Las IgG-ELA no afectaron el QC a 20 y 40 Hz de estimulación (Fig. 11). No obstante el QC aumentó en un 26.67 y 41.35 % cuando se estimuló a 1 y a 100 hz. respectivamente ($p < 0.05$) (Fig. 11).

En los experimentos control se evaluó el QC en presencia de IgG-Ctrl o en ausencia de IgG. No se detectó diferencias en el QC entre ambos controles a ninguna de las frecuencias estudiadas (Fig. 11).

A fin de evitar los fenómenos de facilitación y depresión iniciales en un tren de estímulos, el QC a alta frecuencia se estimó analizando los EPPs

registrados después de los 6 seg. de registro para 20 y a 40 hz. y después de los 635 ms para los registros a 100 hz. Después de los 6 seg. y los 635 ms se observó que las variaciones de la amplitud de los EPPs alcanzaron un estado de equilibrio.

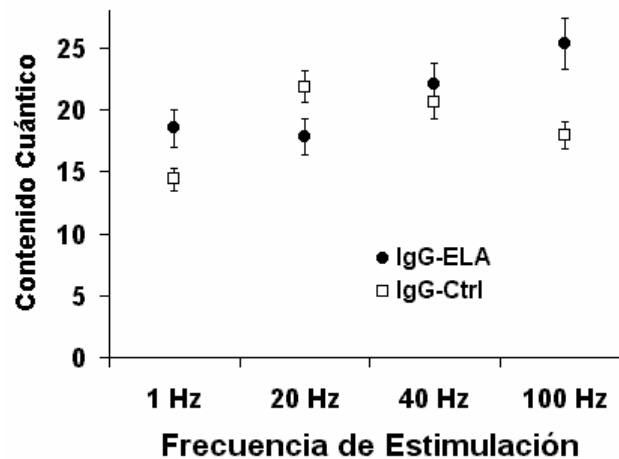


Fig. 11. Efecto de las IgG-ELA sobre el contenido cuántico. Valores de QC estimados para los tratamientos IgG-ELA o IgG-Ctrl a 1, 20, 40 y 100 hz. de estimulación eléctrica. Cada punto representa los valores obtenidos con las IgG-ELA o IgG-Ctrl de 4 y 6 individuos diferentes respectivamente. Cada IgG se estudió en 30 sinapsis de 3 animales. Se observaron diferencias significativas(*) ($P < 0.05$) a 1 y 100 hz., pero no a 20 o 40 hz.. 1 hz. - (QC: IgG-ELA = $18,49 \pm 1,69$; IgG-Ctrl = $14,27 \pm 1,26$) y 100 hz.; (QC: IgG-ELA = $25,33 \pm 1,44$; IgG-Ctrl = $17,92 \pm 1,34$).

Para estos experimentos se estudió al menos 30 sinapsis de tres animales distintos, y se evaluó 4 IgG-ELA distintas con inmunoreactividad positiva para los terminales motores (*ver más adelante inmunoreactividad de las IgG-ELA Pág. 87*). En los experimentos control se utilizó 6 IgG-Ctrl purificadas de sueros de 3 individuos sanos y 3 pacientes con patologías neurodegenerativas no ELA (A, B, C, a, b y d).

El músculo diafragma era disecado y alternativamente el hemidiafragma izquierdo o derecho se utilizó para los experimentos con IgG-ELA o IgG-Ctrl. Si bien todas las IgG-ELA siempre mostraron un

mayor QC a 1 y 100 hz., las diferencias no fueron siempre significativas respecto del experimento control realizado en el hemidiafragma contralateral del mismo animal. Debido a esta heterogeneidad en los resultados se analizó de forma conjunta la diferencia en el QC de todos los músculos tratados con IgG-ELA contra todos los tratados con IgG-Ctrl. Los resultados que se informan son los provenientes de este análisis conjunto (Fig. 11).

Estos resultados sugieren un pequeño efecto de las IgG-ELA sobre el QC, pero en forma dependiente de la actividad sináptica.

Análisis de la capacidad moduladora de las IgG-ELA sobre la plasticidad sináptica de corto término

Previamente se reportó que las IgG-ELA inducían plasticidad sináptica de largo plazo en músculos *levator auris* de ratón (Uchitel et al. 1992). Un fenómeno fisiológico similar se observó en UNM de pacientes con ELA (Maselli et al. 1993). Sin embargo, se desconoce si las IgG-ELA pueden introducir plasticidad sináptica a corto plazo.

Para definir si las IgG-ELA afectan la homeostasis de Ca^{2+} y/o las vías de señalización involucradas en la plasticidad de corto plazo, se evaluó si las IgG-ELA podían introducir alguna modificación cuando se inducía facilitación por pulsos pareados (PPF) y potenciación post-tetánica (PTP) en condiciones de bajo $[Ca^{2+}]$ alto $[Mg^{2+}]$ (Katz y Miledi, 1968).

La PPF se calculó como el porcentaje de cambio en la amplitud del segundo EPP respecto del primer EPP, estudiando pulsos pareados con un intervalo entre los pulsos de 10, 25 y 50 ms.

En nuestra condición (Ca^{2+} 2 mM / Mg^{2+} 6.5 mM) IgG-ELA no modificó la PPF. Los valores registrados de PPF con un tiempo de Inter.-pulso de 10, 25 y 50 ms fueron para IgG-ELA: $1,16 \pm 0,04$, $1,07 \pm 0,03$ y $1,19 \pm 0,05$; y para IgG-Ctrl: $1,03 \pm 0,05$, $1,09 \pm 0,01$ y $1,07 \pm 0,04$ ($p > 0.05$), (Fig. 12).

La PTP se cree que es debida a un incremento transitorio en la concentración de Ca^{2+} intracelular después de la estimulación a alta frecuencia (Brager et al. 2003).

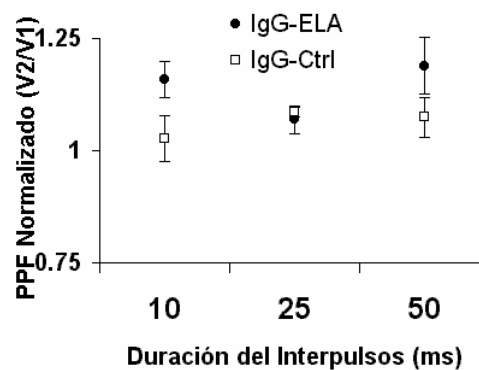


Fig. 12 Efecto de las IgG-ELA e IgG-Ctrl sobre la facilitación en estímulos pareados.

Facilitación de pulsos apareados a intervalos de 10, 25 y 50 ms normalizada como el cociente entre la amplitud del 2º EPP y la amplitud del 1º EPP (V_2/V_1). Ambos tratamientos mostraron similar facilitación en los 3 intervalos estudiados.

Dado que las IgG-ELA parecen alterar la concentración de Ca^{2+} intracelular (Engelhardt et al., 1995; 1997; Siklos et al., 1996), se hipotetizó que un aumento de calcio intracelular inducido previamente al incremento que induce un tren de estimulación podía exaltarla o

anular la PTP. Para estudiar esta hipótesis se evaluó la PTP en músculos incubados con IgG-ELA o IgG-Ctrl, y utilizado un protocolo de 10 estímulos a 0,5 hz., seguido de 500 estímulos a 100 hz. y nuevamente 10 estímulos a 0,5 hz. (Fig. 13).

Las IgG-ELA no alteraron la PTP ($p > 0.05$). Los valores de potenciación mostraron un rango de 105,1 a 131,9 % para el tratamiento IgG-ELA y de 107,2 a 141,4 % para el tratamiento control.

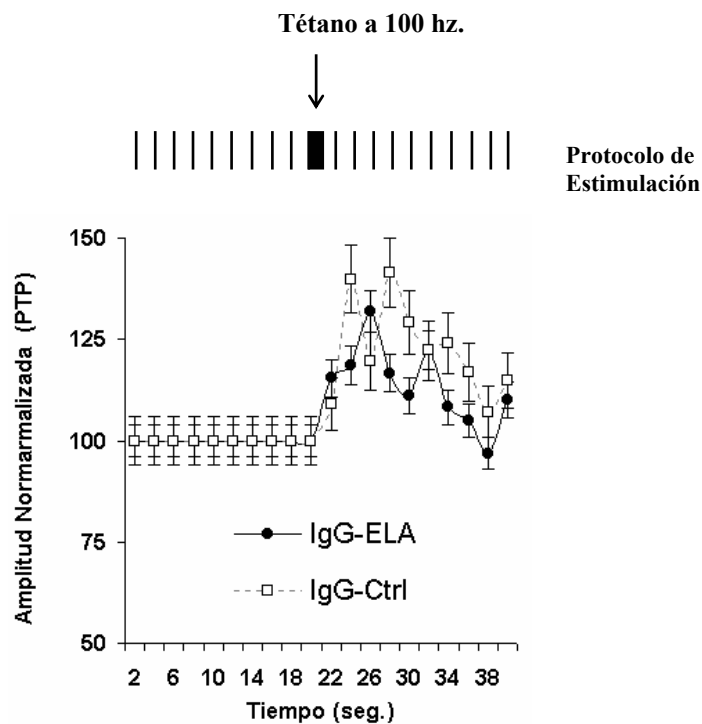


Fig. 13 Efecto de las IgG-ELA e IgG-Ctrl sobre la PTP.

La PTP fue evaluada utilizando un protocolo de estimulación de 10 EPPs a 0,5 hz. antes y después de un tren de 5 seg. a 100 hz.. El protocolo de estimulación se muestra en la parte superior de la figura. No se observaron diferencias en la PTP entre los tratamientos ELA y Ctrl ($P > 0,05$).

Evaluación del efecto de las IgG-ELA sobre la liberación asincrónica y retrasada a 1, 20 y 40 Hz de estimulación.

Tras la llegada de un potencial de acción a un terminal nervioso y la posterior entrada de Ca^{2+} se fusionan de forma sincronizada y simultánea un grupo de vesículas sinápticas que dan como resultado un único EPP (liberación sincrónica). Sin embargo, unas pocas vesículas se fusionan algunos ms después, dando como resultado la aparición de un número de potenciales miniatura semejantes a MEPPs (liberación asincrónica). Por otra parte tras la estimulación eléctrica la liberación de Ach de vesículas únicas se mantiene elevada durante unos minutos (liberación retrasada). Este fenómeno puede entenderse como un aumento de la frecuencia de MEPPs post estimulación.

Alteraciones en elementos presinápticos que participan o regulan la fusión de las vesículas sinápticas a la membrana presináptica (proteínas de la maquinaria de liberación y homeostasis de Ca^{2+}) pueden modificar la sincronidad de la fusión vesicular y como resultado aumentar la liberación asincrónica (Mochida S 1996 y J Physiol). Debido a que existe un número de evidencias indicando que las IgG-ELA afectan la homeostasis de Ca^{2+} (Engelhardt et al., 1995; 1997; Siklos et al., 1996), se estudió el efecto de éstas sobre la fusión vesicular asincrónica y retrasada evocada por estimulación eléctrica a distintas frecuencias de estimulación (1, 20 y 40 Hz.).

▪ **Liberación asincrónica y retrasada a 1 Hz de estimulación**

No se detectaron diferencias en la liberación asincrónica y retrasada entre los tratamientos IgG-ELA e IgG-Ctrl a 1 hz. de estimulación (Fig. 14). De forma sorprendente aquellas diferencias detectadas en la liberación espontánea (sin estimulación) entre IgG-ELA e IgG-Ctrl desaparecen en la liberación asincrónica y retrasada (Fig. 15).

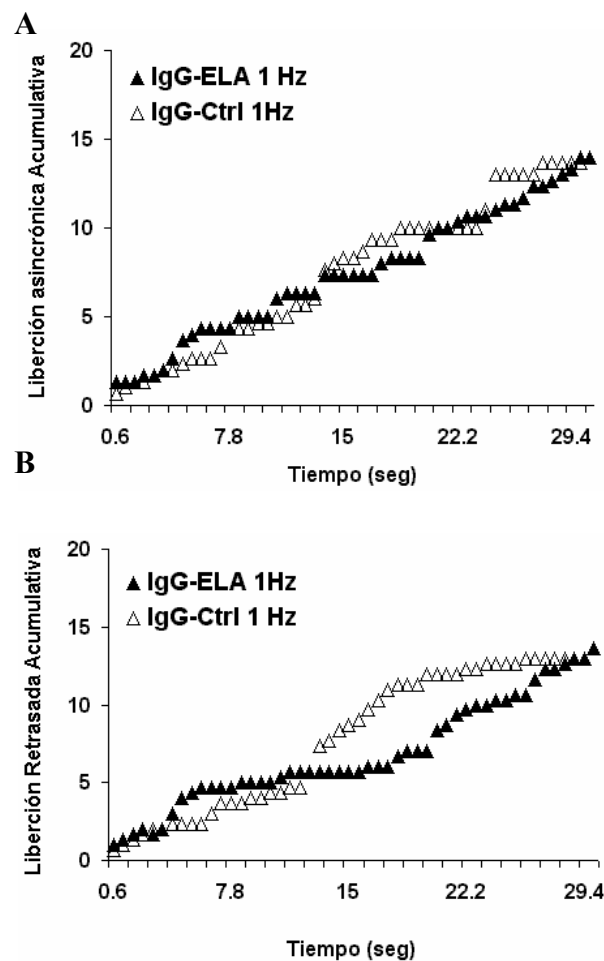


Fig. 14. IgG-ELA no altera la liberación de Ach liberada de forma asincrónica y retrasada a 1 hz. de estimulación. (A) Liberación asincrónica acumulativa durante la estimulación a 1Hz luego de incubar la preparación neuromuscular con IgG-ELA o IgG-Ctrl. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$). (B) Liberación retrasada acumulativa detectada luego de 100 estímulos a 1 hz. de estimulación para los tratamientos IgG-ELA e IgG-Ctrl ($P > 0.05$). Los valores de liberación representados con un triángulo corresponden a la cuantificación realizada sobre 600 ms del registro correspondiente.

Dado que en las condiciones control, (IgG-Ctrl o solución de registro sin IgG), la tasa de liberación durante la estimulación “asincrónica” y después de la estimulación “retrasada” es idéntica a la tasa de liberación espontánea en ausencia de estimulación, se podría considerar que existe una ausencia de liberación asincrónica y retrasada en la actividad sináptica evocada a 1 hz.

Sin embargo, la estimulación a 1 hz. parece inhibir o remover la ps-IgG-ELA observada sin estimulación (Fig. 14).

▪ **Liberación asincrónica a 20 y 40 hz. de estimulación**

Cuando se evaluó la liberación asincrónica inducida por un tren de estímulos a 20 o 40 hz. (durante 30 seg.), se observó un aumento significativo en el tratamiento control (IgG-Ctrl o sin IgG), en comparación con la liberación basa sin estimulación.

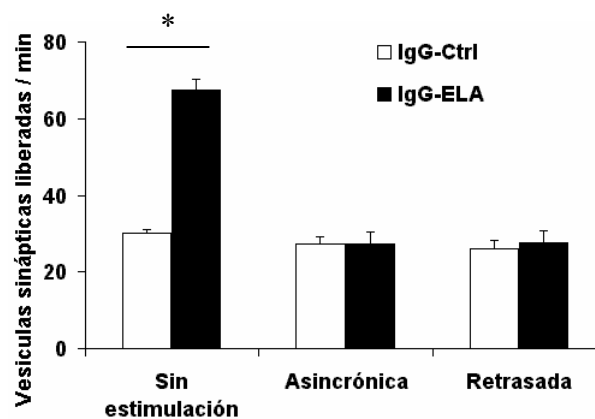


Fig. 15. Contraste entre el efecto de las IgG-ELA sobre distintos modos de liberación. Gráfico de barras mostrando la tasa de liberación espontanea (Sin estimulación), liberación asincrónica durante la estimulación a 1 hz. (Asincrónica) y la liberación luego de la estimulación a 1 hz. (Retrasada). Note la ausencia de diferencia entre los tratamientos durante y después de la estimulación. El asterisco indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

En el tratamiento control la liberación asincrónica aumentó 7 y 4 veces a 20 y 40 hz. respectivamente, mostrando una correlación negativa

entre la frecuencia de estimulación y la tasa de liberación asincrónica ($r = 0,92$) ($p < 0,01$) (Fig. 16 A y B).

