

24/160



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

Diferencias en Proteínas Liberadas por Músculo Esquelético Denervado, Normal y Fetal, sus Posibles Implicaciones en Padecimientos Neuromusculares

TESIS PROFESIONAL
Que para obtener el título de
BIOLOGO
presenta



Graciela Ordoñez Lozano

FALLA DE ORIGEN

1989



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

	PAGINA
1.- RESUMEN .....	1
2.- INTRODUCCION .....	3
2.1 Denervación del músculo .....	6
2.2 Músculo Fetal .....	8
2.3 Esclerosis Lateral Amiotrofica .....	10
2.4 Westernblot .....	16
3.- OBJETIVOS .....	19
4.- HIPOTESIS .....	20
5.- MATERIAL Y METODO	
5.1 Obtención del músculo .....	21
5.2 Preparación del extracto .....	21
5.3 Obtención de sueros .....	22
5.4 Westernblot	
a) Electroforésis vertical .....	23
b) Electrotransferencias .....	24
c) Inmunodetección .....	25
6.- RESULTADOS .....	27
7.- DISCUSION .....	36
8.- REFERENCIAS .....	43

## 1. RESUMEN

Existen factores presentes en el músculo esquelético que influyen en la sobrevivencia y crecimiento de la motoneurona inferior in vivo e in vitro (1), se ha propuesto que dichos factores derivados del músculo pueden estar relacionados con la patogenesis de algunas enfermedades de motoneurona.

Por medio de la técnica inmunológica conocida como westernblot y usando como antígeno proteínas de músculo esquelético en varios estadios de desarrollo e inervación se estudiaron las diferencias proteicas del músculo adulto normal, denervado y fetal, demostrando la existencia de anticuerpos contra proteínas del músculo esquelético fetal en suero de pacientes con la enfermedad neuromuscular Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

Los extractos de músculo esquelético adulto normal, denervado y fetal (20 días de gestación) de rata fueron fraccionados en geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% colocando un estandar de pesos moleculares. Posterior a la electroforesis las proteínas fueron transferidas electroforeticamente a membranas de nitrocelulosa, haciendolas reaccionar con 30 sueros de pacientes con ELA y 30 controles.

Los resultados obtenidos con el músculo adulto normal y denervado mostraron una reactividad escasa en los sueros de ELA similar a la encontrada con los sueros controles. Sin embargo se observaron bandas reactivas cinco veces más frecuentemen-

te en sueros de ELA que en controles cuando el inmunoblot fué hecho con extractos de proteína de músculo fetal. Dicha reacción se realizó con proteínas de diferente peso molecular en un rango de 42-92 Kd.

Esta reacción nos indica un reconocimiento antígeno-anticuerpo pero no se puede determinar si éste anticuerpo representa importancia patogénica primaria o una respuesta secundaria a la destrucción neuromuscular.

## 2. INTRODUCCION

El músculo esquelético está formado por células multinucleadas cilíndricas agrupadas estrechamente en haces paralelos o fascículos reunidos por tejido conectivo formando una sola unidad anatómica y funcional. El diámetro de las fibras musculares depende de diversos factores como son: la edad, el intenso ejercicio etc. En el adulto hay hipertrofia compensadora de fibras individuales que tienen lugar cuando se efectúa trabajo físico intenso por largo tiempo. A la inversa la falta de ejercicio tiene por consecuencia atrofia de fibras musculares con disminución de su diámetro.

Las fibras musculares se dividen en miofibrillas, que exhiben un repetido bandeo oscuro y claro igual al de la miofibrilla adyacente formando el típico patrón estriado de la fibra muscular. La banda oscura es anisotrópica sobre el microscopio de luz polarizada y es llamada banda A. La banda clara es isotrópica y es llamada banda I, está dividida por la línea Z. En el centro de cada banda A está una zona pálida denominada banda H que es atravesada por la línea M (figura No. 1). Las miofibrillas están formadas por unidades menores llamadas miofilamentos finos y gruesos constituidos por dos proteínas diferentes, actina y miosina respectivamente (2).

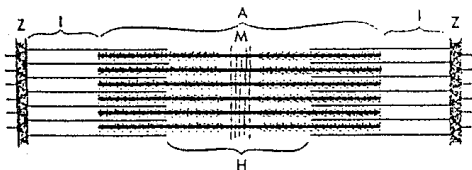


Figura No. 1

Toda fibra muscular es inervada por la rama terminal de un axón motor, en esta unidad neuromuscular está involucrada solo el 0.2% de la superficie de la fibra muscular.

El sitio de contacto de las terminaciones del nervio motor y la superficie de la fibra muscular son especializadas: el nervio para sintetizar, liberar y guardar el neurotransmisor acetilcolina (Ach) y el músculo para responder a la liberación de Ach y producir un cambio local en el flujo de iones a través de la membrana.

En el sitio de contacto, el axón y sus recubrimientos forman un promotorio pequeño y aplanado en la superficie de la fibra llamada placa motora terminal, donde la rama axónica llega al montículo, desaparece su vaina de mielina pero perduran las células de Schwann que lo cubren en forma de techo continuo. Cerca de su terminación el axón de nuevo se ramifica repetidas veces y forma diversas terminaciones axónicas cortas, agrupadas sobre la parte central del montículo (figura No. 2).

Las terminaciones axónicas se encuentran en depresiones

recubiertas de sarcolema, donde la superficie desnuda del axón está separada del sarcolema por una hendidura de 20 a 60 nm de ancho, conocida como hendidura sináptica. El área de la depresión aumenta notablemente al disponerse en pliegues invaginados en el sarcolema (3).

La hendidura sináptica posee la enzima acetilcolinesterasa, necesaria para inactivar la acetilcolina, el neurotransmisor liberado justamente en la placa motora terminal.

Cuando la Ach se une a los sitios receptores, instantáneamente aumenta la permeabilidad del sarcolema en la región de la placa terminal permitiendo la entrada de iones sodio al sarcoplasma y la salida de iones potasio (2,3).

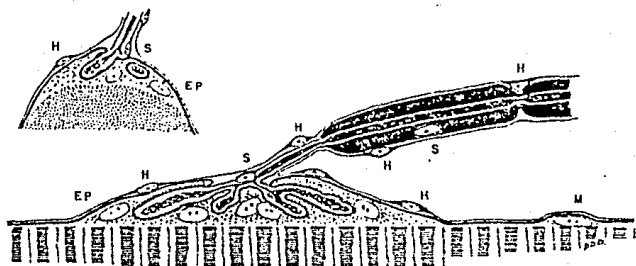


Figura No. 2

S) núcleo de células de Schwann, H) núcleo de fibroblasto EP) núcleo de fibra muscular localizado en placa terminal, M) núcleo de fibra muscular.



## 2.1 DENERVACION DEL MUSCULO

Cuando un músculo es denervado, la porción distal mantiene su excitabilidad hasta que el cilindroeje es dividido en fragmentos (después de 48 a 73 hrs). Aunque el músculo no pueda participar en ese momento en la actividad del sistema nervioso central, la región de la placa motora terminal retiene su excitabilidad eléctrica de 5 a 10 días después de la degeneración de la porción distal del nervio motor. Esto es durante el período en que los últimos fragmentos del cilindroeje en la placa motora terminal desaparecen. La excitabilidad de esta región disminuye en relación al resto de las fibras musculares; por el contrario, la excitabilidad a la Ach se incrementa, este incremento se inicia en lugares cercanos a la placa terminal degenerada, se extiende a lo largo de la membrana de la fibra muscular y en pocos días toda la fibra muscular se involucra (2,3). Antiguamente se pensaba que el incremento de sensibilidad a la Ach era la causa de las fasciculaciones espontáneas características del músculo denervado. Sin embargo se ha demostrado que tales potenciales de fibrilación solamente existen en la placa terminal (3).

En el músculo denervado se presentan múltiples cambios morfológicos como la pérdida del volumen total de la fibra, de masa mitocondrial proporcional a la reducción del tamaño de la fibra, su superficie se torna irregular y exhibe pequeñas proyecciones papilares (3).

La denervación del músculo es seguida por el crecimiento axonal de fibras nerviosas que se encuentran cerca del músculo denervado y de esta manera se reinerva y recupera su funcionalidad (figura No. 3). El crecimiento puede ocurrir de uno u otro nodo de Ranvier a lo largo del axón, crecimiento colateral o terminal (4).

Existen hipótesis para explicar el nuevo crecimiento a partir de axones motores intactos hacia músculos parcialmente denervados. Estudios recientes señalan que la fibra del músculo denervado elabora un agente promotor del crecimiento. Diversas evidencias apoyan esta hipótesis concluyendo que las terminaciones nerviosas reciben estimulación directa del músculo denervado restaurando nuevamente su inervación y así llegar a ser un músculo nuevamente normal (5,6).

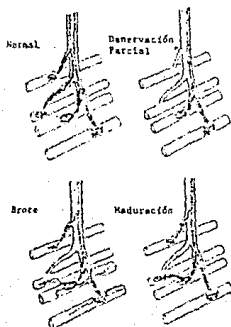


Figura No. 3

## 2.2 MUSCULO FETAL

En etapas tempranas del desarrollo embionario, las células blásticas predecesoras de las motoneuronas proliferan y se localizan en la región de las astas anteriores en la médula espinal. Inicialmente hay exceso de motoneuronas de las cuales solo una parte sobrevive. El crecimiento axonal se inicia en las motoneuronas y de alguna manera es dirigido hacia el músculo blanco. Se ha propuesto que durante este período la supervivencia, diferenciación y crecimiento de axones de motoneuronas depende de factores producidos por el músculo (16).

Cuando el axón llega al músculo se adhiere a este debido a la interacción de membrana a membrana o a la avidéz del axón para liberar o recibir algún factor de la célula muscular. El axón se fija e induce diferenciación subsináptica.

El resultado es la formación de una membrana postsináptica especializada en una estructura altamente plegable donde se localizan los receptores de acetilcolina y colinesterasa.

Otros axones ramificados se unen a la nueva placa terminal surgiendo una doble o múltiple inervación; estos axones compiten y solo uno sobrevive. Las motoneuronas que no han realizado conexiones periféricas con células musculares degeneran y se eliminan.

De algún modo la supervivencia de motoneuronas depende de la inervación periférica. La célula muscular inervada sufre di-

versos cambios a largo plazo como decremento de receptores de acetilcolina, ascenso en el potencial de membrana en reposo y un gran número de modificaciones bioquímicas y fisiológicas. Las conexiones pueden ser constantemente renovadas por crecimiento continuo y reorganización del nervio terminal (16).

### 2.3 ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) fué descrita por vez primera en 1869 por Charcot y Joffroy. Es una enfermedad crónica de etiología desconocida, caracterizada por una progresiva y fatal atrofia de la musculatura esquelética, debido principalmente a la degeneración de las neuronas motoras de las astas anteriores de la médula espinal y el tallo encefálico y en menor grado de la corteza cerebral.

#### Manifestaciones clínicas (18,19)

Atrofia muscular.- En la mayoría de los casos (84%) comienza en la parte distal de los miembros superiores y progresivamente asciende afectando la eminencia tenar, antebrazo, cintura escapular, deltoides y músculo supra e infraespinoso. La progresión centrípeta de debilidad y atrofia es el curso usual aunque no invariable, pudiendo comenzar en el antebrazo o en la cintura escapular, la atrofia resulta gradualmente más severa; en muchos pacientes la amiotrofia comienza unilateralmente pero resulta más o menos rápida bilateral y simétrica (figura No. 4).

Fasciculaciones.- Es un signo temprano que puede preceder a la atrofia y debilidad muscular, pudiendo afectar a músculos que parecen sanos, la exposición al frío, percusión, compresión o estimulación eléctrica pueden hacerlas aparentes.

- Síndrome piramidal.- La característica más importante de la amiotrofia es que está acompañada por signos de lesión de la vía piramidal, los reflejos miotáticos están aumentados, presentándose clonus patelar y aquileo.

- Síndrome bulbar.- Algunos pacientes con ELA sufren daño en las neuronas motoras bulbares inferiores, hay casos en los que está asociado con atrofia óptica, sordera y trastornos cerebrosos. Los trastornos del habla son comunes, hay dificultad para la fonación, disfagia, pérdida del reflejo nauseoso y existen a menudo fasciculaciones de los músculos de la lengua. Frecuentemente las atrofiaciones musculares son visibles, la lengua es flácida e inmóvil, el esternocleidomastoideo y el trapecio se encuentran atróficos, los músculos viscerales son afectados por atrofia del núcleo vagal, la motilidad esofágica está disminuida, se han reportado anormalidades cardíacas, Van Bogaert (1925) en sus estudios histológicos notó alta incidencia de afección de los núcleos vestibulares.