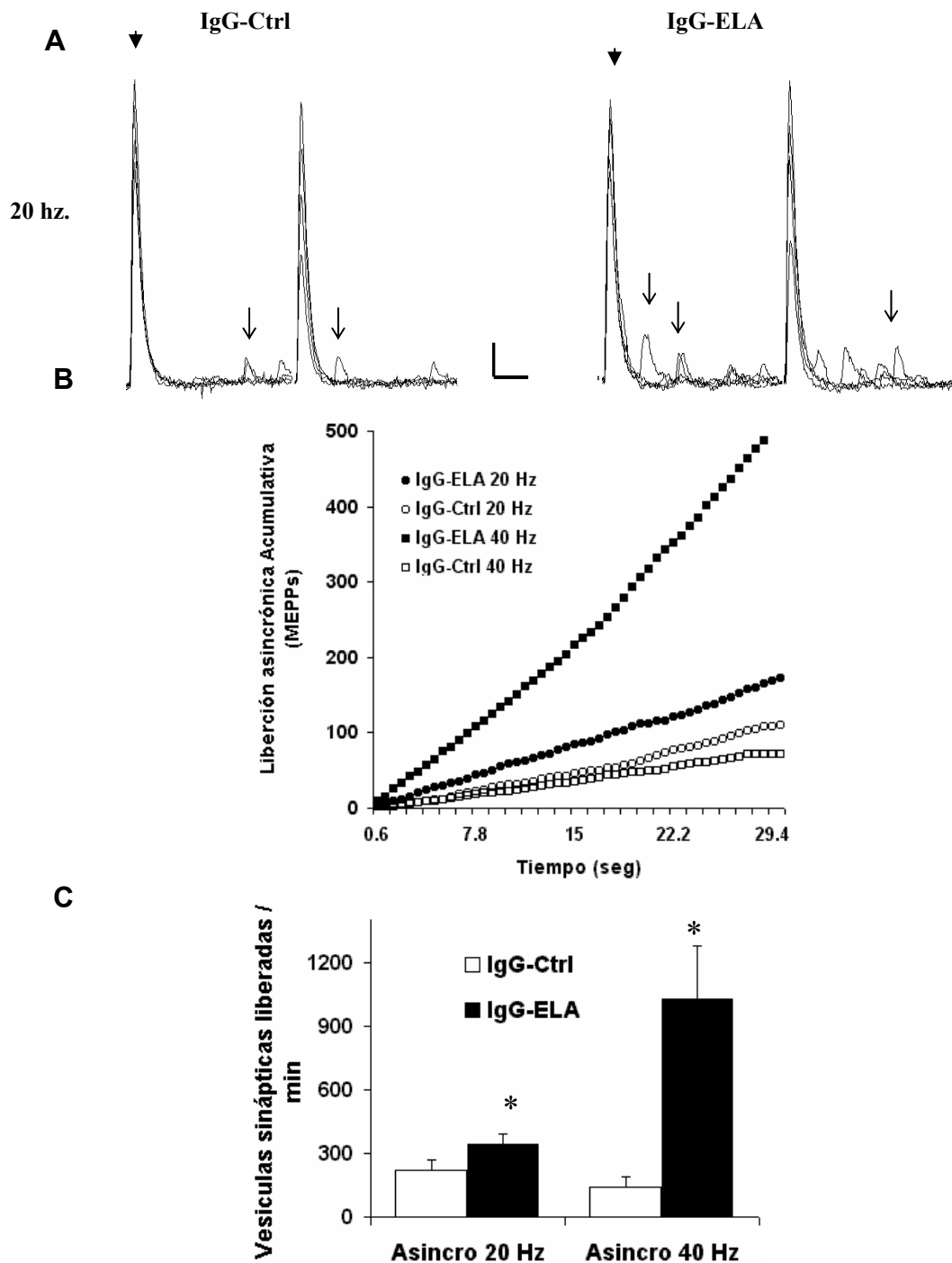


Fig. 16. Las IgG-ELA exaltan la liberación de ACh asincrónica a 20 y 40 hz. de estimulación. (A) Cuatro trazos representativos mostrando EPPs (▼) evocados por estimulación eléctrica a 20 hz. y los eventos asincrónicos indicados por una flecha. Note que en el tratamiento IgG-Ctrl la frecuencia de asincrónicos es menor que en el tratamiento IgG-ELA. El artefacto de estimulación no se muestra a fin de permitir una mejor visualización. La barra indica 0,5 mV y 2 ms. (B) Liberación asincrónica acumulativa durante la estimulación a 20 y 40 hz. después de la incubación con IgG-ELA o IgG-Ctrl. Se pueden observar diferencias significativas entre tratamientos a 20 y 40 hz. de estimulación ($P < 0.05$). (C) Gráfico de barras mostrando la tasa de liberación asincrónica a 20 y 40 hz. de

estimulación. En las figuras B y C los valores corresponden a la cuantificación realizada cada 600 ms de registro. Las diferencias entre tratamientos dentro de la correspondiente frecuencia de estimulación se señalan con asteriscos ($P < 0.05$).

Esta correlación indica que al aumentar la frecuencia de estimulación disminuye la liberación asincrónica asociada.

Al examinar la liberación asincrónica a 20 y 40 Hz., IgG-ELA exaltó este modo de liberación respecto de la liberación basal y respecto a la liberación control (IgG-Ctrl) a 20 y 40 Hz. de estimulación ($p < 0.01$) (Fig. 16 B y C). Este aumento en la liberación asincrónica fue de 12 y 33 veces a 20 y 40 Hz. respectivamente, en comparación con la liberación basal. De esta forma el tratamiento con IgG-ELA aumentó la liberación asincrónica respecto al control a las mismas frecuencias, e invirtió la relación entre la frecuencia de estimulación y la liberación asincrónica. El incremento en la liberación asincrónica inducido por las IgG-ELA fue dependiente del tiempo y la frecuencia de estimulación. Este aumento se pudo detectar ~ 5 segundo después que comenzó el tren de estimulación a 20 o 40 Hz. Es interesante notar que esta liberación “aberrante” de neurotransmisor no indujo una menor liberación sincrónica (EPPs) a ninguna de las frecuencias de estimulación estudiadas (Fig. 11). En resumen, estos resultados indicarían que las IgG-ELA exaltan uno o más mecanismos, distintos a los involucrados en la liberación sincrónica evocada.

▪ **Liberación retrasada a 20 y 40 hz. de estimulación**

El análisis de la liberación de Ach retrasada, después de un tren de 30 segundos a 20 y 40 hz., mostró que las IgG-ELA exaltan éste modo de liberación comparado con los registros control (Fig. 17 A y B).

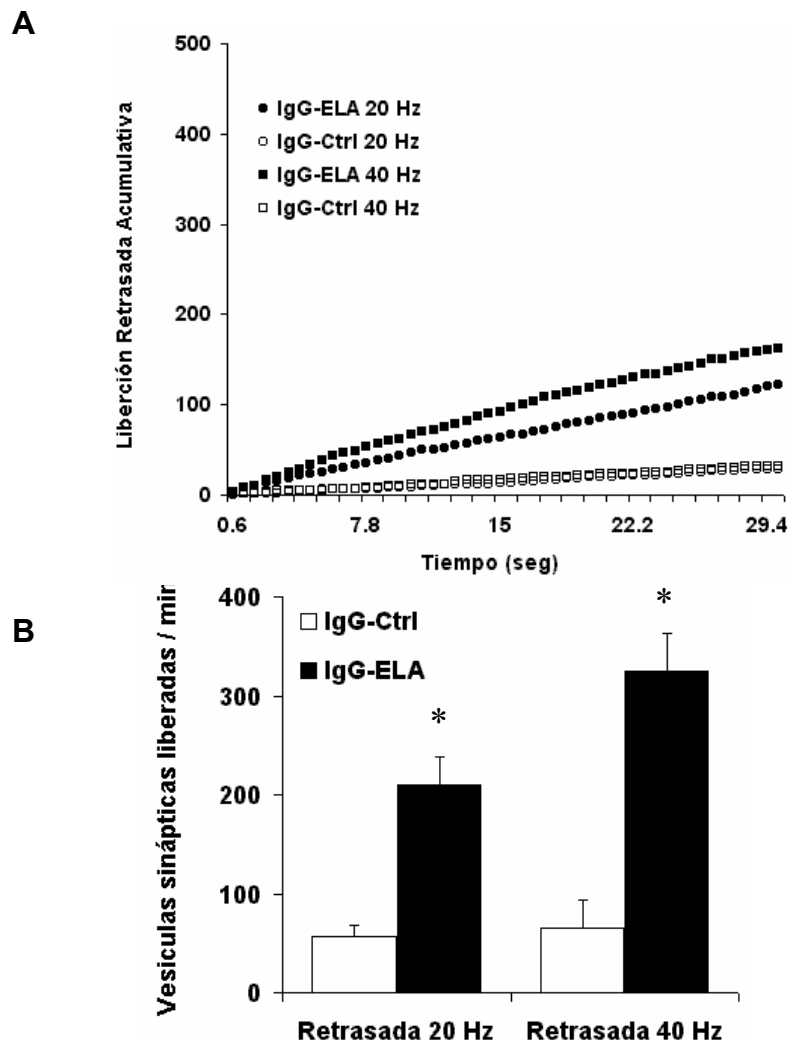


Fig. 17. IgG-ELA exalta la liberación de Ach retrasada post estimulación a 20 y 40 hz. de estimulación. (A) Liberación retrasada acumulativa luego de un tren de estimulación a 20 y 40 hz. entre tratamientos. Se pueden observar diferencias significativas entre tratamientos para las frecuencias estudiadas ($P < 0,05$). (B) Gráfico de barras mostrando la cuantificación de la tasa de liberación retrasada a 20 y 40 hz. de estimulación. Los valores en las figuras A y B corresponden a la cuantificación realizada cada 600 ms de registro. Las diferencias entre tratamientos dentro de la correspondiente frecuencia estimulación se señalan con asteriscos ($P < 0,05$).

Este aumento en la liberación se hace más evidente a medida que la tasa de liberación en el registro control comienza a disminuir, mientras

que la tasa de liberación retrasada en el tratamiento IgG-ELA continúa elevada. En los experimentos control la tasa de liberación retrasada alcanzó valores de reposo aproximadamente 1 a 1,5 minutos después que el tren de estímulos finalizó (Fig. 17). En suma las IgG-ELA son capaces de aumentar la liberación de neurotransmisor de forma asincrónica y retrasada a alta frecuencia de estimulación (20 y 40 Hz.), pero no a baja frecuencia (1 Hz.).

El fuerte efecto de las IgG-ELA sobre la transmisión sináptica espontánea y asincrónica sugiere que éstas IgG-ELA exaltan un mecanismo que se encontraría implicado en ambos modos de liberación.

Los resultados presentados más arriba sugerían fuertemente que las IgG-ELA estaban interaccionando con un componente molecular de la preparación neuromuscular. Así, éstos anticuerpos de forma directa o indirecta podrían modular varios modos de liberación de Ach. La inmunoreactividad contra componentes celulares de las motoneuronas ya fue sugerida por diversos investigadores. A este respecto resultan de interés los trabajos que dan evidencia acerca de una interacción entre las IgG-ELA y los CCDV, incluso canales no neuronales del músculo esquelético ($Ca_{v1.1}$, subunidad α_{1S}), y de esta forma podrían alterar las corrientes de calcio (Smith et al., 1992a; Delbono et al., 1993; Carter y Mynlieff, 2003). La interacción con un CCDV podría explicar tanto las alteraciones observadas en la transmisión sináptica como en la morfología de motoneuronas (Uchitel et al., 1988; Uchitel et al., 1992; Smith et al., 1992; Engelhardt et al., 1995; 1997; Siklos et al., 1996;

Pullen et al., 2000). Sin embargo, también se han presentado evidencias que sugieren una interacción de las IgG-ELA con el receptor γ del fragmento Fc (Fc γ R) de los anticuerpos, y este tipo de interacción también podría explicar fenómenos calcio dependientes (Mohamed et al., 2002).

Identificación de la inmunoreactividad de las IgG-ELA y localización de su antígeno

Para investigar si las IgG-ELA presentaban inmunoreactividad contra algún componente celular de la preparación neuromuscular y cual era la localización del antígeno, se utilizó a las IgG-ELA como anticuerpo primario en estudios de inmunofluorescencia por microscopía confocal.

Se realizaron experimentos de doble tinción sobre cortes transversales de músculo diafragma y soleus de rata y ratón, utilizando como anticuerpos primarios IgG-Ctrl o IgG-ELA. La distribución de estos anticuerpos sobre los cortes de tejido fue revelada con un segundo anticuerpo conjugado a fluoresceína (*visualización en verde*). Esta tinción se combinó con una segunda marcación directa por medio de la α -bungarotoxina conjugada a rodamina (*visualización en rojo*) (Fig.18).

La α -bungarotoxina permitió detectar los AchR e identificar la localización de la UNM en los cortes de los músculos. En las imágenes de inmunofluorescencia se observó que las IgG-ELA provenientes del ~ 50 % de los pacientes daban una señal fuerte y bien definida localizada en la región de la UNM (Fig. 18 B y E). Todas las IgG de individuos

control y el ~ 50 % de los restantes pacientes con ELA mostraron una tinción negativa (Fig. 18 A y D).

La señal fluorescente obtenida con IgG-ELA co-localizaban con el marcador de membrana presináptica (sinaptotagmina)(imagen no mostrada) y con el marcador postsináptico (AchR) en secciones ópticas de 2 μm (Fig. 18).

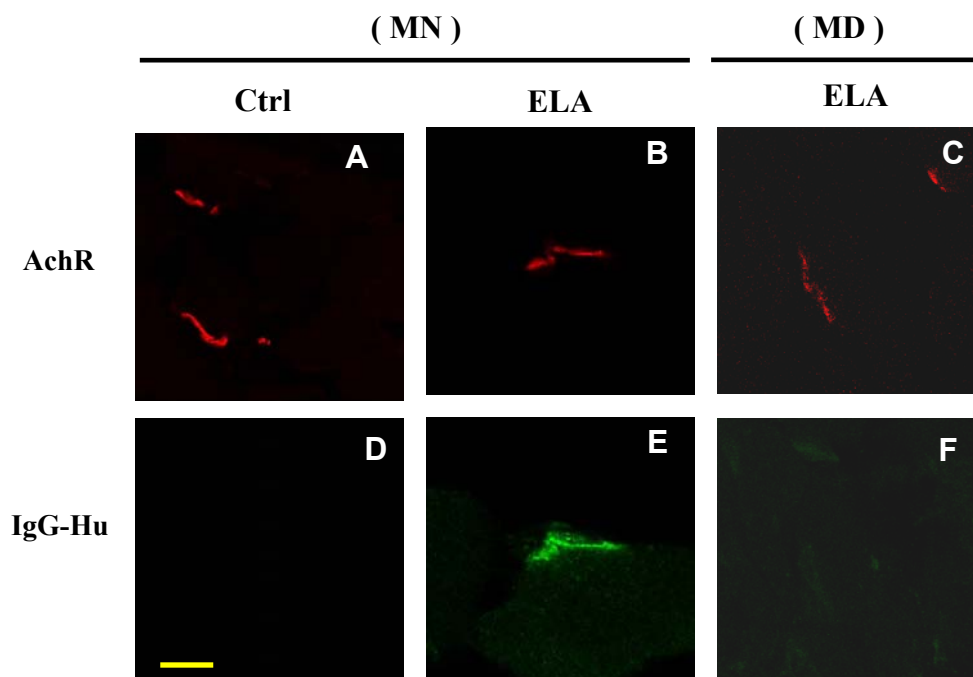


Fig. 18. Detección de inmunoreactividad de las IgG-ELA y localización del blanco molecular en terminales motores del músculo soleus de ratón.

Imágenes de microscopía confocal de doble marcación fluorescente mostrando AchR en rojo (A, B y C) e inmunofluorescencia utilizando como anticuerpo primario IgG humana (IgG-Hu) Ctrl o ELA sobre cortes transversales. Los AchR fueron identificados utilizando α -Bungarotoxina marcada con rodamina. La distribución de los anticuerpos inmunoreactivos se detectó utilizando un anticuerpo secundario marcado con fluoresceína. Las IgGs humanas utilizadas fueron IgG-Ctrl (D) e IgG-ELA, (E y F). La columna de imágenes de la izquierda y el centro se realizaron sobre músculos normales (MN) (A, B, D y E), mientras que las imágenes de la derecha fueron realizadas sobre músculos denervados (MD) (C y F). El experimento control muestra la localización de AchR (A) pero una inmunomarcación negativa (D). En el centro se observa la marcación para AchR (B) y una inmunomarcación positiva por medio de IgG-ELA (E) con una buena co-localización con los AchR. Las IgG-ELA sobre músculos denervados no mostraron inmunomarcación positiva (F) mientras que los AchR permanecieron en las sinapsis, indicando que el blanco para las IgG-ELA se localizaría en los terminales motores. La barra de escala equivale a 10 μm .

Es interesante notar que no se observó una inmunomarcación positiva en las fibras musculares con ninguno de los Ab utilizados (ELA o Ctrl),

indicando que no existiría inmunoreactividad contra los CCDV de tipo L como se sugirió previamente (Smith et al., 1992; Delbono et al., 1993).

Estos resultados muestran de forma directa que las IgG-ELA pueden interactuar con algún componente de la UNM (Fig. 18 B y E) y de esta manera modular la actividad sináptica (Fig. 7, 8, 9 y 16).

En este trabajo se estudió por doble marcación la inmunoreactividad de 13 IgG-ELA y 15 IgG-Ctrl. Las IgG de 6 pacientes con ELA (6 de 13) (46,15 %) mostraron una inmunomarcación positiva con una localización similar en la UNM. En otro paciente con ELA (1 de 13) se observó una inmunomarcación de baja intensidad en la UNM. Las IgG de otro paciente con ELA (1 de 13), si bien mostró inmunoreactividad negativa para la UNM, sus IgG daban una clara señal fluorescente localizada en los axones que recorren los espacios entre las fibras musculares. Los anticuerpos de los restantes pacientes con ELA (5 de 13) mostraron inmunoreactividad negativa en los cortes transversales de los músculos estudiados.

- *Diferenciación de la localización del blanco molecular para IgG-ELA entre las membranas pre o postsináptica*

Después de haber identificado que las IgG-ELA poseen inmunoreactividad contra la UNM, surge una pregunta clave: ¿Las IgG-ELA pueden modular la transmisión sináptica por una interacción directa con la membrana presináptica? ¿Por una interacción indirecta con la membrana postsináptica? ¿O por una interacción con ambas membranas? En otras palabras. ¿Dónde se localiza la molécula

antigénica para las IgG-ELA? ¿En la membrana presináptica, postsináptica o en ambas membranas? Después de la denervación de un músculo (como se explicó en el apartado de materiales y métodos) el nervio motor y todos sus terminales sinápticos degeneran, quedando la antigua UNM formada solamente por la membrana postsináptica y la célula de Schwann. El espacio que ocupaba el terminal motor es ocupado por tejido conectivo. De esta forma la técnica de denervación se puede utilizar para discriminar si una molécula en particular se localiza en el terminal nervioso o en los elementos sinápticos que permanecen después de la denervación.

A fin de determinar la localización del antígeno, se estudió la capacidad de las IgG-ELA con inmunoreactividad positiva en músculos normales, para dar una tinción positiva sobre cortes transversales de músculos denervados de ratón.

Los estudios de doble marcación fluorescente mostraron una marcación positiva en la UNM para los AchR (Fig. 18 C), pero no se observó inmunomarcación positiva cuando se utilizó como anticuerpos primarios IgG-ELA (Fig. 18 F) o anticuerpos anti-sinaptotagmina (imagen no mostrada). La tinción negativa para el anticuerpo anti-sinaptotagmina confirma que la denervación fue efectiva.

Estos resultados indicarían que la molécula antigénica de las IgG-ELA estaría localizada en terminales motores, sugiriendo que las IgG-ELA podrían modular la transmisión sináptica por interacción directa con la membrana presináptica. Este hallazgo proporciona la mejor evidencia

hasta la fecha acerca de una interacción antígeno-anticuerpo entre las IgG-ELA y una molécula antigénica localizada en terminales motores.

Análisis de la correlación entre la inmunoreactividad de las IgG-ELA y la capacidad moduladora sobre sinapsis neuromusculares

En los experimentos anteriores se obtuvo evidencia que indica que las IgG-ELA (~50 %) poseen la capacidad de modular la transmisión sináptica en la UNM y que presentaban inmunoreactividad positiva contra terminales motores, mientras que un grupo de pacientes con ELA (~50 %) y las IgG de todos los individuos control no mostraron estas características. Sin embargo, podría considerarse que estas características (capacidad moduladora e inmunoreactividad positiva) son características independientes. A fin de investigar esta hipótesis, se cuantificó y analizó la correlación entre la capacidad moduladora y la inmunoreactividad de las IgG de 8 pacientes con ELA. Se utilizaron 4 IgG-ELA con inmunoreactividad positivas y 4 IgG-ELA con inmunoreactividad negativa.

Las IgG-ELA con inmunoreactividad negativa no mostraron capacidad moduladora sobre la transmisión sináptica espontánea de la UNM del músculo diafragma. La figura 19 muestra las medias para los valores de ps-IgG-ELA e intensidades de señales fluorescentes registradas en experimentos de inmunofluorescencia. Se utilizó la señal fluorescente

como variable independiente y los valores de ps-IgG-ELA como variable dependiente para estimar la correlación. Este análisis revela una correlación positiva significativa entre las variables analizadas ($r= 0,96$).

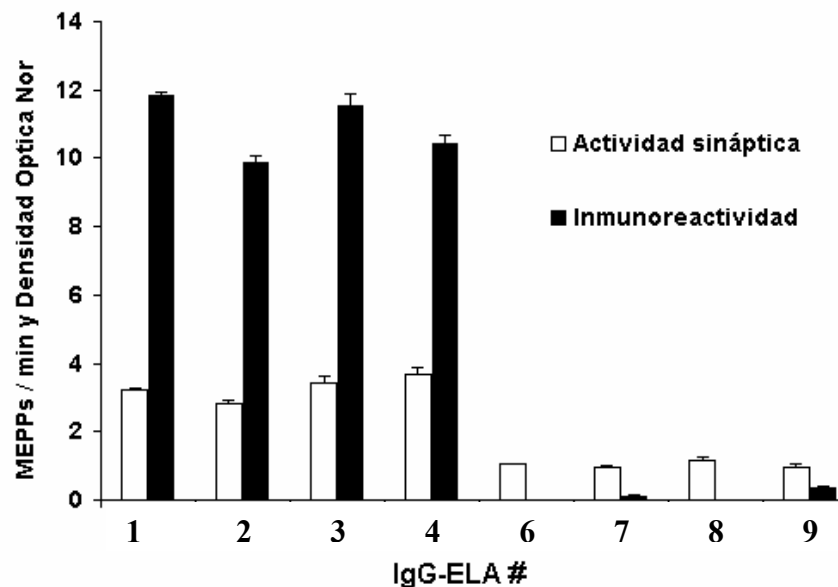


Fig. 19. Correlación entre inmunoreactividad de las IgG-ELA y la ps-IgG-ELA.

El gráfico muestra valores de frecuencia de MEPPs normalizados al control como se mostró en la Fig. 1 y valores de densidad óptica (DO) normalizada a 100 unidades de DO después de restar la fluorescencia inespecífica. Los números en el eje X representan distintas IgG-ELA con inmunoreactividad positiva (1, 2, 3 y 4) y negativa (6, 7, 8 y 9). Note que las IgG-ELA con inmunoreactividad son capaces de incrementar la actividad sináptica, mientras que las IgG-ELA sin inmunoreactividad no modifican la actividad sináptica.

Este análisis apoya la hipótesis que las IgG-ELA podrían inducir modulación sináptica mediante una interacción antígeno-anticuerpo con un antígeno localizado en terminales motores.

De esta forma utilizando estudios fisiológicos y morfológicos podemos identificar dos poblaciones diferentes de pacientes con ELA. Llamaremos al grupo con inmunoreactividad positiva, ELA inmuno-asociada, y al grupo que no presentan inmunoreactividad, ELA idiopática. Si bien los pacientes de estos grupos pudieron ser

distinguidos con técnicas inmunológicas o electrofisiológicas, no logramos identificar características clínicas que los diferencien.

Evaluación de los Mecanismos que participan en la modulación sináptica mediada por las IgG-ELA

Por primera vez hemos podido identificar que las IgG de pacientes con ELA *per se* son capaces de interactuar con al menos una molécula de terminales motores y ejercer un efecto regulatorio en la transmisión sináptica. Sin embargo, los mecanismos que participan en la modulación sináptica mediada por las IgG-ELA no se han estudiado. Para responder a la pregunta ¿Cuáles son los mecanismos de señalización involucrados en la modulación sináptica mediada por las IgG-ELA? Se debió hacer una serie de consideraciones que afectan al diseño experimental.

Las IgG-ELA mostraron un fuerte efecto regulatorio sobre la frecuencia de MEPPs, ya sea como:

- ✓ Eventos espontáneos sin estimulación.
- ✓ Eventos asincrónicos durante la estimulación.
- ✓ Eventos retrasados después de la estimulación.

Al mismo tiempo es de importancia recordar que los experimentos en donde se utiliza estimulación eléctrica se llevan a cabo en condiciones de bajo $[Ca^{2+}]$ alto $[Mg^{2+}]$ a fin de obtener respuesta postsináptica (EPPs) que puedan cuantificarse. Esto es debido a que las corrientes inducidas por cada cuanto de Ach muestran una sumación lineal cuando el

número de cuantos liberados generan EPPs con una amplitud menor a 10 mV. Además, en los experimentos con estimulación eléctrica es necesario utilizar agentes que eviten la contracción muscular como la μ -conotoxina GIIIB. Como consecuencia de lo expuesto mas arriba, se decidió examinar cuales son las vías de señalización involucradas en la modulación que ejercen las IgG-ELA en la transmisión sináptica espontánea. Esto permitió evitar condiciones iónicas o farmacológicas que podrían dar interacciones no deseadas y consecuentemente interpretaciones erróneas acerca de los mecanismos involucrados en la ps-IgG-ELA.

Evaluación de la Participación del complejo de Complemento en la ps-IgG-ELA

Para investigar los mecanismos involucrados en la ps-IgG-ELA, se comenzó examinando si las IgG-ELA actuaban a través de la activación del complejo de complemento. Previamente se mostró que los Ab de una subpoblación de pacientes con Guillem Barre (síndrome de Fisher Miller) podían interactuar con antígenos de la UNM e iniciar la activación del complejo de complemento y consecuentemente producir una alta tasa de liberación de Ach (Willison et al. 2002).

Con el fin de evaluar la participación de complemento en la ps-IgG-ELA, se estudió si el agregado de complemento (Cp) exaltaba la ps-IgG-ELA en dos condiciones experimentales: 1- Agregando Cp en el momento en que debía observarse la ps-IgG-ELA y 2- Agregando Cp después de

observar la ps-IgG-ELA. Se utilizó suero normal humano como fuente de complemento y como control negativo, suero normal humano con complemento inactivo como se indica en la metodología (Bullens et al., 2002).

El agregado de complemento en las condiciones 1 y 2 no exaltaron la ps-IgG-ELA. Sin embargo, tanto el suero con y sin complemento llevó a una reducción de la frecuencia de MEPPs.

Por otro lado, se estudió la capacidad de las IgG-ELA para modular la actividad sináptica utilizando una fracción de IgG-ELA que fue previamente tratar para la inactivación el complemento. Sin embargo la inactivación del Cp no afectó el efecto de las IgG-ELA.

Estos resultados indican que las IgG-ELA no poseen la capacidad de activar el complejo de complemento y en consecuencia no estarían modulando la actividad sináptica a través de éste mecanismo.

Estudio del requerimiento de calcio extracelular para la ps-IgG-ELA

Se analizó si el efecto de las IgG-ELA requería la entrada de Ca^{2+} por medio de la utilización de bloqueantes específicos para los CCDV. Los bloqueantes para CCDV de tipo L y tipo P/Q (Nitrendipina 10 μ M y ω -Agatoxina IVA 100 nM respectivamente) no fueron capaces de prevenir la ps-IgG-ELA cuando se los utilizaron por separado o en forma conjunta (Fig. 20 A). Por el contrario, el bloqueante de CCDV de tipo N, ω -conotoxina GVIA (GVIA) (1 μ M) impidió completamente la ps-IgG-ELA (Fig. 14 A). Por otra parte en terminales cargados con el quelante de Ca^{2+}

(BAPTA-AM 10 μ M) las IgG-ELA no mostraron el efecto modulador sobre la transmisión sináptica (Fig. 20 A).

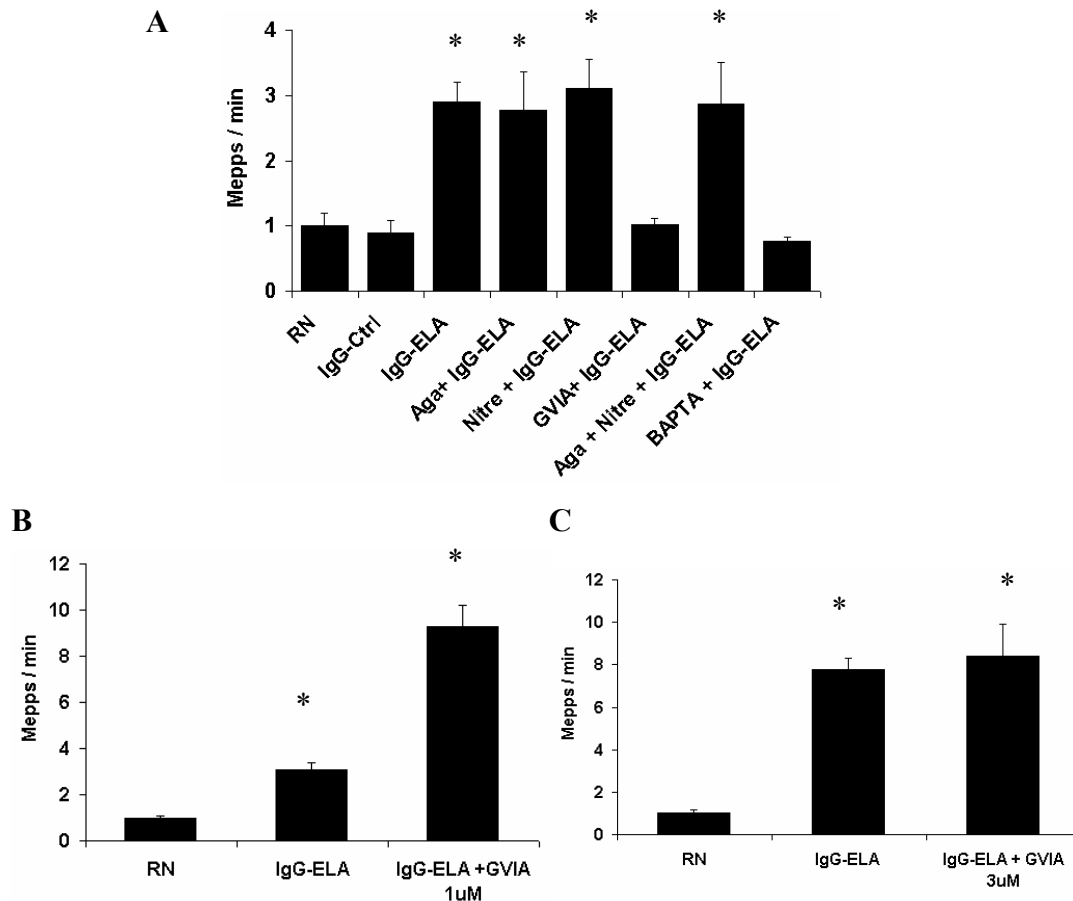


Fig. 20. La ps-IgG-ELA requiere influjo de calcio extra-celular a través del CCDV de tipo N.