- Formas raras e inconstantes asociadas a ELA.

Trastornos sensoriales: Son raros, sin embargo espasmos musculares que son parte del trastorno muscular ocasionalmente producen sensación de quemadura punzante.

Trastornos vasomotores, secretorios y tróficos; existe aumento en la sudoración, secreción salival, sebácea, puede haber modi-

ficaciones en la circulación periférica de las extremidades con aspecto cianótico.

Trastornos cutáneos: se presentan anomalías morfológicas del tejido conectivo en la dermis con cambios degenerativos en la colágena y las fibras elásticas.

Trastornos psíquicos: Pierre Marie ha comentado la tendencia de algunos pacientes a cambios emocionales espontáneos con llanto.

La distribución de la ELA parece ser similar en todo el mundo, sin embargo en algunas áreas es endémica, particularmente la ELA que afecta a los habitantes del grupo étnico Chamorro en las islas de Guam y otras del grupo Mariana, la población nativa de las islas del Pacífico oeste y de la península Kii en Japón.

La tasa de frecuencia anual en el resto del mundo varía de 0.4 a 1.8 por 100,000 habitantes. El promedio por sexo es mayor en hombres en proporción 1.5 o 1.6, es una enfermedad predominante de la edad adulta con una edad promedio de inicio entre los 50 y 60 años. La duración promedio del padecimiento hasta la muerte es de 3 a 4 años, aunque algunos autores reportan duración promedio de 2.5 años (18,20).

La etiología es desconocida, se han propuesto diferentes hipótesis que tratan de explicar la patogénesis como son: virales, hormonales, tóxicas, genéticas e inmunológicas (12).

Varios estudios han reportado anticuerpos similares a valores control para herpes simples, sarampión coxsackie y arbovirus. No se ha confirmado por aislamiento viral positivo particularmente semejantes a virus reportados en algunos pacientes. Han sido negativos los estudios de transmisión en primates no humanos, utilizando múltiples especímenes de tejidos de pacientes de Guam y con el tipo esporádico de ELA.

El reconocimiento de enfermedades neurológicas progresivas causadas por infecciones virales persistentes asociadas a degeneración selectiva de neuronas como la poliomielitis sugiere la posibilidad que la ELA pueda ser causada por una infección crónica por poliovirus o un virus semejante.

La pérdida de unidades motoras y anormalidades electromiográficas han sido demostradas electrofisiológicamente en humanos después de los 60 años de edad, se ha postulado que la pérdida de neuronas motoras en la ELA pudiera representar un fenómeno relacionado con una deficiencia de una hormona neurotrófica elaborada por el músculo que estimula las células del cuerno anterior en su función por medio de un trastorno axonal retrógrado.



Muchos reportes han sugerido la posibilidad de función anormal de neurotransmisores. Nogata y colaboradores notaron disminuidos los sitios de receptores muscarínicos en los cuernos ventrales de la médula espinal. Whitehouse y colaboradores encontraron una reducción considerable en el número de receptores en áreas de pérdida de neuronas motoras. Zugler y asociados observaron niveles reducidos de GABA en Líquido Cefalorraquídeo (LCR) y niveles aumentados de norepinefrina en LCR y plasma de pacientes con ELA postulando que esos cambios probablemente afectan la neurotransmisión espinal (20).

La ELA ha sido motivo de varias investigaciones que han tratado de explicar su etiología sin embargo ninguna ha podido demostrarla.

Se han utilizado varios tratamientos incluyendo vitaminas E, D y B12, penincilamida y otros agentes quelantes, amitiptilina, L-Dopa, extracto pancreático, agentes antivirales, amantadina, isoprinosine, idoxiuridina, guanidina, neurotoxinas modificadas, factor de transferencia, interferón, lecitina, testosterona, naloxona, plamaferesis, etc. La hormona liberadora de tiotropina ha sido utilizada y ha mostrado que produce mejoría transitoria en las funciones de las neuronas motoras superior e inferior en cerca del 50% cuando se administra en dosis progresiva por infusión intravenosa de 1 a 5 horas, o solo una dosis intratecal; el mecanismo exacto es desconocido, sin embargo Keiji Imoto fracasó para demostrar la

efectividad terapéutica de esta hormona aunque refiere que estudios clínicos por mayor tiempo o la administración de dosis mayores pudiera estar justificada.

Por otro lado, la administración de alfa interferón intratecal, a dosis de un millón de unidades semanales no mostró mejoría. Actualmente se utiliza el DN-1417, un análogo de la hormona liberadora de tirotrópina, que tiene menos actividad endocrina pero más efecto estimulante en las células de los cuernos anteriores, sin embargo, 2 mg intramuscular dos veces al día por un mes no produjo mejoría objetiva de la fuerza muscular en 9 pacientes (19,21,22,23).



Figura No. 4

## 2.4 WESTERNBLOT

El Westernblot o Inmunoblot es una técnica inmunológica relativamente nueva, en 1977 Southern reportó el uso de la corriente eléctrica para la transferencia de DNA y fué dada a conocer cuando Towbin en 1979 publicó la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa (10).

El inmunoblot se fundamenta en el reconocimiento de antígenos transferidos a nitrocelulosa por anticuerpos específicos identificados por un segundo anticuerpo dirigido contra el primero y marcado con enzimas (figura No. 5).

Posee una sensibilidad muy alta, pueden ser detectados anticuerpos en bajos títulos, en un tiempo relativamente corto (9,10).

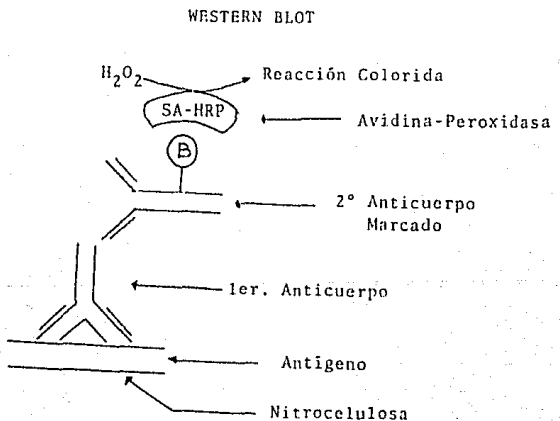


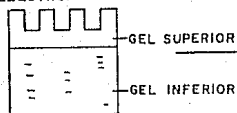
Figura No. 5

El westernblot consiste en: a) electroforésis vertical, b) electrotransferencia, c) inmunodetección.