Gráfico de barras mostrando la frecuencia de MEPPs normalizada al control después de distintos tratamientos. (A) El bloqueante del CCDV tipo P/Q o tipo L no evitó la ps-IgG-ELA (Aga+IgG-ELA y Nitre+IgG-ELA respectivamente), incluso cuando se usaron simultáneamente (Aga + Nitre+IgG-ELA). Sin embargo, el bloqueante del CCDV tipo N inhibió completamente el efecto de las IgG-ELA (GVIA+IgG-ELA). Se utilizó ω -Agatoxina IVA (100 nM), Nitrendipina (10 μ M), y ω -conotoxina GVIA (1 μ M) para bloquear los CCDV tipo P/Q, L y N respectivamente.

[B y C] Las mediciones de actividad sináptica se realizaron consecutivamente en solución normal de registro (RN), después de la incubación con IgG-ELA (IgG-ELA), y después de agregar ω -conotoxina GVIA (IgG-ELA +GVIA). En (B) se evaluó si era necesario un influjo permanente de Ca^{2+} a través del CCDV tipo N y en (C) y existía una interacción competitiva entre el anticuerpo y el bloqueante.

Para investigar si la ps-IgG-ELA requería un influjo constante de Ca^{2+} a través del CCDV tipo N ($Ca_{v2.2}$), se bloqueó este canal una vez que se observó la ps-IgG-ELA utilizando el mismo bloqueante y a la misma concentración (GVIA 1 μ M). Sorprendentemente la GVIA fue incapaz de

revertir el efecto de las IgG-ELA a una frecuencia normal de MEPPs (Fig. 20).

Debido a que este resultado puede ser explicado por una interacción competitiva entre GVIA y las IgG-ELA, se evaluó esta hipótesis por medio de experimentos de competencia entre la toxina GVIA y las IgG-ELA. Para estos experimentos se incubó la preparación neuromuscular con IgG-ELA hasta observar la ps-IgG-ELA y luego se le agregó al a la solución de registro el bloqueante del canal $Ca_{v2.2}$ en alta concentración (3 μ M). Una vez más la GVIA no logró revertir el efecto de las IgG-ELA (Fig. 20 C).

Luego se considero que la incapacidad de la GVIA para revertir el efecto de las IgG-ELA podría ser debida a que estos anticuerpos estarían induciendo un cambio en la conformación del canal $Ca_{v2.2}$ y de esta forma el bloqueante (GVIA) no podría interaccionar y bloquear el canal de calcio $Ca_{v2.2}$. De forma similar cuando la toxina GVIA bloquea al canal $Ca_{v2.2}$, tampoco permitiría la interacción del anticuerpo con el canal de calcio $Ca_{v2.2}$ y de esta forma se estarían excluyendo mutuamente por interacción no-competitiva.

Para examinar esta hipótesis se trataron durante 1 hora tres músculos diafragma con GVIA, y otros tres músculos con el vehículo de la GVIA. Luego estos seis músculos fueron fijados con PFA 4 %, a fin de fijar la toxina al sitio de interacción con el canal $Ca_{v2.2}$. A continuación estos músculos fueron procesados para realizar experimentos de inmunofluorescencia utilizando IgG-ELA con inmunoreactividad como anticuerpo primario. El análisis de las señales fluorescentes tomadas de

los músculos pretratados con GVIA o vehículo no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$). El resultado de estos experimentos indica una ausencia de interacción no-competitiva entre el bloqueante GVIA y las IgG-ELA.

De este modo, los resultados de los experimentos de interacción competitiva y no-competitiva, sugieren que la entrada de Ca^{2+} a través del canal $\text{Ca}_{v2.2}$ sería necesaria sólo para iniciar la ps-IgG-ELA. Para confirmar esta interpretación y descartar la entrada de Ca^{2+} a través de otros CCDV se intentó utilizar un potente bloqueante de los CCDV presentes en el terminal motor.

Los cationes divalentes Cd^{2+} , Co^{2+} , y Ni^{2+} se han utilizado ampliamente como bloqueantes inespecíficos de los CCDV. De esta forma se buscó una concentración y combinación de cationes divalentes con una gran capacidad para bloquear los CCDV. Para definir como utilizar los cationes divalentes se estimuló la preparación neuromuscular con 10 mM de K^+ hasta observar una robusta liberación de neurotransmisor y luego en experimentos independientes se agregó Co^{2+} , Ni^{2+} o ambos cationes en forma conjunta a distintas concentraciones. De esta forma se identificó que una combinación de Co^{2+} (300 μM) y Ni^{2+} (300 μM) bloquea la liberación inducida por 10 mM de K^+ . Luego se estudió si una combinación de Co^{2+} (300 μM) y Ni^{2+} (300 μM) podía revertir la ps-IgG-ELA a una frecuencia normal de liberación espontánea. La mezcla de Co^{2+} y Ni^{2+} no fue capaz de revertir la ps-IgG-ELA.

Esta serie de experimentos utilizando bloqueantes específicos, inespecíficos e inmunofluorescencia en músculos pretratados con GVIA,

no muestran la existencia de interacción competitiva o no-competitiva entre la toxina GVIA y las IgG-ELA. A su vez, estos estudios fisiológicos y moleculares, en conjunto dan evidencia que las IgG-ELA no estarían interaccionando con el CCDV $Ca_{v2.2}$ y que la ps-IgG-ELA sólo requiere una señal de calcio a través de este canal para iniciar la potenciación sináptica, y no un influjo constante a través de éste.

De manera adicional, estos resultados muestran que de alguna forma las señales de calcio a través del canal $Ca_{v2.2}$ pueden regular la transmisión sináptica espontánea en sinapsis neuromusculares de ratón (Protti et al., 1991).

Evaluación de la participación de vías de señalización intracelulares en la ps-IgG-ELA

Los resultados presentados mas arriba dan evidencia que en la ps-IgG-ELA se requiere del influjo de calcio extracelular a través del canal $Ca_{v2.2}$, pero el hecho de que la potenciación sináptica se vuelve independiente del influjo de Ca^{2+} extracelular también sugiere que una vez iniciada la potenciación sináptica se activarían vías de señalización intracelulares. Para poner a prueba esta hipótesis se estudiaron varias vías de señalización que podrían estar involucradas en la ps-IgG-ELA.

Las vías de señalización mejor caracterizadas y que podrían conducir a potenciación sináptica son aquellas que involucran la movilización de Ca^{2+} intracelular, pero también aquellas que llevan a la activación de CCDV.

La movilización de Ca^{2+} intracelular tiene lugar por medio de la liberación de calcio desde los reservorios intracelulares a través de receptores de 1,4,5-inositol trifosfato (IP3R) y receptores sensible a ryanodina y cafeína (RyR). La activación de CCDV que podría llevar a potenciación sináptica está mediada por la proteína quinasa PKC y PKA (Berridge et al., 2003; Arenson y Evans, 2001).

Debido a que IP3R y PKC pueden encontrarse bajo control regulatorio de fosfolipasa C (PLC), se comenzó analizando si la inhibición de PLC por medio del inhibidor específico U73122 (10 μM) afectaba la ps-IgG-ELA.

La inhibición de PLC impidió, pero no revirtió la ps-IgG-ELA (Fig. 21 A). Una vez que PLC fue activada, ésta puede hidrolizar 4,5-bifosfato (PI2P) y generar los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). Estos segundos mensajeros, DAG e IP3, en presencia de Ca^{2+} pueden activar PKC e IP3R respectivamente y promover potenciación sináptica (Berridge et al. 2003).

Para definir la contribución de PKC e IP3R se evaluó si la inhibición de estas vías de señalización afectaba la ps-IgG-ELA. La inhibición de PKC por medio de H7 (100 μM), un inhibidor específico de serina/treonina quinasas, no impidió que las IgG-ELA iniciara su efecto modulador sobre la actividad sináptica (Fig. 21 A). Por el contrario, el bloqueo de los receptores de IP3, por medio de su antagonista 2-APB (20 μM) inhibió la ps-IgG-ELA. Sin embargo el antagonista de IP3R no fue capaz de revertir el efecto de las IgG-ELA (Fig. 21 A).

En la UNM de la rana, se ha identificado la entrada de calcio a través de CCDV y la consecuente liberación de calcio intracelular mediada por RyR (Narita et al. 2000), como se describe en introducción.

La ryanodina a altas concentraciones (10 – 100 μ M) funciona como un antagonista de los RyR, mientras que a bajas concentraciones (10 – 100 nM) puede funcionar como agonista.

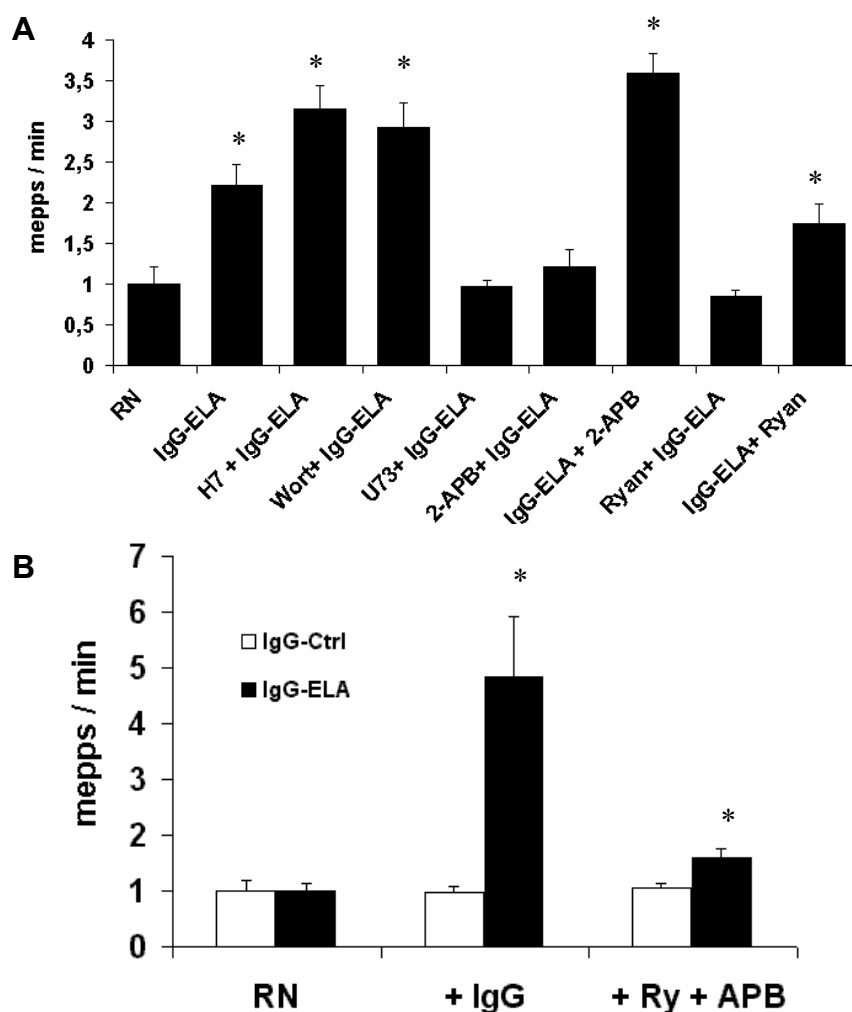


Fig. 21. En la potenciación sináptica dependiente de IgG-ELA participan PLC, IP3R y RyR.

(A) Cuantificación de la transmisión sináptica espontánea en solución de registro (RN), luego de la incubación con IgG-ELA, y el efecto de la inhibición de algunas vías de señalización intracelular. La inhibición de PKC y PKA por medio de H7 (100 μ M) (H7+ IgG-ELA) o de la PI3-K por medio de la wortmanina (1 μ M) (Wort+ IgG-ELA) no evitó la modulación sináptica mediada por las IgG-ELA. Sin embargo, la inhibición de PLC, RyR e IP3R por medio de sus respectivos inhibidores específicos (U73122 10 μ M) (U73+IgG-ELA), (ryanodina 20 μ M) (Ry+IgG-ELA) y (2-APB 20 μ M) (APB+IgG-ELA), evitó que las IgG-ELA puedan modular la transmisión sináptica. (B) Gráfico de barras representando la actividad sináptica medida secuencialmente en 3 condiciones; 1° solución normal (RN),

2° luego de aplicar las IgG-ELA o IgG-Ctrl (+ IgG) y 3° luego del agregado de los inhibidores de RyR e IP3R (+Ry/APB) simultáneamente, pero después de iniciada la modulación sináptica. Luego de agregar las IgG la transmisión sináptica aumentó, pero la aplicación simultánea de los inhibidores revirtió la actividad sináptica a valores casi normales. Esto sugiere que ambos tipos de receptores participan en la iniciación y mantenimiento de la modulación sináptica mediada por las IgG-ELA. El número de sinapsis estudiadas para estos experimentos se muestra en el anexo I. Asteriscos indican diferencias significativas respecto a la actividad sináptica normal ($P < 0,05$).

Para examinar la participación de los RyR en la ps-IgG-ELA se evaluó cual era el efecto de la ryanodina a alta concentración ($20 \mu\text{M}$) antes y después de observar el efecto de las IgG-ELA.

Nuevamente, de forma similar a la inhibición de IP3R, la ryanodina fue capaz de prevenir la potenciación sináptica, pero no permitió revertir la ps-IgG-ELA una vez establecida (Fig. 21 A). Sin embargo, la magnitud de la ps-IgG-ELA después de aplicar la ryanodina ($2,29 \pm 0,08$) comparada con la ps-IgG-ELA sin ryanodina ($3,95 \pm 0,42$) sugiere que el agregado de ryanodina una vez se inició la potenciación, previene una potenciación sináptica completa (Fig. 21).

Sin embargo, se pudo revertir el efecto de las IgG-ELA cuando se inhibió los IP3R y RyR simultáneamente (Fig. 21 B). Independientemente de la IgG-ELA utilizada, la reversión de la potenciación sináptica fue completa en 41.7 % de los experimentos (5 de 12), y mostró en promedio una reversión del 92,5 %. La magnitud de la reversión correlacionó negativamente con la magnitud del aumento en la potenciación alcanzado.

La prevención del efecto de las IgG-ELA por medio de la inhibición de los RyR o IP3R, muestran que ambos tipos de receptores se encuentran son necesarios para la iniciación de la potenciación sináptica. Mientras que la reversión por medio de la inhibición de ambos receptores

indicaría que ambos receptores se encuentran involucrados simultáneamente en el mantenimiento de la ps-IgG-ELA.

El análisis de los efectos de los inhibidores de RyR e IP3R muestra que si bien éstos inhibidores, individualmente son incapaces de revertir la ps-IgG-ELA, no permiten una potenciación completa. Es interesante recordar que la activación de PLC se identificó como un paso crítico en la activación de la ps-IgG-ELA. Esto sugiere que de alguna forma las IgG-ELA pueden inducir la activación de PLC, ya sea a través de un receptor de membrana (receptores acoplados a proteína G o receptores de factores tróficos) o algún otro mecanismo no conocido. Junto con la activación de PLC, se puede activar la vía de la quinasa 3 de fosfoinosítidos (PI3-K) (Gordon y Gordon 2003), y ésta quinasa puede participar tanto en la potenciación sináptica inducida por el factor neurotrófico NT4 (Yang et al., 2001) como en la modulación de la transmisión sináptica por medio de la producción de 3,4,5-inositol trifosfato (Schiavo et al 1996).