La electroforésis vertical se realiza en geles discontinuos de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), consiste de un gel inferior de mayor longitud y concentración conocido como gel separador y un superior o concentrador. El SDS es un detergente aniónico que desnaturaliza a la proteína y le confiere una carga negativa, la migración no solo está determinada por el campo eléctrico, sino también por el peso molecular de la proteína.

Generalmente se coloca un marcador de pesos moleculares conocidos, en los corrimientos electroforéticos para poder calcular el peso molecular de las proteínas sometidas a electroforésis, terminada ésta se transfieren electroforéticamente las proteínas de los geles a membranas de nitrocelulosa. Después de la electrotransferencia se obtienen en la membrana de nitrocelulosa las proteínas fraccionadas que serán incubadas y expuestas con el primero y el segundo anticuerpo, finalmente se revela la reacción colorimétricamente con 4-l cloronaftol o diamino-benzidina. Si existen anticuerpos que reconozcan algunas proteínas que se encuentran en la membrana se obtienen bandas reactivas (figura No. 6) (8,10).

**ELECTROFORESIS**



**TRANSFERENCIA**

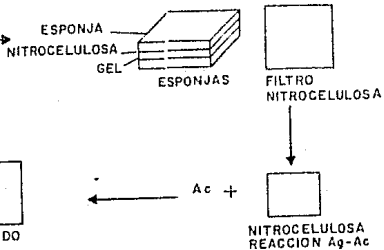


Figura No. 6

### 3. OBJETIVO

- Comparar el patrón de bandeo de proteínas liberadas por músculo esquelético denervado, adulto normal y fetal por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida.
  
- Estudiar la posible presencia de algún anticuerpo contra proteínas musculares en el suero de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

#### 4. HIPOTESIS

El músculo esquelético sintetiza un grupo de peptidos y proteínas denominados factores troficos que influyen en el proceso de inervación denervación, la cantidad de síntesis difiere dependiendo del estado de desarrollo e inervación.

Probablemente en los pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrofica (ELA) exista algún agente inhibitorio contra dichas proteínas evitando la reinervación, originando denervación progresiva.

## 5. MATERIAL Y METODO

### 5.1 Obtención del músculo

El músculo denervado se obtuvo seccionando transversalmente la médula espinal a nivel lumbar a cinco ratas, quince días después de la lesión se sacrificaron y se extrajeron los músculos de los miembros posteriores.

El músculo normal se extrajo de los miembros posteriores de una rata adulta.

El músculo fetal se obtuvo de las extremidades posteriores de fetos de rata a los 20 días de gestación.

### 5.2 Preparación del extracto

Los músculos fueron homogenizados y sonicados en solución salina sobre hielo 3 veces en un total de 10 minutos. Después se centrifugó a 15,000 rpm a 4°C durante 30 minutos y se colectó el sobrenadante. La determinación de proteínas del extracto se hizo según el método de Lowry et al. (1915), usando albumina de suero bovino (ASB) como estandar (7).



### 5.3 Obtención de sueros

Se obtuvo suero de 30 pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) 16 hombres y 14 mujeres con una edad promedio de 48 años y un tiempo de evolución de la enfermedad de 2.5 años. Adicionalmente, 30 sueros fueron usados como control, 10 provenían de pacientes con Miastenia Gravis, 10 de pacientes con Neuropatía diabética y 10 sujetos sanos, 16 mujeres y 14 hombres. El suero fué congelado a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## 5.4 WESTERNBLOT

### a) Electroforésis vertical

Las proteínas fueron fraccionadas en geles discontinuos de poliacrilamida que consiste de un gel inferior de mayor longitud y concentración, conocida como gel separador y un gel superior de menor longitud y concentración conocido como gel concentrador (8).

El extracto muscular (antígeno) fue mezclado volúmen a volúmen con el buffer de la muestra (0.08 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1 M mercaptoetanol, 1% SDS 1% glicerol y 0.2% de azul de bromofenol) la mezcla fué calentada a 100°C por 3 minutos.

Se usaron geles de 16 cm de largo por 15 cm de ancho y 1.5 mm de grosor conteniendo 10% de poliacrilamida y 1% de SDS. Se realizó en el Protean II vertical cell (Bio-Rad) en bufferes discontinuos de SDS de acuerdo a Laemli (1970) a 8°C. Se aplicaron 30mA de corriente para el gel superior y 35 mA para el gel inferior durante 5 hrs. con un agitador magnético para asegurar la continua mezcla de buffer.

Terminada la electroforesis, una parte del gel fué teñido con azul de comasie R-250 y el resto fué transferido a membranas de nitrocelulosa. El peso molecular de las proteínas fué determinado tomando en cuenta la migración de las proteínas estandar.

## b) Electrotransferencia

El extracto proteico previamente fraccionado por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% fué transferido a membranas de nitrocelulosa (MNC) como el descrito por Towbin et al. (1979) (10).

Los geles y las membranas de nitrocelulosa (0.045 m tamaño del poro) fueron preequilibrados en buffer de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 8.5 192 mM de glicina, 20% v/v de metanol, pH 8.3) por 20 minutos para eliminar parcialmente el SDS en el caso del gel.

El antígeno fué transferido a la MNC de la siguiente manera: se colocaron dos hojas de papel filtro (whatman No. 4) sobre un cojinete o esponja que a su vez se montaron en el marco de la camara de electrotransferencia (transblot cell Bio-Rad) el papel filtro fué humedecido con buffer de transferencia. Se colocó el gel sobre el papel filtro y se agregaron 20 ml del mismo buffer, sobre el gel fué colocada cuidadosamente la membrana de nitrocelulosa evitando la formación de burbujas. Sobre la MNC se colocaron dos hojas de papel filtro humedecidas, la otra fibra o esponja y el segundo marco de plástico. El conjunto fué introducido verticalmente en la camara de electrotransferencia, se llenó con buffer de transferencia quedando el polo positivo del lado de la MNC y el negativo del lado del gel se aplicó una corriente continua de 1 A por 1 hr. (9,10). Terminada la electrotransferencia la MNC se recortó en carriles de 0.5 cm de

ancho, para comprobar la transferencia de proteínas, dos tiras se tiñeron con amido black 0.1%, en 45% de metanol y 10% de ácido acético 2 minutos y se destiñeron con metanol al 20% y ácido acético al 1%.