Debido a esta potencial conexión entre PI3-K y PLC, y ésta última con la ps-IgG-ELA, se estudio la participación de PI3-K en la capacidad moduladora de las IgG-ELA. Ni el inhibidor específico de PI3-K, wortmanina (1 μ M), ni su forma sintética LY244002 (5 μ M), que es más estable en solución, fueron capaces de inhibir la ps-IgG-ELA (Fig. 21 A). Sin embargo, en los experimentos control donde se evaluaba si las drogas utilizadas tenían algún efecto por si sola, LY244002 mostró un aumento en la actividad sináptica espontánea, consistente con trabajos previos (Rizzoli y Betz, 2002).

Estos resultados proveen evidencia fisiológica acerca de un acoplamiento funcional entre el canal $Ca_{v2.2}$, PLC, IP3R y RyR en sinapsis neuromusculares. La participación de esta vía de señalización fue estudiada utilizando anticuerpos purificados a partir del suero de cuatro pacientes con ELA que mostraban inmunoreactividad positiva contra la UNM. Los valores medios de actividad sináptica para los tratamientos más relevantes en la vía de señalización se resumen en la tabla 4 A y B.

Tabla 4. Las IgG-ELA provenientes de distintos pacientes modulan la transmisión sináptica por mecanismos similares.

La tabla muestra valores medios y error estándar correspondiente a la actividad sináptica de al menos 30 sinapsis de 3 animales distintos después de los tratamientos que se describen mas abajo. La actividad sináptica se expresa como MEPPs/min normalizada a la frecuencia control. Se evaluó los mecanismos de señalización para los anticuerpos purificados de 4 pacientes, diferenciados por los números 1, 2, 3 y 4. Todos los valores corresponden a la actividad sináptica luego de 4 horas de incubación. Los asteriscos representan valores distintos a valor control, ($p < 0,05$).

(A) Tratamientos: Solución normal de registro (RN), IgG-ELA (IgG), bloqueo del CCDV Cav2.2 y luego agregado de las IgG-ELA (GVIA + IgG), inhibición de PLC y agregado de las IgG-ELA (U73 + IgG), bloqueo de RyR y agregado de las IgG-ELA (Ryan + IgG), bloqueo de IP3R y agregado de las IgG-ELA (APB+ IgG).

(B)

Actividad sináptica luego de la inducción de la ps-IgG-ELA y posterior bloqueo del CCDV Cav2.2 (+ GVIA), o inhibición de RyR (+ Ryan) o IP3R (+ APB), o ambos receptores simultáneamente (+ Ryan/APB).

(A)	IgG-ELA N°	RN	IgG	GVIA + IgG	U73 + IgG	Ryan + IgG	APB + IgG
	1	1/0.16	3.11/0.39	0.88/0.21	1.05/0.11	0.83/0.16	1.17/0.28
	2	1/0.09	2.34/0.32	0.77/0.14	1.17/0.09	1.11/0.14	1.20/0.04
	3	1/0.07	2.79/0.43	1.07/0.07	0.84/0.08	0.97/0.03	1.04/0.09
	4	1/0.08	3.55/0.98	1.15/0.06	1.06/0.05	0.95/0.07	1.13/0.06

(B)	IgG-ELA N°	Actividad sináptica luego de la ps-IgG-ELA y posterior agregado de los antagonistas			
		+ GVIA	+ Ryan	+ APB	+ Ryan/APB
	1	3.02/0.22	2.18/0.02	3.06/0.04	1.28/0.11
	2	2.86/0.18	2.38/0.04	3.86/0.25	1.27/0.06
	3	5.34/1.81	2.24/0.13	2.11/0.08	1.16/0.04
	4	3.31/0.46	2.37/0.13	2.34/0.09	1.16/0.02

Evidencias que sugieren que los anticuerpos que modulan la transmisión sináptica no son una consecuencia de la Patología

Se reportó previamente la presencia de distintos autoanticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos en suero de pacientes con ELA (anti-GM1, anti-CCDV, anti-NF). Una posibilidad es que estos Ab pueden ser un subproducto de la patología debido a una gran alteración del sistema inmunológico a causa de los procesos inflamatorios y la muerte de motoneuronas (Drachman, 2000). Esta hipótesis implica que los autoanticuerpos son consecuencia y no la causa de la patología. No obstante la hipótesis predice que los Ab generados deberían ser inmunoreactivos contra una amplia variedad de moléculas, pero no contra componentes neuronales con una específica localización como se detectó en este trabajo (Fig. 18).

A fin de hallar evidencias que permitan distinguir si las IgG-ELA son causa o consecuencia de la patología, se evaluó si las IgG purificadas de pacientes con ELAf (IgG-ELAf) muestran inmunoreactividad y capacidad moduladora en la UNM del músculo diafragma de ratón.

Los pacientes con ELAf muestran las mismas características clínicas y procesos inflamatorios que los pacientes con ELA esporádica, pero una probable etiología hereditaria (Jafari-Schluep et al., 2004).

Las IgG-ELAf en músculo diafragma de ratón no mostraron capacidad para modular la transmisión sináptica espontánea, incluso cuando se utilizó concentraciones de anticuerpos extremadamente altas (6 mg/ml) y con una incubación prolongada (7 hs.).

Además, experimentos de inmunofluorescencia utilizando IgG-ELAf como anticuerpo primario no mostró inmunomarcación en UNM, axones o fibras musculares en cortes transversales de los músculos diafragma y soleus.

A favor de estos resultados, ya se había observado que un grupo de IgG-ELA esporádica no mostró capacidad de modular la transmisión sináptica, o inmunoreactividad contra la UNM.

Mecanismo hipotético de la inducción de la potenciación sináptica mediada por anticuerpos.

Los resultados presentados más arriba indican que las IgG-ELA, mediante una interacción antígeno anticuerpo, inducen potenciación sináptica a través de la participación del CCDV Cav2.2, PLC, y a su vez la activación de IP3R y RyR. Por otro lado, debido a que nuestros resultados, así como evidencia presentada previamente indican que las IgG-ELA no interaccionan con los CCDV, nosotros asumimos que la ps-IgG-ELA requiere Ca^{2+} extracelular pero también que los anticuerpos estarían activando PLC a través de un receptor de membrana. Entre los potenciales sitios blancos de los anticuerpos podemos encontrar aquellos que activan PLC (receptores acoplados a proteína G o receptores de tirosina quinasas).

De esta forma, la generación de IP3 y el influjo de Ca^{2+} a través de CCDV tipo Cav2.2, promueven la activación de IP3R y RyR y la subsiguiente potenciación sináptica (Fig. 22).

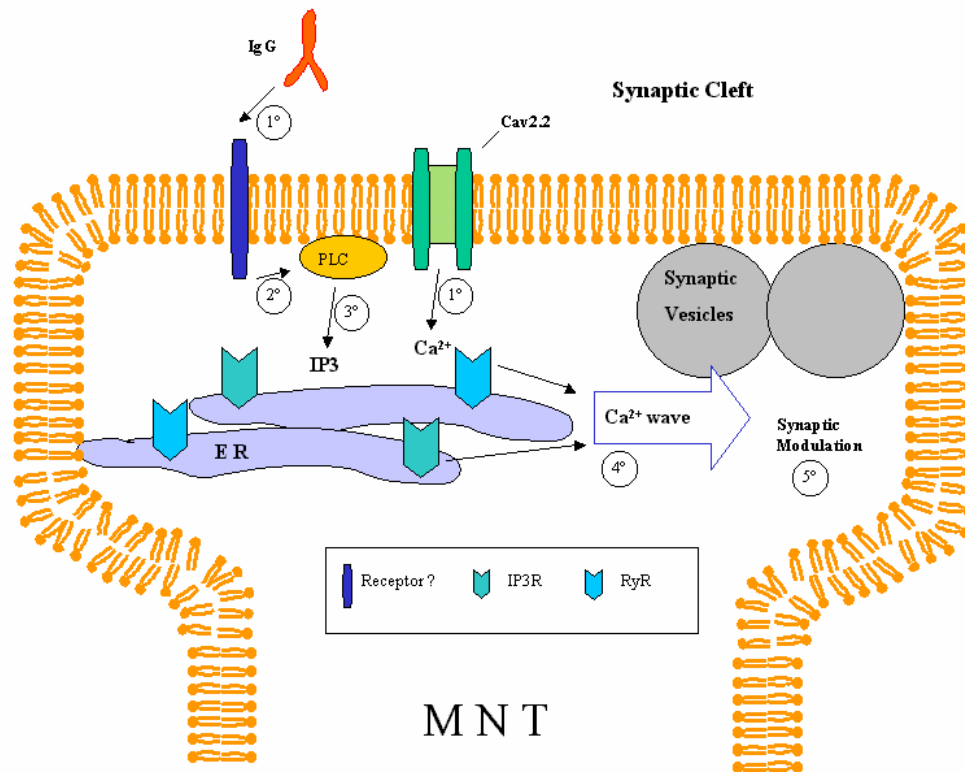


Fig. 22. Mecanismo hipotético a través del cual las IgG-ELA podrían inducir potenciación de la transmisión sináptica espontánea en terminales motores.

Con baja probabilidad de apertura el canal Cav2.2 permite la entrada de Ca²⁺ al terminal motor (1°), el cual puede participar en la activación de IP3R y RyR. Las IgG-ELA interaccionan con su blanco molecular en la superficie del terminal (1°) y activan PLC (2°) con la subsiguiente generación de IP3 (3°). Sinérgicamente la interacción de una señal de Ca²⁺ (proveniente del canal Cav2.2) e IP3 activarían IP3R con la subsiguiente liberación de Ca²⁺ desde reservorios intracelulares de Ca²⁺. Estos eventos de liberación de Ca²⁺ excitarían receptores vecinos y a través de CICR se podría estimular un proceso de movilización de Ca²⁺ aún mayor (4°). Una liberación continua y simultánea a través de IP3R y RyR (Fig. 1C y 7 B) podrían transformar una señal Ca²⁺ transitoria en una señal persistente permitiendo el establecimiento de la potenciación sináptica dependiente de IgG-ELA (5°).

DISCUSIÓN**Potenciación sináptica mediada por IgG-ELA**

Un número de trabajos previos sugerían que los anticuerpos purificados de pacientes con ELA podían estar involucrados en la patogenia (Uchitel et al., 1988; Troost et al., 1990; Appel et al., 1991; Kawamata et al., 1992; Uchitel et al., 1992; Engelhardt et al., 1993; O'Shaughnessy et al., 1998; Muchnik et al., 2002). Sin embargo, la importancia de estos anticuerpos se encuentra bajo discusión debido a una serie de factores: 1- Los tratamientos inmunosupresores, plasmaféresis e irradiación de tejido linfoide no mostraron un efecto favorable sobre el estado de salud de los pacientes (Rudnicki et al., 1987; Smith et al., 1994), 2- La ausencia de identificación de mecanismos específicos por medio de los cuales los anticuerpos median su efecto, 3 – La sospecha que ciertas observaciones morfológicas y fisiológicas podían deberse a actividad de una proteasa de serinas (Nyormoi, 1996), y 4 – La existencia de resultados opuesto (Smith et al., 1992; Arzac et al., 1996). El trabajo de Smith y colaboradores (1992) mostró que el 90 % de los pacientes generaban anticuerpos contra canales de calcio de tipo L. Sin embargo, Arzac y colaboradores (1996) después de un intenso estudio no hallaron anticuerpos contra canales de calcio en ninguno de los pacientes con ELA.

En consecuencia, como un primer paso evaluamos si los anticuerpos purificados de pacientes ELA podían interactuar de forma específica con

componentes de la transmisión sináptica de motoneuronas y modular la liberación de neurotransmisor.

Se decidió evaluar el efecto de las IgG ya que son los anticuerpos predominantes en la respuesta secundaria. Además se decidió evaluar el efecto de las IgG-ELA en la transmisión sináptica de la unión neuromuscular debido a que ésta se encuentra fuera de la barrera hematoencefálica y consecuentemente se convierte en una localización susceptible a la acción de autoanticuerpos (Vincent, 1999).

Para definir la causa de la potenciación sináptica, se estudió el papel de las IgG-ELA en la ps-IgG-ELA considerando la potencial participación de proteasas y otros contaminantes.

Se observó que la ps-IgG-ELA fue eliminada por medio de lavado con solución normal después de 6,5 hrs de incubación. Esta reversibilidad muestra que no existiría daños en los terminales por el tratamiento, como podría esperarse si el aumento en la liberación de Ach fuera debido a actividad proteolítica. Además, inhibidores específicos no evitaron la ps-IgG-ELA, indicando que esas proteasas no participarían en el incremento de actividad sináptica, y sugiriendo que las IgG-ELA son responsables de la potenciación sináptica (Fig 8). Estos resultados son consistentes con la ausencia de bandas inespecíficas en geles de poliacrilamida utilizados para evaluar el producto de purificación. Al mismo tiempo estos resultados se confirmaron por medio de la inmunoprecipitación. Se logró prevenir la ps-IgG-ELA inmunoprecipitando

IgG-ELA con Ab anti-IgG humana pero no utilizando Ab anti-IgG de conejo (Fig. 9). Estos experimentos muestran que la potenciación sináptica observada era dependiente de IgG-ELA y no de moléculas contaminantes.

El análisis de las propiedades electrofisiológicas de la potenciación sináptica mostró que las IgG-ELA solo modifican la tasa en que los cuantos de neurotransmisor se liberaban, pero no se modificaba el modo en que se liberaban los cuantos, ni la amplitud de los potenciales postsináptico. Este análisis indica un efecto presináptico como se ha reportado previamente (Uchitel et al., 1988; O'Shaughnessy et al., 1998).

Por otro lado, de forma particularmente llamativa, las IgG-ELA afectaron el QC de forma dependiente de la frecuencia de estimulación, incrementando levemente la neurotransmisión a 1 y a 100 Hz de estimulación, pero no a 20 o 40 Hz. El aumento del QC evaluado a baja frecuencia de estimulación es consistente con los estudios previos (O'Shaughnessy et al., 1998). Sin embargo el efecto de las IgG-ELA a alta frecuencia de estimulación no se estudió previamente.

Si bien, un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular podría traducirse en un aumento en la liberación, la transmisión sináptica evocada requiere de microdominios de Ca^{2+} de precisa duración, localización y concentración (Chad and Eckert, 1984; Simon y Llinas, 1985). De esta forma podríamos pensar que las señales de Ca^{2+} alteradas por las IgG-ELA no estarían involucradas en la transmisión sináptica a 20 y 40 hz, o que el mecanismo de liberación se encuentra saturado y un

aumento en la concentración de Ca^{2+} podría afectar distintos mecanismos celulares, pero no a la liberación. Sin embargo, la liberación de neurotransmisor a 100 hz sí mostró un aumento, sugiriendo que el mecanismo no se encuentra saturado. No obstante, en la liberación a 100 hz podrían participar mecanismos adicionales a los que operan a baja frecuencia. Un razonamiento similar podría aplicarse a la transmisión sináptica evaluada durante la plasticidad de corto plazo (PPF y PTP). No obstante, las frecuencias fisiológicas de liberación de neurotransmisor más ordinarias (20 y 40 hz.) son las menos afectadas por las IgG-ELA, lo cual pone en duda la relevancia del efecto de los anticuerpos sobre la liberación evocada en un paciente con ELA. De esto surge claramente que nuestro conocimiento acerca de la transmisión sináptica es escaso, y esto impide lograr una completa comprensión de la relevancia de las IgG-ELA en la transmisión sináptica evocada.

No obstante, las IgG-ELA sí afectaron fuertemente la liberación de neurotransmisor durante y luego de la estimulación a 20 y 40 Hz (liberación asincrónica y retrazada). Estos resultados indican que los anticuerpos aún durante la estimulación alteran la señalización mediada por Ca^{2+} , si bien ésta podría carecer de las propiedades temporo-espaciales necesarias para incrementar el QC. Al mismo tiempo, la liberación asincrónica y retrasada son dependientes de la estimulación, de la frecuencia (mayor a 40 que a 20 hz.), y la liberación retrazada es menor a la asincrónica y decae con el tiempo. Esto sugiere que la entrada de

Ca²⁺ y tal vez otros mecanismos que se disparan durante la llegada del potencial de acción al terminal motor, contribuyen a exaltar la alteración que introducen las IgG-ELA durante el reposo.

A fin de hallar evidencia específica y directa acerca de la interacción de las IgG-ELA con componentes de la transmisión neuromuscular, y cual era la localización del blanco molecular, se estudió la inmunoreactividad de las IgG-ELA en músculos diafragma y soleus de rata y ratón. Se observó que los Ab provenientes del 50 % de los pacientes eran inmunoreactivos contra la UNM (Fig. 4). Estos resultados indican que el 50 % de los pacientes poseen mecanismos autoinmunes asociados a la enfermedad, mientras que los restantes pacientes podrían mostrar otros mecanismos asociados. Al mismo tiempo, estos resultados son consistentes con la idea que la UNM puede ser un sitio blanco para enfermedades autoinmunes (Vincent, 1999; Bullens et al., 2002; Flink y Atchison, 2003). Sin embargo, los anticuerpos que mostraron inmunoreactividad contra la UNM, también poseían inmunoreactividad contra los cuerpos de las células de Purkinje de cerebelo y sus grandes ramas, y no contra las células granos vecinas. Además observamos ausencia de inmunoreactividad contra la fibra muscular con todos los anticuerpos estudiados. Esto indica que no existirían anticuerpos dirigidos contra los canales de calcio del músculo (Cav1.1, subunidad $\alpha 1S$) como se pensó previamente (Smith et al., 1992).

Por otra parte uno de los blancos sugeridos para las IgG-ELA es el Fc γ R (Mohamed et al., 2002). Sin embargo, entre los inhibidores de proteasa utilizados (Fig. 1), la peptatina A, es un potente inhibidor del Fc γ R (Athanasakis et al., 2000). De esta forma la ausencia de efecto de este inhibidor sobre la ps-IgG-ELA sugiere que la modulación sináptica tampoco sería mediada por los Fc γ R. Además, si la ps-IgG-ELA fuera consecuencia de una interacción entre las IgG-ELA y el Fc γ R, deberíamos observar una tinción positiva con todos los anticuerpos utilizados incluidos las IgG-Ctrl (Ober et al., 2001). Adicionalmente, no detectamos inmunoreactividad contra el endotelio vascular, donde el Fc γ R se encuentra en alta concentración (Medesane et al., 1998). En consecuencia la inmuno-marcación positiva utilizando un grupo de IgG-ELA, pero negativa cuando se utilizó otras IgG-ELA o IgG-Ctrl indicaría que las IgG estarían mediando una interacción antígeno-anticuerpo por medio del fragmento Fab, y no por el fragmento Fc.

Así, utilizando inmunohistoquímica y electrofisiología determinamos que un grupo de IgG-ELA (50%) muestra inmunoreactividad contra la UNM y modulan la transmisión sináptica. Mientras que otro grupo de IgG-ELA (50%), todas las IgG-Ctrl y todas las IgG-f-ELA no mostraron estas características.

Además, la correlación entre la inmunoreactividad y la potenciación sináptica ($r = 0,96$) indican que solo un grupo de pacientes ELA contienen anticuerpos con ambas propiedades (Fig. 7 A y 19). De esta forma, la

inmunoreactividad puede ser usada para distinguir dos grupos de pacientes, los que se deberían considerar como diferentes tipos de pacientes a fin de obtener estadísticas e interpretaciones cercanas a la realidad en futuros estudios tanto básicos como terapéuticos.

A fin de distinguir si el blanco antigénico de estos anticuerpos se localizaba en la membrana presináptica, en la postsináptica o en ambas membranas, se estudió la inmunoreactividad de las IgG-ELA en músculos denervados. No se detectó inmunoreactividad en estos músculos, indicando que el blanco molecular se hallaría en el terminal motor (Fig. 8). Se debe ser cauteloso al interpretar estos resultados ya que después de la denervación podría cambiar la tasa y la localización de expresión de algunas moléculas de membrana. Sin embargo, debido a que los experimentos de inmunomarcación y electrofisiología denotan una localización y efecto presináptico respectivamente, y los estudios de señalización también denotan un efecto presináptico, podríamos pensar que el blanco antigénico es definitivamente presináptico.

Vías de señalización que regulan la potenciación sináptica mediada por IgG-ELA

Para identificar los mecanismos fisiológicos responsables de la potenciación sináptica mediada por las IgG-ELA, se estudió si las IgG-ELA actuaban a través de la activación del complejo del complemento o una serie de vías de señalización. Se observó, que las IgG-ELA no activan el

complemento, en contraste con los anticuerpos de pacientes con Guillain-Barré (Bullens et al. 2002). Estos resultados son consistentes con la ausencia de inmunoreactividad contra los gangliósidos GM1 estudiada por ELISA.

Por otra parte los estudios de señalización mostraron sorprendentemente que la ps-IgG-ELA requiere una entrada inicial de Ca^{2+} a través de un canal Cav2.2, pero no una entrada constitutiva de Ca^{2+} o la entrada de Ca^{2+} a través de otros canales (Fig. 20). La presencia del CCDV Cav2.2 se confirmó utilizando anticuerpos específicos (Pagani et al., 2004).

Los experimentos de interacción competitiva y no competitiva muestran una ausencia de interacción entre las IgG-ELA y la ω -conotoxin GVIA, pero también indican que una vez iniciada la ps-IgG-ELA, ésta se vuelve independiente de la entrada de Ca^{2+} (Fig. 20). Esta conclusión es confirmada por bloqueo de todos los CCDV por medio de Co^{2+}/Ni^{2+} durante la ps-IgG-ELA. Al mismo tiempo estos resultados son consistentes con resultados de identificación bioquímica de la inmunoreactividad de las IgG-ELA contra CCDV (Drachman et al., 1995; Arsac et al., 1996).

Adicionalmente, estos resultados muestran que las señales de Ca^{2+} a través del canal Cav2.2 pueden regular la transmisión sináptica espontáneo (Protti et al., 1991).

Debido a que la ps-IgG-ELA se vuelve independiente de Ca^{2+} , se estudió la participación de vías intracelulares de señalización. Se determinó que PLC, RyR e IP3R eran fundamentales en la activación de la ps-IgG-ELA. La

liberación de Ca^{2+} a través RyR e IP3R no solo era simultánea durante la potenciación (Fig. 22, tabla 4), sino que además parecen mantenerse activados durante largos periodos de tiempo (Fig. 7 D).

Por otro lado se ha reportado evidencia contradictoria acerca de la capacidad de las IgG-ELA para interaccionar con CCDV y su capacidad para modificar corrientes de Ca^{2+} . Una posible explicación a estos resultados contradictorios surge al considerar cual sería el mecanismo que activaría la PLC en la ps-IgG-ELA. Las isoformas de PLC que podríamos considerar como relevantes son la PLC δ y la PLC β , que son activadas a través de un incremento la concentración de Ca^{2+} y a través de un receptor acoplado a proteína G (GPCR) respectivamente. La activación directa de por el influjo de Ca^{2+} a través del canal Cav2.2 es poco probable: 1- debido a que neutros experimentos sugieren ausencia de interacción competitiva y no competitiva entre el CCDV y la GVIA, 2- Otras investigaciones suportan la ausencia de interacción entre las IgG-ELA y los CCDV, 3- La entrada de Ca^{2+} a través de los canales Cav2.2 por medio de estimulación eléctrica o con alto K^+ no afectan la liberación de neurotransmisor, ya que el aumento en la transmisión es revertida rápidamente por bloqueantes del canal P/Q.

Sin embargo, la interacción de las IgG-ELA con un GPCR podría dar una explicación a la alteración de las corrientes de Ca^{2+} , debido a que los CCDV son fuertemente regulados por proteína G. De esta forma las IgG-ELA podrían alterar la regulación de los canales mediada por proteína G.

Al mismo tiempo es posible que la interacción de las IgG-ELA con CCDV detectada (Smith et al., 1992) sea debida a una co-purificación de las GPCR con CCDV, como se ha reportado (McEnery et al., 1994). Además, el tipo particular de regulación mediado por proteína G en las distintas preparaciones utilizadas, sus distintos grados de asociación física con CCDV, las diferentes metodologías utilizadas para purificación de canales y el hecho que solamente un 50 % de los pacientes con ELA produce anticuerpos con inmunoreactividad, introducirán un mayor grado de variabilidad en los resultados obtenidos.

Estos resultados y consideración nos llevan a preguntarnos ¿Cuál es el rol funcional de la señal de Ca^{2+} a través del canal $Ca^{v2.2}$ que nosotros detectamos? Una hipótesis factible es que ésta señal de Ca^{2+} a través del CCDV pueda afectar a los receptores directamente por medio de la generación de eventos elementales, o indirectamente promoviendo un estado de mayor concentración de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico y así sensibilizando a los RyR e IP3R (Berridge et al., 2003). Esta hipótesis es consistente con el hecho de que el quelante de Ca^{2+} BAPTA-AM previene la potenciación y con resultados previos (Stoop y Poo, 1995).

Por otro lado, ambos receptores (IP3R y RyR) muestran una dependencia de Ca^{2+} para su activación con forma de distribución normal (ver introducción). Esto podría suponer que una vez iniciada la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares se alcance cierta $[Ca^{2+}]_i$ que conduzca a la inactivación de los receptores y consecuentemente un efecto

negativo sobre la ps-IgG-ELA. Sin embargo, hemos detectado que la potenciación sináptica continúa en el tiempo al menos durante 10 horas (Fig. 7 D). Si bien no está claro a que se debe este fenómeno, una situación similar se observó en la potenciación sináptica inducida por el factor trófico NT4 en la UNM donde participan los IP3R (Yang et al., 2001). Por otra parte, la dependencia de Ca^{2+} para la activación de los IP3R toma una forma sigmoidea con un fuerte estímulo (Bootman, 1999; Hagar et al., 1998; Ehrlich et al., 1997 y 1998-). Al mismo tiempo, el aumento en la liberación es el resultado de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ debido a la participación de una población de RyR e IP3R, en donde ambos receptores mostraran mecanismos regulatorios diferentes y fenómenos de CICR.

Detectados que la ps-IgG-ELA requiere la entrada de Ca^{2+} , pero también asumimos que los anticuerpos activarían PLC (Por ejemplo: A través de receptores acoplados a proteína G o receptores de tirosina quinasa) y esta a su vez generaría IP3 (Fig. 22 y 23). Sin embargo, si las IgG-ELA estuvieran interaccionando con un GPCR, ésta interacción podría estar afectando el mecanismo inhibitorio de la proteína G sobre los canales Cav2.2 posibilitando una mayor probabilidad de apertura del canal en el reposo.

De esta forma, después de la activación de PLC, el IP3 generado podría activar los IP3R y generar eventos elementales de liberación de Ca^{2+} , los cuales pueden estimular receptores vecinos a través de CICR lo cual

podría generar mayor movilización de Ca^{2+} desde reservorios dando como resultado la ps-IgG-ELA (Berridge et al., 2003) (Fig. 5 y 23).

Como conclusión general, nuestros resultados demuestran un rol específico de las IgG-ELA en la ps-IgG-ELA mediada por una interacción antígeno-anticuerpo que afecta vías de señalización claves en la supervivencia y muerte neuronal. Los mecanismos observados podrían estar presentes en el 50 % de los pacientes con ELA.

Rol funcional Potencial de las IgG-ELA en pacientes con ELA

Nuestros resultados sugieren que la ps-IgG-ELA es dependiente de la liberación de Ca^{2+} proveniente de reservorios intracelulares. Ésta persiste en el tiempo mientras se mantiene el estímulo y aumenta dependiendo del tiempo de incubación (Fig. 7 D). Estos resultados son la evidencia electrofisiológica y farmacológica que las IgG-ELA inducen y mantienen un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Este aumento sostenido en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es consistente con una pérdida de la homeostasis de Ca^{2+} relevante para su almacenamiento en reservorios intracelulares y señales mediadas por el ión (Berridge et al., 2003). Las alteraciones en el almacenamiento de Ca^{2+} pueden conducir a estrés del retículo endoplásmico y consecuentemente a múltiples categorías de errores en el plegado y transporte de proteínas como se ha observado en pacientes y animales modelo de ELA (Strong, 2003). Adicionalmente, las alteraciones en el sistema de transporte de Ca^{2+} (Ca^{2+} -ATPase e IP3R) pueden asociarse directamente con la

activación de caspasas (Jayaraman et al., 1997; Orenius et al., 2003). En línea con estos resultados, recientemente se ha reportado que en cultivo primario de células del asta ventral de ratas las IgG-ELA inducen la activación de caspasa 3 en motoneuronas (Demestre et al., 2005).

Aún más, una liberación de Ca^{2+} persistente a través de RyR e IP3R conlleva a un exceso en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático que se elimina rápidamente por las mitocondrias (Rizzuto et al., 1993; David y Barret, 2000; Montero et al., 2000). Estratégicamente esto se lleva a cabo por medio de una unidad funcional formada por la proximidad espacial entre el retículo endoplásmico, los CCDV y las mitocondrias, creando dominios de alta concentración de Ca^{2+} en la proximidad del poro de los canales de calcio (Rizzuto et al., 1993; David y Barret, 2000; Montero et al., 2000).

De esta forma, es factible que las IgG-ELA puedan afectar el control homeostático de Ca^{2+} tanto en el retículo endoplásmico como en mitocondrias, lo cual podría llevar a la activación de la caspasa 3 (Demestre et al., 2005). La caspasa 3 puede ser activada a través de señales apoptóticas provenientes del ER mediada por caspasa 12 y provenientes de mitocondrias por medio de la caspasa 9 (Orrenius et al., 2003 y Himoti et al., 2003). Consistente con estos se ha observado inducción de apoptosis mediada por disfunción mitocondrial, tanto en pacientes con ELA como en modelos animales de ELA (transgénicos de SOD1) (Strong, 2003).

En pacientes con ELA, así como en animales tratados con IgG-ELA, podríamos esperar una serie de etapas: 1- disfunción de terminales motores (Uchitel et al., 1992; Maselli et al., 1993), 2- fenómenos de plasticidad involucrados probablemente en la recuperación (Fratantoni et al., 2000), 3- activación de vías de señalización de muerte celular (Demestre et al., 2005) y finalmente 5- alteraciones estructurales que conduzcan a muerte de motoneuronas (Pullen et al., 2000; 2004).

De esta forma, después de un estímulo nocivo y la pérdida de terminales motores, nuevos terminales son generados a fin de reinervar las fibras musculares sin inervación. Sin embargo con un estímulo tóxico persistente, como la pérdida de la homeostasis de Ca^{2+} inducida por anticuerpos en pacientes ELA, podríamos esperar ciclos de denervación-reinervación. Así, los nuevos terminales generados nuevamente serán blancos para los anticuerpos y nuevamente serían no funcionales, estableciendo una economía celular catastrófica (Raoul et al., 2002; Orrenius et al., 2003).

Es interesante notar que el aumento de liberación asincrónica (mayor a 40 hz que a 20 hz de estimulación) predice que la mayor liberación evocada por potenciales de acción promovería una mayor desregulación de Ca^{2+} intracelular en motoneuronas en los pacientes. Así, debido a que la fuerza en la contracción muscular se logra por una mayor tasa de disparo y reclutamiento de unidades motoras (Norris y Gasteg, 1955) podríamos

esperar que las motoneuronas y músculos involucrados en tareas más pesadas fueran preferencialmente más afectados en ELA y esto podría reflejarse en el patrón de inicio y/o progresión de la enfermedad. Consistente con esta hipótesis, es interesante notar que los signos de inicio de ELA en los miembros se encuentran en un 65 a 80 % de los casos (Rosatti et al., 1977; Brooks et al., 1994). Adicionalmente, en los pacientes más jóvenes preferencialmente muestran un inicio en el brazo derecho (Brooks et al., 1995) como podría esperarse si las motoneuronas involucradas en tareas mas pesadas pudieran ser afectadas preferencialmente. Además, la actividad física intensa ha sido asociada a ELA como un factor de riesgo (Mitchell, 2000; Chio et al., 2005; Piazza et al., 2004, Haley, 2003).