### c) Inmunodetección

Después de la transferencia de proteínas, las membranas de nitrocelulosa (MNC) se incubaron en albúmina de suero bovino (ASB) al 3% a 4°C una noche para bloquear los sitios libres en el papel.

La nitrocelulosa fué lavada 4 veces con agitación lenta durante períodos de cinco minutos con buffer de fosfatos (PBS) tween al 0.1%. Se incubó con los sueros de pacientes con ELA en dilución 1:30 en PBS toda la noche a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente y se incubó con el segundo anticuerpo marcado, proteína A biotinada diluida 1:400 en PBS tween 0.1% 1 hr. con agitación lenta a temperatura ambiente (11).

Posteriormente se incubaron con streptoavidin peroxidasa diluida 1:400 en PBS tween 0.1% por 30 minutos con agitación lenta, se lavaron 3 veces por 5 minutos con PBS. Finalmente se incubaron de 2 a 5 minutos en una solución que contenía 25 mg. de diaminobenzidina, 50 ml de PBS y 150 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (figura No. 7). Esta solución debe prepararse segundos antes de usarse. Al término de la reacción las MNC se lavaron en agua destilada, se secaron y se guardaron protegiéndolas de la luz.

## Western blot

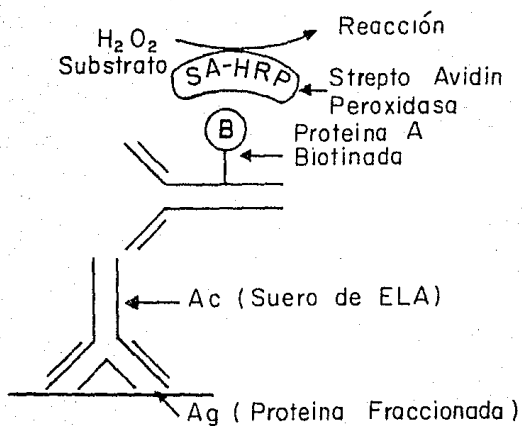


Figura No. 7

## 6. RESULTADOS

En la separación electroforética son visibles diferentes bandas para cada extracto de músculo esquelético.

En el músculo fetal se observaron bandas en un rango de peso molecular de 30 a 100 Kd. En contraste, en el músculo adulto normal y denervado se observan en un rango más amplio de 14 a 100 Kd (figura No. 8).

Cuando se incubaron las proteínas del extracto de músculo adulto normal y denervado con los sueros de ELA y los controles no se observaron líneas reactivas. Ocasionalmente mostraban algunas bandas, sin embargo estas bandas fueron similarmente observadas en sueros controles y de ELA (figura No. 10).

En contraste, cuando se incubó el suero de pacientes con ELA con extracto de proteína de músculo fetal de rata se observaron múltiples bandas, mientras que los sueros controles presentaban ocasionalmente algunas bandas (figura No. 10). Las bandas observadas con el suero de ELA se ubicaban a diferente peso molecular que variaba de 42 a 95 Kd, no reaccionó una proteína en común para la mayoría de los sueros de ELA.

De los 30 sueros de pacientes con ELA, 26 de ellos (87%) reaccionaron con proteínas de extracto de músculo fetal; un total de 72 bandas fueron claramente definidas (tabla No. 1) con un promedio de 2.4 bandas por pacientes. Cuatro sueros (13%) de

pacientes con ELA no reaccionaron (tabla No. 2). De los 30 sueros control, se identificaron un total de 15 bandas, un promedio de 0.5 bandas por sujeto (tabla No. 3). Se observó una proteína de 66 Kd tanto en los sueros de ELA y controles, esta banda fué eliminada del conteo.

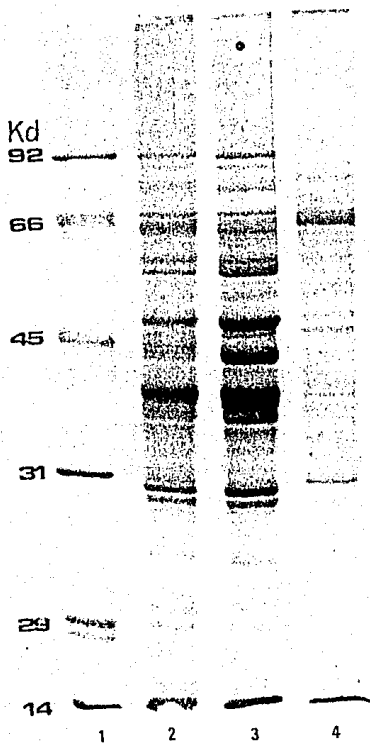


Figura No. 8

Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS al 10% teñido con azul de comasie R-250 de proteínas de músculo esquelético animal. 1) marcador de pesos moleculares en Kilodaltons 2) músculo normal 3) músculo denervado 4) músculo fetal.



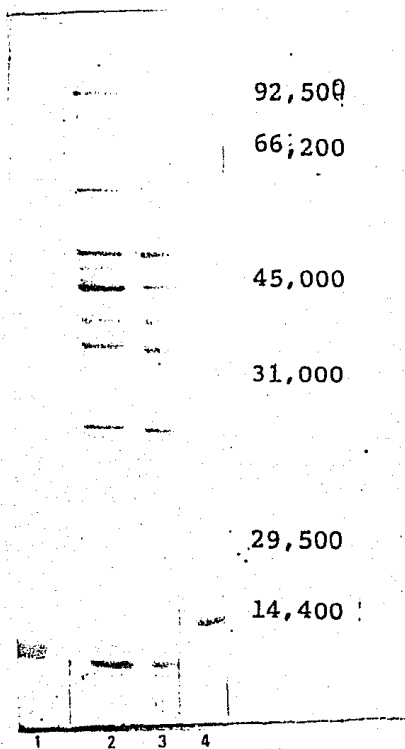


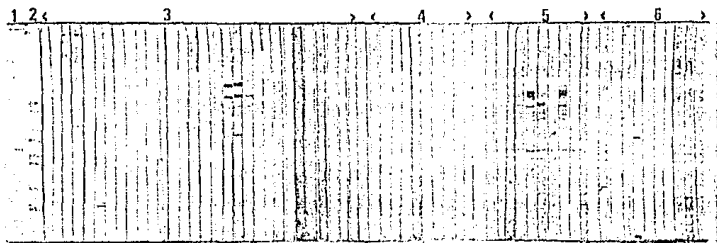
Figura No. 9

Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa 1) músculo fetal 2) músculo normal 3) músculo denervado 4) marcadores de pesos moleculares.