Finalmente, estos resultados ponen de manifiesto la importancia de identificar mecanismos específicos para ELA inmuno-asociada y ELA idiopática, junto con detallados estudios clínicos a fin de obtener interpretaciones más precisas en los ensayos clínicos.

REFERENCIAS

- Al-Chalabi A, Andersen PM, Nilsson P, Chioza B, Andersson JL, Russ C, Shaw CE, Powell JF, Leigh PN (1999) Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 8:157-164.
- Alexianu ME, Ho BK, Mohamed AH, La Bella V, Smith RG, Appel SH (1994) The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 36:846-858.
- Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH (2001) Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 57:1282-1289.
- Appel SH, Engelhardt JI, Garcia J, Stefani E (1991) Autoimmunity and ALS: a comparison of animal models of immune-mediated motor neuron destruction and human ALS. *Adv Neurol* 56:405-412.
- Arasaki K, Kato Y, Hyodo A, Ushijima R, Tamaki M (2002) Longitudinal study of functional spinal alpha motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 25:520-526.
- Arenson MS, Evans SC (2001) Activation of protein kinase C increases acetylcholine release from frog motor nerves by a direct action on L-type Ca(2+) channels and apparently not by depolarisation of the terminal. *Neuroscience* 104:1157-1164.
- Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG (1994) Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci* 14:5559-5569.
- Arsac C, Raymond C, Martin-Moutot N, Dargent B, Couraud F, Pouget J, Seagar M (1996) Immunoassays fail to detect antibodies against neuronal calcium channels in amyotrophic lateral sclerosis serum. *Ann Neurol* 40:695-700.
- Athanassakis I, Protopapadakis E, Vassiliadis S (2000) Localization of pepstatin's inhibitory action during Fc-mediated antibody internalization: possible implications for antibody-mediated viral transmission. *Cell Immunol* 199:81-88.
- Augustine GJ (2001) How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr Opin Neurobiol* 11:320-326.
- Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, Estevez AG, Beckman JS (2004) A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev* 47:263-274.
- Barron KD, Marciano FF, Amundson R, Mankes R (1990) Perineuronal glial responses after axotomy of central and peripheral axons. A comparison. *Brain Res* 523:219-229.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-529.
- Bhave G, Gereau RWt (2004) Posttranslational mechanisms of peripheral sensitization. *J Neurobiol* 61:88-106.
- Boillee S, Cadusseau J, Coulpier M, Granec G, Junier MP (2001) Transforming growth factor alpha: a promoter of motoneuron survival of potential biological relevance. *J Neurosci* 21:7079-7088.
- Bowling AC, Schulz JB, Brown RH, Jr., Beal MF (1993) Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in

- familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 61:2322-2325.
- Brager DH, Cai X, Thompson SM (2003) Activity-dependent activation of presynaptic protein kinase C mediates post-tetanic potentiation. *Nat Neurosci* 6:551-552.
- Brooks BR (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* 124 Suppl:96-107.
- Brooks BR, Shodis KA, Lewis DH, Rawling JD, Sanjak M, Belden DS, Hakim H, DeTan Y, Gaffney JM (1995) Natural history of amyotrophic lateral sclerosis. Quantification of symptoms, signs, strength, and function. *Adv Neurol* 68:163-184.
- Browne SE, Bowling AC, Baik MJ, Gurney M, Brown RH, Jr., Beal MF (1998) Metabolic dysfunction in familial, but not sporadic, amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 71:281-287.
- Brownell B, Oppenheimer DR, Hughes JT (1970) The central nervous system in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 33:338-357.
- Bruyn RP, Koelman JH, Troost D, de Jong JM (1995) Motor neuron disease (amyotrophic lateral sclerosis) arising from longstanding primary lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58:742-744.
- Bullens RW, O'Hanlon GM, Goodyear CS, Molenaar PC, Conner J, Willison HJ, Plomp JJ (2000) Anti-GQ1b antibodies and evoked acetylcholine release at mouse motor endplates. *Muscle Nerve* 23:1035-1043.
- Carafoli E, Santella L, Branca D, Brini M (2001) Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36:107-260.
- Carpenter S (1968) Proximal axonal enlargement in motor neuron disease. *Neurology* 18:841-851.
- Carter JR, Mynlieff M (2003) Amyotrophic lateral sclerosis patient IgG alters voltage dependence of Ca²⁺ channels in dissociated rat motoneurons. *Neurosci Lett* 353:221-225.
- Castagne V, Gautschi M, Lefevre K, Posada A, Clarke PG (1999) Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system. *Prog Neurobiol* 59:397-423.
- Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.
- Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.
- Chad JE, Eckert R (1984) Calcium domains associated with individual channels can account for anomalous voltage relations of CA-dependent responses. *Biophys J* 45:993-999.
- Chio A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G (2005) Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* 128:472-476.
- Clapham DE, Runnels LW, Strubing C (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2:387-396.

- Cleveland DW, Rothstein JD (2001) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2:806-819.
- Coffman CJ, Horner RD, Grambow SC, Lindquist J (2005) Estimating the occurrence of amyotrophic lateral sclerosis among Gulf War (1990-1991) veterans using capture-recapture methods. *Neuroepidemiology* 24:141-150.
- Couratier P, Yi FH, Preud'homme JL, Clavelou P, White A, Sindou P, Vallat JM, Jauberteau MO (1998) Serum autoantibodies to neurofilament proteins in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 154:137-145.
- Couteaux R, Pecot-Dechavassine M (1974) [Specialized areas of presynaptic membranes]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 278:291-293.
- Cui LY, Liu MS, Tang XF (2004) Single fiber electromyography in 78 patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Chin Med J (Engl)* 117:1830-1833.
- Curti D, Malaspina A, Facchetti G, Camana C, Mazzini L, Tosca P, Zerbi F, Ceroni M (1996) Amyotrophic lateral sclerosis: oxidative energy metabolism and calcium homeostasis in peripheral blood lymphocytes. *Neurology* 47:1060-1064.
- Cwik VA, Hanstock CC, Allen PS, Martin WR (1998) Estimation of brainstem neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis with in vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *Neurology* 50:72-77.
- Dasgupta A, Simpson JA (1962) Relation between firing frequency of motor units and muscle tension in the human. *Electromyography* 2:117-128.
- David G, Barrett EF (2000) Stimulation-evoked increases in cytosolic [Ca(2+)] in mouse motor nerve terminals are limited by mitochondrial uptake and are temperature-dependent. *J Neurosci* 20:7290-7296.
- David G, Barrett EF (2003) Mitochondrial Ca²⁺ uptake prevents desynchronization of quantal release and minimizes depletion during repetitive stimulation of mouse motor nerve terminals. *J Physiol* 548:425-438.
- Day NC, Wood SJ, Ince PG, Volsen SG, Smith W, Slater CR, Shaw PJ (1997) Differential localization of voltage-dependent calcium channel alpha1 subunits at the human and rat neuromuscular junction. *J Neurosci* 17:6226-6235.
- De Camilli P, Takei K (1996) Molecular mechanisms in synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Neuron* 16:481-486.
- De Koninck P, Schulman H (1998) Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science* 279:227-230.
- Delbono O, Garcia J, Appel SH, Stefani E (1991) Calcium current and charge movement of mammalian muscle: action of amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins. *J Physiol* 444:723-742.
- Denys EH, Norris FH, Jr. (1979) Amyotrophic lateral sclerosis. Impairment of neuromuscular transmission. *Arch Neurol* 36:202-205.
- Doughty SW, Blaney FE, Orlek BS, Richards WG (1998) A molecular mechanism for toxin block in N-type calcium channels. *Protein Eng* 11:95-99.
- Drachman DB, Fishman PS, Rothstein JD, Motomura M, Lang B, Vincent A, Mellits ED (1995) Amyotrophic lateral sclerosis. An autoimmune disease? *Adv Neurol* 68:59-65.

- Dunnett SB, Bjorklund A (1999) Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 399:A32-39.
- Ehrhardt DW, Wais R, Long SR (1996) Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* 85:673-681.
- Elliott JL (2001) Cytokine upregulation in a murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Mol Brain Res* 95:172-178.
- Engelhardt JI, Siklos L, Komuves L, Smith RG, Appel SH (1995) Antibodies to calcium channels from ALS patients passively transferred to mice selectively increase intracellular calcium and induce ultrastructural changes in motoneurons. *Synapse* 20:185-199.
- Engelhardt JI, Tajti J, Appel SH (1993) Lymphocytic infiltrates in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 50:30-36.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535.
- Field EJ, Hughes D (1965) Toxicity of motor neurone disease serum for myelin in tissue culture. *Br Med J* 5475:1399-1401.
- Figlewicz DA, Krizus A, Martinoli MG, Meininger V, Dib M, Rouleau GA, Julien JP (1994) Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 3:1757-1761.
- Fill M (2003) Mechanisms that turn-off intracellular calcium release channels. *Front Biosci* 8:d46-54.
- Fischer HG, Bielinsky AK, Nitzgen B, Daubener W, Hadding U (1993) Functional dichotomy of mouse microglia developed in vitro: differential effects of macrophage and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on cytokine secretion and antitoxoplasmic activity. *J Neuroimmunol* 45:193-201.
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD (2004) Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 185:232-240.
- Flink MT, Atchison WD (2003) Ca²⁺ channels as targets of neurological disease: Lambert-Eaton Syndrome and other Ca²⁺ channelopathies. *J Bioenerg Biomembr* 35:697-718.
- Fratantoni SA, Weisz G, Pardal AM, Reisin RC, Uchitel OD (2000) Amyotrophic lateral sclerosis IgG-treated neuromuscular junctions develop sensitivity to L-type calcium channel blocker. *Muscle Nerve* 23:543-550.
- Fujita K, Yamauchi M, Shibayama K, Ando M, Honda M, Nagata Y (1996) Decreased cytochrome c oxidase activity but unchanged superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in the spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* 45:276-281.
- Gall D, Roussel C, Nieus T, Cheron G, Servais L, D'Angelo E, Schiffmann SN (2005) Role of calcium binding proteins in the control of cerebellar granule cell neuronal excitability: experimental and modeling studies. *Prog Brain Res* 148:321-328.

- Genazzani AA, Carafoli E, Guerini D (1999) Calcineurin controls inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor expression in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5797-5801.
- Ghezzi P, Bernardini R, Giuffrida R, Bellomo M, Manzoni C, Comoletti D, Di Santo E, Benigni F, Mennini T (1998) Tumor necrosis factor is increased in the spinal cord of an animal model of motor neuron degeneration. *Eur Cytokine Netw* 9:139-144.
- Ginsberg SD, Portera-Cailliau C, Martin LJ (1999) Fimbria-fornix transection and excitotoxicity produce similar neurodegeneration in the septum. *Neuroscience* 88:1059-1071.
- Gomez TM, Robles E, Poo M, Spitzer NC (2001) Filopodial calcium transients promote substrate-dependent growth cone turning. *Science* 291:1983-1987.
- Gomez TM, Snow DM, Letourneau PC (1995) Characterization of spontaneous calcium transients in nerve growth cones and their effect on growth cone migration. *Neuron* 14:1233-1246.
- Gonatas NK, Stieber A, Mourelatos Z, Chen Y, Gonatas JO, Appel SH, Hays AP, Hickey WF, Hauw JJ (1992) Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 140:731-737.
- Graef IA, Mermelstein PG, Stankunas K, Neilson JR, Deisseroth K, Tsien RW, Crabtree GR (1999) L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature* 401:703-708.
- Guegan C, Vila M, Rosoklija G, Hays AP, Przedborski S (2001) Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 21:6569-6576.
- Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP (1995) Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell* 82:415-424.
- Haley RW (2003) Excess incidence of ALS in young Gulf War veterans. *Neurology* 61:750-756.
- Hall ED, Oostveen JA, Gurney ME (1998) Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* 23:249-256.
- He BP, Wen W, Strong MJ (2002) Activated microglia (BV-2) facilitation of TNF-alpha-mediated motor neuron death in vitro. *J Neuroimmunol* 128:31-38.
- Hirano A, Donnenfeld H, Sasaki S, Nakano I (1984) Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 43:461-470.
- Hirano A, Nakano I, Kurland LT, Mulder DW, Holley PW, Saccomanno G (1984) Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 43:471-480.
- Horwich MS, Engel WK, Chauvin PB (1974) Amyotrophic lateral sclerosis sera applied to cultured motor neurons. *Arch Neurol* 30:332-333.
- Ince PG, Slade J, Chinnery RM, McKenzie J, Royston C, Roberts GW, Shaw PJ (1995) Quantitative study of synaptophysin immunoreactivity of cerebral cortex and spinal cord in motor neuron disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:673-679.

- Iwata M, Hirano A (1978) Spraying of the Onufrowicz nucleus in sacral anterior horn lesions. *Ann Neurol* 4:245-249.
- Jackson M, Steers G, Leigh PN, Morrison KE (1999) Polymorphisms in the glutamate transporter gene EAAT2 in European ALS patients. *J Neurol* 246:1140-1144.
- Jayaraman T, Marks AR (1997) T cells deficient in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are resistant to apoptosis. *Mol Cell Biol* 17:3005-3012.
- John LM, Mosquera-Caro M, Camacho P, Lechleiter JD (2001) Control of IP(3)-mediated Ca²⁺ puffs in *Xenopus laevis* oocytes by the Ca²⁺-binding protein parvalbumin. *J Physiol* 535:3-16.
- Katz B, Miledi R (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 195:481-492.
- Katz B, Miledi R (1979) Estimates of quantal content during 'chemical potentiation' of transmitter release. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 205:369-378.
- Katz E, Protti DA, Ferro PA, Rosato Siri MD, Uchitel OD (1997) Effects of Ca²⁺ channel blocker neurotoxins on transmitter release and presynaptic currents at the mouse neuromuscular junction. *Br J Pharmacol* 121:1531-1540.
- Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL (1992) Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* 140:691-707.
- Komuro H, Rakic P (1996) Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron* 17:275-285.
- Kriz J, Nguyen MD, Julien JP (2002) Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 10:268-278.
- Lampson LA, Kushner PD, Sobel RA (1990) Major histocompatibility complex antigen expression in the affected tissues in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 28:365-372.
- Lampson LA, Siegel G (1988) Defining the mechanisms that govern immune acceptance or rejection of neural tissue. *Prog Brain Res* 78:243-247.
- Lee MK, Marszalek JR, Cleveland DW (1994) A mutant neurofilament subunit causes massive, selective motor neuron death: implications for the pathogenesis of human motor neuron disease. *Neuron* 13:975-988.
- Leigh PN, Swash M (1991) Cytoskeletal pathology in motor neuron diseases. *Adv Neurol* 56:115-124.
- Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein JD (1998) Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 20:589-602.
- Liveson J, Frey H, Bornstein MB (1975) The effect of serum from ALS patients on organotypic nerve and muscle tissue cultures. *Acta Neuropathol (Berl)* 32:127-131.
- Lory P, Nargeot J (2004) [Genetic diversity of voltage-gated calcium channels]. *Rev Neurol (Paris)* 160:S7-15.
- Losavio A, Muchnik S (1997) Spontaneous acetylcholine release in mammalian neuromuscular junctions. *Am J Physiol* 273:C1835-1841.