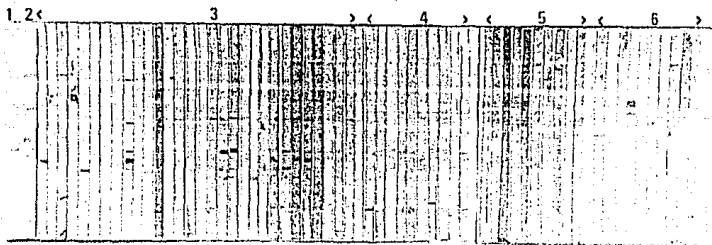
Figura No. 10

Proteínas de músculo esquelético de rata. A) denervado B) normal C) fetal, reaccionaron con 30 sueros de pacientes con ELA y 30 sueros controles. 1) marcador de pesos moleculares 2) electroforesis de proteínas teñido con amido black 3) sueros de ELA 4) sujetos saludables 5) pacientes con miastenia 6) pacientes diabéticos.

A



B



C

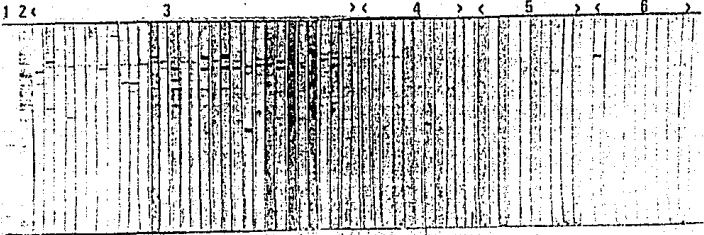


TABLA No. 1

Número de bandas reactivas

Extracto de músculo	Suero	
	ELA	Controles
Denervado	15	--
Normal	34	1
Fetal	72	15

Tabla No. 2

Número de bandas por paciente  
con sueros de ELA

No. de paciente	Extracto de musculo de rata		
	Denervado	Normal	Fetal
1	-	2	2
2	-	2	2
3	1	2	2
4	-	1	3
5	1	4	1
6	6	1	1
7	-	3	4
8	-	1	2
9	-	5	3
10	-	-	6
11	-	1	1
12	-	-	3
13	-	-	2
14	-	-	5
15	-	-	-
16	-	-	2
17	-	-	3
18	3	3	-
19	3	4	3
20	1	-	1
21	-	-	2
22	-	-	2
23	-	-	-
24	-	2	2
25	-	1	4
26	-	2	2
27	-	-	3
28	-	-	2
29	-	-	4
30	-	-	-
<b>TOTAL</b>	15	34	72

Table No. 3

Número de bandas por individuo  
con sueros control

No. de Individuo	Extracto de músculo de rata		
	Denervado	Normal	Fetal
1	-	-	-
2	-	-	1
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	2
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	1	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	1
14	-	-	2
15	-	-	2
16	-	-	-
17	-	-	2
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	-	-
21	-	-	1
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	1
25	-	-	-
26	-	-	2
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
30	-	-	1
TOTAL	-	1	15

\*Sujetos sanos 1-10, pacientes con miastenia gravis 11-20, pacientes con Neuropatía diabética 21-30.

## 7. DISCUSION

En la separación electroforética de las proteínas de los extractos de músculo esquelético encontramos diferencias en el bandeo de músculo fetal comparándolo con el denervado y normal. Esto demuestra que existen proteínas en el músculo esquelético fetal que no se encuentran en el músculo normal ni en el denervado, probablemente dichas proteínas están involucradas en el proceso de inervación-denervación.

El músculo esquelético está continuamente inervándose y denervándose, este proceso de inervación-denervación es común en músculos que inician movimiento como es el caso del músculo fetal y músculos que aumentan de volumen debido a la intensa actividad por ejercicio. Por el contrario, en otras circunstancias los músculos se atrofian o denervan debido a alguna enfermedad neuromuscular, así como a la falta de actividad o movimiento.

Existen evidencias apoyando que los factores liberados por el músculo esquelético estimulan el crecimiento y sobrevivencia de motoneuronas (12). El análisis de factores neurotróficos específicos para el sistema motor han sido provados en cultivos de tejidos. Se ha visto que la adición del músculo esquelético a cultivos de cordón espinal, aumenta el tiempo de sobrevivencia de neuronas, promueven el crecimiento de neuritas e incrementan la actividad de la colina y acetiltransferasa (13).

Proteínas liberadas del músculo esquelético humano, de rata y ternera tienen efectos similares en la sobrevivencia neu-

ronal, crecimiento neurítico y aumento de síntesis de acetilcolina (14).

Dichos efectos son específicos del músculo esquelético, se han probado extractos de otros tejidos incluyendo músculo cardíaco, cerebro, hígado, bazo y riñón, no tienen efectos sobre procesos de crecimiento o densidad de células de astas ventrales. Esto demuestra la complejidad de factores neurotróficos que están presentes en el músculo esquelético (14).

De este grupo de factores tróficos únicamente se ha identificado el factor de crecimiento neural (FCN) del resto se sabe de su existencia y su probable relación con la innervación.

Los factores tróficos que influyen en la sobrevivencia y crecimiento de motoneurona, son liberados continuamente para estimular el axón motor y renervar los músculos que se denervan o aumentan de volumen. Quizá dichos factores pueden estar relacionados con la patogénesis de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

Los pacientes con ELA sufren atrofia de la musculatura esquelética debido a la denervación constante. Si existe denervación, ¿por qué no sucede una subsecuente renervación? esta pregunta se ha formulado varias veces sin encontrar respuesta.



Han sido postuladas varias hipótesis y realizado varios trabajos sin encontrar ningún argumento que explique la etiología de dicha enfermedad. Recientemente Gurney y colaboradores propusieron una nueva hipótesis sobre el mecanismo etiopatogénico de ELA; la posible presencia de un factor inmune que inhibe el brote axonal y la subsecuente reinervación del músculo esquelético (30). Aunque estos resultados no han sido comprobados por otros autores, la idea amerita nuevas investigaciones para un desorden que ha sido resistente por varios años a la identificación de su mecanismo etiopatogénico.

En nuestro estudio al hacer reaccionar los sueros de pacientes con ELA con las proteínas fraccionadas de músculo esquelético normal y denervado no hubo reacción, estos resultados confirman estudios previos (1). En contraste con las proteínas de músculo fetal en las que hubo intensa reacción cinco veces más frecuente que en los sueros controles (sujetos sanos, pacientes con miastenia gravis y diabéticos con neuropatía crónica), la reacción fue con varias proteínas de diferente peso molecular. La reacción observada en los inmunoblot (bandas o líneas) nos indica que hubo un reconocimiento antígeno-anticuerpo. La presencia de anticuerpos (Ac) contra proteínas de músculo fetal no es fácilmente explicada como un proceso de producción secundaria de autoanticuerpos debido a la destrucción del músculo que toma lugar constantemente en los pacientes con ELA después de la denervación (31), en tal caso los anticuerpos podrían ser dirigidos a antígenos presentes en músculo de-

FRENTE  
CENTRO DE LA INVESTIGACION  
MÉDICA Y BIOLÓGICA

nervado o adulto. Nuestro estudio muestra una significativa cantidad de anticuerpos en pacientes con ELA contra proteínas presentes solamente en músculo fetal que no encontramos en músculo adulto o denervado.

El hallazgo de anticuerpos en el suero de pacientes que reacciona con varias proteínas de músculo fetal y no con una sola es confundible y fundamenta un simple mecanismo patogénico involucrado en la producción de estos anticuerpos.

Nuestros resultados parecen estar más relacionados a una respuesta inmune humoral contra un grupo de proteínas transitorias del músculo relacionadas con el proceso de diferenciación o con el proceso de inervación/denervación del músculo que toma lugar durante el desarrollo fetal (24). Si este es el caso, se formulan algunos argumentos: ELA es un desorden de edad adulta, ¿por qué anticuerpos contra proteínas de tejido fetal son encontrados?. Recientemente ha sido demostrado un factor neurotrófico presente en músculo, involucrado en la regulación de sobrevivencia de motoneuronas in vivo (32). Este factor está presente en abundantes cantidades en músculo fetal; éste actúa solamente sobre motoneuronas de médula espinal y es inefectivo en neuronas sensoriales simpáticas, parasimpáticas y colinérgicas, este factor neurotrófico está cercanamente involucrado en la sobrevivencia de motoneuronas in vivo (32). Aunque la producción de factores motoneurotróficos (FMNT) por músculo adulto no ha sido demostrado, es concebible la idea de constante producción

de FMNT en pequeñas cantidades por músculo diferenciado para reestablecer la denervación que ocurre normalmente y promover la sobrevivencia de motoneuronas durante la vida posnatal. Los anticuerpos encontrados en el suero de ELA pueden estar dirigidos contra FMNTs evitando la reinnervación del músculo, afectando directamente su innervación, esto puede explicar la lenta progresión de la enfermedad y el selectivo daño de motoneuronas en ELA, aunque esto no puede explicar la lesión de la región piramidal a menos que ocurra degeneración retrógrada trans-sináptica de motoneurona superior. Sin embargo, si estos anticuerpos son dirigidos contra FMNTs liberados por el músculo de pacientes con ELA; ¿por qué no encontramos bandas en músculo adulto o denervado?. La posible explicación es que la cantidad de FMNTs liberados por el músculo adulto es mínima en algún momento dado y no detectable por el westernblot, como el proceso patológico en ELA es delicado toma algunos meses. De esta manera es fácil demostrar la presencia de anticuerpos contra FMNTs usando como antígeno preparaciones de músculo, que tiene abundantes cantidades de FMNTs el músculo fetal. Un punto importante de señalar es: ¿por qué se encontraron algunas bandas de diferente peso molecular con extracto de músculo fetal, y no con una sola banda si el anticuerpo fue dirigido contra un hipotético FMNT. La respuesta puede ser que estos anticuerpos reaccionan con varios FMNTs fetales y no con uno solo, de hecho algunos otros factores como la molécula de adhesión de célula neural (neural cell adhesion molecule N-CAM) ha sido descrito en músculo embrionario (33). Además durante el creci-

miento del nervio, otros factores tróficos como la proteína GAP-43 ha sido encontrado como un componente abundante de conos de crecimiento (34).

Otros autores han fracasado en demostrar anticuerpos en suero de ELA contra factores liberados por el músculo (35,1), en estos estudios se han usado sustancias solubles recuperadas de medio de cultivo. Es posible que las proteínas reactivas en contradas en nuestro estudio no son liberadas por músculo, sino que están presentes sobre su superficie y se demuestran usando extractos de músculo en lugar de factores metabólicos liberados por el músculo en cultivo. Se ha demostrado que la membrana de soporte de miofibrilos responde a neurotransmisores de neuronas, esta función no puede ser realizada con medio condicionado de músculo, mostrando que la regulación de quimiosensibilidad es por contacto de neuronas con la membrana de célula blanco (36), y el reconocimiento del sitio específico es importante para las terminales del cono de crecimiento (37).

Ha sido mostrada la regeneración de las motoneuronas después de la sección de axones en la periferia, muestran una previa forma no descrita de sinaptogénesis regenerativa, demostrando con esto que las motoneuronas pueden formar nuevos contactos sinápticos con axones supernumerarios si la sección es hecha cerca de la terminal sináptica (26). En los pacientes con ELA ésta posibilidad de nuevos contactos puede ser impedido por un defecto en el mecanismo de renervación relacionado con anticuer

pos contra factores neurotróficos del músculo.

Durante el proceso de diferenciación del músculo humano, están presentes algunos antígenos como Thy-1 en mioblastos pero se pierden en miotubos multinucleados mostrando grandes cambios durante la miogénesis humana, estos cambios pueden estar presentes en la vida posnatal y relacionados con el crecimiento de la masa muscular por el ejercicio (27). Los cambios en proteínas del músculo pueden crear cambios antigénicos induciendo una respuesta autoinmune anormal contra proteínas presentes exclusivamente en etapas primarias de diferenciación y crecimiento del músculo principalmente cuando el proceso de inervación por motoneurona es estimulado por factores locales producidos por el músculo (27,28).

La reacción encontrada en los inmunoblot nos indica un reconocimiento antígeno-anticuerpo pero no se puede determinar si este anticuerpo representa importancia patogénica primaria o una respuesta secundaria a la destrucción neuromuscular. Sin embargo esto puede explicar varias interrogantes de esta enfermedad y motiva a la realización de investigaciones posteriores a nivel molecular sobre la inervación del músculo en pacientes con ELA.