- Lucas DR, Newhouse JP (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 58:193-201.
- Magleby KL, Stevens CF (1972) The effect of voltage on the time course of end-plate currents. *J Physiol* 223:151-171.
- Markesbery WR, Carney JM (1999) Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 9:133-146.
- Marks AR (1997) Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am J Physiol* 272:H597-605.
- Martin JH (2005) The corticospinal system: from development to motor control. *Neuroscientist* 11:161-173.
- Martin LJ (1999) Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:459-471.
- Martin LJ (2001) Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review). *Int J Mol Med* 7:455-478.
- Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C (1998) Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 46:281-309.
- Martin LJ, Kaiser A, Price AC (1999) Motor neuron degeneration after sciatic nerve avulsion in adult rat evolves with oxidative stress and is apoptosis. *J Neurobiol* 40:185-201.
- Maselli RA, Wollman RL, Leung C, Distad B, Palombi S, Richman DP, Salazar-Grueso EF, Roos RP (1993) Neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 16:1193-1203.
- Masui Y, Mozai T, Kakehi K (1985) Functional and morphometric study of the liver in motor neuron disease. *J Neurol* 232:15-19.
- McCleskey EW (1994) Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 4:304-312.
- McGeer EG, McGeer PL (2005) Pharmacologic approaches to the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *BioDrugs* 19:31-37.
- Medesan C, Cianga P, Mummert M, Stanescu D, Ghetie V, Ward ES (1998) Comparative studies of rat IgG to further delineate the Fc:FcRn interaction site. *Eur J Immunol* 28:2092-2100.
- Meldrum B, Garthwaite J (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci* 11:379-387.
- Meyer T, Lenk U, Kuther G, Weindl A, Speer A, Ludolph AC (1995) Studies of the coding region of the neuronal glutamate transporter gene in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 37:817-819.
- Meyer T, Munch C, Knappenberger B, Liebau S, Volkel H, Ludolph AC (1998) Alternative splicing of the glutamate transporter EAAT2 (GLT-1). *Neurosci Lett* 241:68-70.
- Meyer T, Munch C, Liebau S, Fromm A, Schwalenstocker B, Volkel H, Ludolph AC (1998) Splicing of the glutamate transporter EAAT2: a candidate gene of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65:954.
- Mignen O, Shuttleworth TJ (2000) I(ARC), a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca(2+) entry channel. *J Biol Chem* 275:9114-9119.

- Mitchell JD (2000) Amyotrophic lateral sclerosis: toxins and environment. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1:235-250.
- Mitsuyama Y (1993) Presenile dementia with motor neuron disease. *Dementia* 4:137-142.
- Mitsuyama Y (2000) Dementia with motor neuron disease. *Neuropathology* 20 Suppl:S79-81.
- Miyamoto MD (1975) Binomial analysis of quantal transmitter release at glycerol treated frog neuromuscular junctions. *J Physiol* 250:121-142.
- Mochida S, Sheng ZH, Baker C, Kobayashi H, Catterall WA (1996) Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca²⁺ channels. *Neuron* 17:781-788.
- Mohamed HA, Mosier DR, Zou LL, Siklos L, Alexianu ME, Engelhardt JI, Beers DR, Le WD, Appel SH (2002) Immunoglobulin Fc gamma receptor promotes immunoglobulin uptake, immunoglobulin-mediated calcium increase, and neurotransmitter release in motor neurons. *J Neurosci Res* 69:110-116.
- Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, Garcia-Sancho J, Alvarez J (2000) Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* 2:57-61.
- Morris HR, Al-Sarraj S, Schwab C, Gwinn-Hardy K, Perez-Tur J, Wood NW, Hardy J, Lees AJ, McGeer PL, Daniel SE, Steele JC (2001) A clinical and pathological study of motor neurone disease on Guam. *Brain* 124:2215-2222.
- Morrison BM, Hof PR, Morrison JH (1998) Determinants of neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 44:S32-44.
- Mosier DR, Baldelli P, Delbono O, Smith RG, Alexianu ME, Appel SH, Stefani E (1995) Amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins increase Ca²⁺ currents in a motoneuron cell line. *Ann Neurol* 37:102-109.
- Muchnik S, Losavio A, Lorenzo SD (2002) Effect of amyotrophic lateral sclerosis serum on calcium channels related to spontaneous acetylcholine release. *Clin Neurophysiol* 113:1066-1071.
- Mulder DW, Lambert EH, Eaton LM (1959) Myasthenic syndrome in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 9:627-631.
- Nakano I, Hirano A (1987) Atrophic cell processes of large motor neurons in the anterior horn in amyotrophic lateral sclerosis: observation with silver impregnation method. *J Neuropathol Exp Neurol* 46:40-49.
- Narita K, Akita T, Hachisuka J, Huang S, Ochi K, Kuba K (2000) Functional coupling of Ca(2+) channels to ryanodine receptors at presynaptic terminals. Amplification of exocytosis and plasticity. *J Gen Physiol* 115:519-532.
- Neher E (1998) Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20:389-399.
- Niggli E (1999) Localized intracellular calcium signaling in muscle: calcium sparks and calcium quarks. *Annu Rev Physiol* 61:311-335.
- Noda K, Katayama S, Watanabe C, Yamamura Y, Nakamura S (1999) Gallyas- and tau-positive glial structures in motor neuron disease with dementia. *Clin Neuropathol* 18:218-225.

- Norris FH, Jr., Denys EH, Fallat RJ (1979) Respiratory insufficiency, muscle paralysis, and motor neuron disease. *Neurology* 29:525.
- Norris FH, Jr., Gasteiger EL (1955) Action potentials of single motor units in normal muscle. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 7:115-125.
- Nyormoi O (1996) Proteolytic activity in amyotrophic lateral sclerosis IgG preparations. *Ann Neurol* 40:701-706.
- Oancea E, Meyer T (1998) Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell* 95:307-318.
- Ober RJ, Radu CG, Ghetie V, Ward ES (2001) Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int Immunol* 13:1551-1559.
- Ono S (2000) The skin in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1:191-199.
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:552-565.
- O'Shaughnessy TJ, Yan H, Kim J, Middlekauff EH, Lee KW, Phillips LH, Kim YI (1998) Amyotrophic lateral sclerosis: serum factors enhance spontaneous and evoked transmitter release at the neuromuscular junction. *Muscle Nerve* 21:81-90.
- Otsu Y, Murphy TH (2004) Optical postsynaptic measurement of vesicle release rates for hippocampal synapses undergoing asynchronous release during train stimulation. *J Neurosci* 24:9076-9086.
- Pagani R, Song M, McEnery M, Qin N, Tsien RW, Toro L, Stefani E, Uchitel OD (2004) Differential expression of alpha 1 and beta subunits of voltage dependent Ca²⁺ channel at the neuromuscular junction of normal and P/Q Ca²⁺ channel knockout mouse. *Neuroscience* 123:75-85.
- Palecek J, Lips MB, Keller BU (1999) Calcium dynamics and buffering in motoneurons of the mouse spinal cord. *J Physiol* 520 Pt 2:485-502.
- Pestronk A, Adams RN, Clawson L, Cornblath D, Kuncl RW, Griffin D, Drachman DB (1988) Serum antibodies to GM1 ganglioside in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 38:1457-1461.
- Piazza O, Siren AL, Ehrenreich H (2004) Soccer, neurotrauma and amyotrophic lateral sclerosis: is there a connection? *Curr Med Res Opin* 20:505-508.
- Plaitakis A, Carosco JT (1987) Abnormal glutamate metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 22:575-579.
- Protti DA, Szczupak L, Scornik FS, Uchitel OD (1991) Effect of omega-conotoxin GVIA on neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *Brain Res* 557:336-339.
- Pullen AH, Demestre M, Howard RS, Orrell RW (2004) Passive transfer of purified IgG from patients with amyotrophic lateral sclerosis to mice results in degeneration of motor neurons accompanied by Ca²⁺ enhancement. *Acta Neuropathol (Berl)* 107:35-46.
- Pullen AH, Humphreys P (2000) Ultrastructural analysis of spinal motoneurons from mice treated with IgG from ALS patients, healthy individuals, or disease controls. *J Neurol Sci* 180:35-45.
- Raivich G, Gehrman J, Kreutzberg GW (1991) Increase of macrophage colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-

- stimulating factor receptors in the regenerating rat facial nucleus. *J Neurosci Res* 30:682-686.
- Rao SD, Weiss JH (2004) Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends Neurosci* 27:17-23.
- Raoul C, Estevez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyriere O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B (2002) Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35:1067-1083.
- Rizzoli SO, Betz WJ (2005) Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* 6:57-69.
- Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1993) Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262:744-747.
- Robidoux J, Simoneau L, St-Pierre S, Ech-Chadli H, Lafond J (1998) Human syncytiotrophoblast NPY receptors are located on BBM and activate PLC-to-PKC axis. *Am J Physiol* 274:E502-509.
- Roisen FJ, Bartfeld H, Donnenfeld H, Baxter J (1982) Neuron specific in vitro cytotoxicity of sera from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 5:48-53.
- Rosler KM, Truffert A, Hess CW, Magistris MR (2000) Quantification of upper motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol* 111:2208-2218.
- Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW (1992) Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 326:1464-1468.
- Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT (1990) Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 28:18-25.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38:73-84.
- Rowland LP (2005) Research advances in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a personal view. *Neurol Neurochir Pol* 39:3-10.
- Rudnicki S, Chad DA, Drachman DA, Smith TW, Anwer UE, Levitan N (1987) Motor neuron disease and paraproteinemia. *Neurology* 37:335-337.
- Santafe MM, Urbano FJ, Lanuza MA, Uchitel OD (2000) Multiple types of calcium channels mediate transmitter release during functional recovery of botulinum toxin type A-poisoned mouse motor nerve terminals. *Neuroscience* 95:227-234.
- Schiavo G, Gu QM, Prestwich GD, Sollner TH, Rothman JE (1996) Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13327-13332.
- Shaw PJ (1999) Calcium, glutamate, and amyotrophic lateral sclerosis: more evidence but no certainties. *Ann Neurol* 46:803-805.
- Shaw PJ, Eggett CJ (2000) Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 247 Suppl 1:I17-27.
- Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, Richardson JP, Wastell HJ (1995) CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 4:209-216.

- Shefner JM, Reaume AG, Flood DG, Scott RW, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Upton-Rice M, Brown RH, Jr. (1999) Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy. *Neurology* 53:1239-1246.
- Siklos L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joo F, Appel SH (1996) Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39:203-216.
- Siklos L, Engelhardt JI, Alexianu ME, Gurney ME, Siddique T, Appel SH (1998) Intracellular calcium parallels motoneuron degeneration in SOD-1 mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:571-587.
- Simon SM, Llinas RR (1985) Compartmentalization of the submembrane calcium activity during calcium influx and its significance in transmitter release. *Biophys J* 48:485-498.
- Smith RG, Alexianu ME, Crawford G, Nyormoi O, Stefani E, Appel SH (1994) Cytotoxicity of immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients on a hybrid motoneuron cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3393-3397.
- Smith RG, Hamilton S, Hofmann F, Schneider T, Nastainczyk W, Birnbaumer L, Stefani E, Appel SH (1992) Serum antibodies to L-type calcium channels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 327:1721-1728.
- Smith SA, Miller RG, Murphy JR, Ringel SP (1994) Treatment of ALS with high dose pulse cyclophosphamide. *J Neurol Sci* 124 Suppl:84-87.
- Sohl G, Maxeiner S, Willecke K (2005) Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci* 6:191-200.
- Spink DC, Martin DL (1991) Excitatory amino acids in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 29:110.
- Stoop R, Poo MM (1995) Potentiation of transmitter release by ciliary neurotrophic factor requires somatic signaling. *Science* 267:695-699.
- Streit WJ (1993) Microglial-neuronal interactions. *J Chem Neuroanat* 6:261-266.
- Streit WJ, Graeber MB (1993) Heterogeneity of microglial and perivascular cell populations: insights gained from the facial nucleus paradigm. *Glia* 7:68-74.
- Strong MJ (2003) The basic aspects of therapeutics in amyotrophic lateral sclerosis. *Pharmacol Ther* 98:379-414.
- Swerdlow RH, Parks JK, Cassarino DS, Trimmer PA, Miller SW, Maguire DJ, Sheehan JP, Maguire RS, Pattee G, Juel VC, Phillips LH, Tuttle JB, Bennett JP, Jr., Davis RE, Parker WD, Jr. (1998) Mitochondria in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 153:135-142.
- Thanos S (1991) The Relationship of Microglial Cells to Dying Neurons During Natural Neuronal Cell Death and Axotomy-induced Degeneration of the Rat Retina. *Eur J Neurosci* 3:1189-1207.
- Thanos S, Mey J, Wild M (1993) Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro. *J Neurosci* 13:455-466.

- Thomas D, Lipp P, Tovey SC, Berridge MJ, Li W, Tsien RY, Bootman MD (2000) Microscopic properties of elementary Ca²⁺ release sites in non-excitable cells. *Curr Biol* 10:8-15.
- Thomas MM, Dunn SM (1997) Amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins are ineffective in altering calcium influx through presynaptic voltage-sensitive calcium channels. *Neurol Res* 19:129-134.
- Tomlinson BE, Irving D, Rebeiz JJ (1973) Total numbers of limb motor neurones in the human lumbosacral cord and an analysis of the accuracy of various sampling procedures. *J Neurol Sci* 20:313-327.
- Troost D, Aten J, Morsink F, de Jong JM (1995) Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis is not restricted to motor neurons. Bcl-2 expression is increased in unaffected post-central gyrus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 21:498-504.
- Troost D, Aten J, Morsink F, de Jong JM (1995) Apoptosis in ALS is not restricted to motoneurons: Bcl-2 expression is increased in post-central cortex, adjacent to the affected motor cortex. *J Neurol Sci* 129 Suppl:79-80.
- Troost D, Claessen N, van den Oord JJ, Swaab DF, de Jong JM (1993) Neuronophagia in the motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 19:390-397.
- Troost D, Van den Oord JJ, Vianney de Jong JM (1990) Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 16:401-410.
- Uchitel OD, Appel SH, Crawford F, Sczcupak L (1988) Immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients enhance spontaneous transmitter release from motor-nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7371-7374.
- Uchitel OD, Protti DA, Sanchez V, Cherksey BD, Sugimori M, Llinas R (1992) P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3330-3333.
- Uchitel OD, Scornik F, Protti DA, Fumberg CG, Alvarez V, Appel SH (1992) Long-term neuromuscular dysfunction produced by passive transfer of amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins. *Neurology* 42:2175-2180.
- Urbano FJ, Piedras-Renteria ES, Jun K, Shin HS, Uchitel OD, Tsien RW (2003) Altered properties of quantal neurotransmitter release at endplates of mice lacking P/Q-type Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3491-3496.
- Vincent A (1999) Immunology of the neuromuscular junction and presynaptic nerve terminal. *Curr Opin Neurol* 12:545-551.
- Walker D, Bichet D, Campbell KP, De Waard M (1998) A beta 4 isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 1A subunit. *J Biol Chem* 273:2361-2367.
- Wiedemann FR, Winkler K, Kuznetsov AV, Bartels C, Vielhaber S, Feistner H, Kunz WS (1998) Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 156:65-72.

- Xu Z, Cork LC, Griffin JW, Cleveland DW (1993) Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell* 73:23-33.
- Yan HD, Lim W, Lee KW, Kim J (1997) Sera from amyotrophic lateral sclerosis patients reduce high-voltage activated Ca²⁺ currents in mice dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 235:69-72.
- Yan HD, Lim W, Lee KW, Kim J (1997) Sera from amyotrophic lateral sclerosis patients reduce high-voltage activated Ca²⁺ currents in mice dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 235:69-72.
- Yashiro Y, Duling BR (2000) Integrated Ca(2+) signaling between smooth muscle and endothelium of resistance vessels. *Circ Res* 87:1048-1054.
- Yi FH, Lautrette C, Vermot-Desroches C, Bordessoule D, Couratier P, Wijdenes J, Preud'homme JL, Jauberteau MO (2000) In vitro induction of neuronal apoptosis by anti-Fas antibody-containing sera from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 109:211-220.
- Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, Sarang S, Liu AS, Hartley DM, Wu du C, Gullans S, Ferrante RJ, Przedborski S, Kristal BS, Friedlander RM (2002) Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 417:74-78.