#### 8. REFERENCIAS

- 1.- Hauser SL, Cazenave PA, Lyon-Caen O. et al. Immunoblot analysis of circulating antibodies against muscle proteins in amyotrophic lateral sclerosis and other neurologic diseases. *Neurology* 1986;36:1614-1617.
- 2.- Walton J. Disorders of voluntary muscle. London and New York: Ed churchill livingstone 4ta ed 1981.
- 3.- Byron AK, Raymond DA, Diseases of muscle. México: Ed Karper Raww Publisher, 4ta ed, 1985; 1-156.
- 4.- Iront R, Brow MC, Holland RL. Stimuli to intramuscular nerve growth. *Brain Res* 1978;156: 351-354.
- 5.- Drachman DB, Witzke F. Trophic regulation of acetylcholine sensitivity of muscle effect of electrical stimulation. *Science* 1972;176: 514-516.
- 6.- Lomot and Rosenthal J. Central of acetylcholine sensitivity by muscle activity in the rat. *J. physiol (London)* 1972;221: 493-513.
- 7.- Lowry OH, Rosebrough NJ, Faro AL, Rondall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 1951; 193: 265-275.

- 8.- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227: 680-685.
- 9.- Towbin H and Gordon. Immunoblotting and dot immunobinding current status and outlook. J. immunological methods 1984; 72: 313-340.
- 10.- Towbin H, Staenlin T, Gordon J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheat: procedures and some applications. Proc. Natl. Acad Sci USA 1979;76: 4350-4.
- 11.- Langone JJ. Use of labeled protein A in quantitative immunochemical analysis of antigens and antibodies. J. Immunological Methods 1982;51: 3-22.
- 12.- Appel SH, Smith RG, Vaca K, Mc Manaman J. Neurotrophic factors and the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. In: Serratrice G, ed. Neuromuscular Diseases. New York: Raven Press. 1984: 347-351.
- 13.- Guillen EL, Neale JN, Bullock PN, Schrier SK, Nelson PC. Choline acetyltransferase activity of spinal cordon cell cultures increased by coculture with muscle and muscle cells. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1977;78: 2625-2629.

- 14.- Smith RG, Appel SH. Evidence for a skeletal muscle protein  
Tenhances neuron survival neurite extension and acetylcho-  
line synthesis. Neurosci Abstr 1981;7: 144.
- 15.- Longo FM, Manthorpe M, Varon S. Spinal Cord Neuronotrophic  
Factors (SCNTFs): I. Bioassay of schwannoma and other condi-  
tioned media. Devl Brain Res 1982;3: 277-294.
- 16.- Drachman BD. Trophic interactions between nerves and mus-  
cles. In Serratrice G, ed. Neuromuscular disease. New  
York: Raven Press. 1984: 391-392.
- 17.- Bonduelle M. Amyotrophic lateral sclerosis. In: Vinken PJ,  
and Brüyñ GW. (Eds) Handbook of Clinical Neurology. North  
Holland, Amsterdam 1975, Vol 22, Cap 13; 280-338.
- 18.- Colmant HJ. Progressive bulbar palsy in adults. In: Vinken  
PJ, Brüyñ GW. (Eds) Handbook of Clinical Neurology. North  
Holland, Amsterdam 1975, Vol 22, Cap 16; 111-156.
- 19.- Tandan R, Bradley WG. Amyotrophic lateral sclerosis: part  
1. clinical features, pathology and ethical issues in man-  
agement. Ann Neurol 1985;18: 271-280.
- 20.- Tandan R, Bradley WG. Amyotrophic lateral sclerosis: part  
2. etiopathogenesis. Ann Neurol 1985;18: 419-431.



- 21.- Hawley RJ, Kratz R, Goodman RR. Treatment of amyotrophic lateral sclerosis with the TRH analog DN-1417. *Neurology* 1987;37: 715-717.
- 22.- Imoto K, Saida K, Iwamura K. Amyotrophic lateral sclerosis a double-blind crossover trial of thyrotropin-releasing hormone. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry* 1984;47: 1332-1334.
- 23.- Mora JS, Munsat TL, Kao KP. Intrathecal administration of natural human interferon alpha in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1986;36: 1137-1140.
- 24.- Sadoul R, Hir M, Deagostine-Basin H, et al. Adult and embryonic muscle neural cell adhesion molecules have different binding properties. *Nature* 1983;304: 347-349.
- 25.- Nurcombe V, Tauts S, Bennet MR. Motoneurone survival and neuritic outgrowth promoted by different cell types in embryonic muscle. *Dev Brain Res* 1985;21:49-60.
- 26.- Havton L, Kellerth JO. Regeneration by supernumerary axons with synaptic terminals in spinal motoneurons of cats. *Nature* 1987;325: 711-714.
- 27.- Walsh FS, Ritter MA. Surface antigen differentiation during human myogenesis in culture. *Nature* 1983;289: 60-64.

- 28.- Bennet MR, Lai K, Nurcombe V. Identification of embryonic motoneurons in vitro: Their survival is dependent on skeletal muscle. *Brain Res* 1980;190: 537-542.
- 29.- Dennis MJ, Ziskind-Conhaim L, Harris AJ. Development of neuromuscular junctions in rat embryos. *Dev Biol* 1981;81: 266-279.
- 30.- Gurney ME, Belton AC, Cashman N, Antel JP. Inhibition of terminal axonal sprouting by serum from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 1984;311: 933-939.
- 31.- Brow RH, Johnson D, Ogonowski BA, Weiner HL. Antineural antibodies in the serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1987;37: 152-155.
- 32.- Openheim RW, Haverkamp LJ, Prevette D, et al. Reduction of naturally occurring motoneuron death in vivo by a target-derived neurotrophic factor. *Science* 1988;240: 919-22.
- 33.- Grumet M, Rutishauser U, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule is on embryonic muscle cells and mediates adhesion to nerve cells in vitro. *Nature* 1982;295: 693-695.
- 34.- Skene JP, Jacobson Rd, Snipes GJ, Mc Guire CB, Norden JJ, Freeman JA. A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth cone membranes. *Science* 1986; 233: 783-786.

- 35.- Ingvar-Maeden M, Regli F, Steck AJ. Search for antibodies to skeletal muscle protein in amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neurol. Scand. 1986;74: 218-223.
- 36.- Tuttle JB. Interaction with membrane remnants of target myotubes maintains transmitter sensitivity of cultured neurons. Science 1983;220: 977-979.
- 37.- Kuwada JY. Cell recognition by neuronal growth cones in a simple vertebrate embryo. Science 1986;233: 740-746.