

03466



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**Facultad de Ciencias**

División de Estudios de Posgrado

**MANIFESTACIONES DEL SISTEMA INMUNE EN  
PADECIMIENTOS NEUROMUSCULARES.**

**T E S I S**

**Que para obtener el Grado Académico de  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)**

**p r e s e n t a  
GRACIELA ORDOÑEZ LOZANO**

Director de Tesis:  
MED. CIR. JULIO EVERARDO SOTELO MORALES

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**1993**



## **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

1.- RESUMEN.....	1
2.- ANTECEDENTES.....	3
3.- INTRODUCCION .....	6
3.1 Anatomía de la médula espinal.....	11
3.2 Músculo esquelético.....	16
3.3 Electromiografía .....	22
3.4 Patología del sistema nervioso central...	24
4.- HIPOTESIS .....	28
5.- OBJETIVO.....	29
6.- MATERIAL Y METODO .....	30
6.1 Preparación del antígeno.....	30
6.2 Esquema de inmunización .....	30
6.3 Westernblot.....	31
6.4 Doble difusión (Ouchterlony).....	36
6.5 Electromiografía .....	37
6.6 Estudio Histológico .....	37
6.7 Morfometría de fibras musculares .....	39
7.- RESULTADOS.....	41
8.- DISCUSION .....	69
9.- ANEXOS .....	75
10.- BIBLIOGRAFIA .....	88

## 1. RESUMEN

El sistema inmune puede contribuir al desarrollo de enfermedades autoinmunes a través de numerosos mecanismos. Múltiples estudios de la función inmune en Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) aún no han definido su posible participación en la patogenia (1). Sin embargo, se ha demostrado la presencia de anticuerpos (Ac) en el suero de pacientes con ELA que reaccionan con varias proteínas de músculo fetal de rata. Esto puede representar una respuesta inmune humoral contra un grupo de proteínas efímeras, relacionadas con el proceso de diferenciación o de inervación - denervación del músculo que ocurre en el desarrollo fetal (2).

En el presente trabajo tratamos de establecer un modelo experimental de ELA, inmunizando conejos con proteínas de músculo esquelético fetal de rata. Mediante técnicas inmunológicas como Westernblot, histoquímicas, histológicas y estudios electrofisiológicos, se analizaron los efectos de dichos Ac en músculo esquelético y médula espinal. Los resultados obtenidos en Westernblot muestran una intensa reacción contra las proteínas fraccionadas en los geles de poliacrilamida, sin embargo, en el estudio electrofisiológico, histológico e histoquímico no se observan alteraciones o cambios patológicos semejantes a los observados en la ELA en músculo esquelético y neuronas motoras de astas anteriores de médula espinal.

Probablemente los anticuerpos contra proteínas de músculo fetal de rata previamente encontrados en el suero de pacientes con ELA, se presentan en etapas terminales de la enfermedad o bien se requiera de mayor tiempo para apreciar algún daño en los modelos experimentales.

## 2. ANTECEDENTES

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neuromuscular de etiología desconocida. Múltiples estudios han buscado factores autoinmunes como la presencia de anticuerpos en suero de pacientes con ELA contra factores liberados por músculo esquelético (4,5). Gurney y colaboradores reportaron que el suero de pacientes con ELA suprime el crecimiento del nervio terminal de rata, inducido por toxina botulínica, sugiriendo por análisis de inmunoblot que la actividad bloqueadora es mediada por autoanticuerpos que reaccionan con una proteína de 56 kilodaltons en cultivo de músculo de rata (6). Sin embargo, este hallazgo no ha sido comprobado por otros autores demostrando que no hay patrón de bandeo único o característico de ELA (4). Se ha demostrado que en suero de pacientes con ELA no existen anticuerpos (Ac) dirigidos contra neuronas motoras aisladas de un paciente que murió de ELA y cultivadas por 24 a 72 horas (1,3).

Se han observado alteraciones en el metabolismo de glutamato, siendo este uno de los principales neurotransmisores excitatorios de la vía corticoespinal, que se encuentra intensamente afectada en la ELA. Las concentraciones de aspartato, glutamato y glicina están ligeramente elevadas en el plasma de estos pacientes. Sin embargo no se observa relación entre los niveles de dichos aminoácidos con la severidad y duración de la ELA (21).

Otros estudios han demostrado la presencia de Ac contra el gangliósido GM1, que son un grupo de glicolípidos de función desconocida presente en las membranas de células neuronales, especialmente en las terminaciones nerviosas; siendo este el más abundante en mielina (22,23,24). Existen evidencias apoyando que factores liberados por el músculo esquelético estimulan el crecimiento y sobrevivencia de motoneurona (10). Proteínas liberadas del músculo esquelético humano, de rata y ternera, tienen efectos similares en la supervivencia neuronal, crecimiento neurítico y aumento de síntesis de acetilcolina. Dichos efectos son específicos del músculo esquelético, se han probado extractos de otros tejidos, incluyendo músculo cardiaco, cerebro, hígado, bazo y riñón, no tienen efectos sobre procesos de crecimiento o densidad de células de astas ventrales. Los factores tróficos que influyen en la supervivencia y crecimiento de motoneurona son liberados continuamente para estimular el axón motor y reinervar los músculos que se denervan o aumentan de volumen (45). Probablemente éstos factores estén relacionados con la patogenia de ELA. En un estudio previo nosotros demostramos la presencia de auto-anticuerpos contra proteínas de músculo fetal de rata en suero de pacientes con ELA. Al hacer reaccionar los sueros de estos pacientes con proteínas fraccionadas en geles de poliacrilamida de músculo esquelético normal, denervado humano de rata y de un niño recién nacido no hubo reacción. Sin embargo se observaron bandas reactivas con algunas proteínas de músculo fetal de rata, cinco veces más frecuentemente en los sueros de ELA que en controles (figura 1). Esta reacción nos indica que hubo un reconocimiento antígeno-anticuerpo, los resultados

parecen estar relacionados a una respuesta inmune humoral contra un grupo de proteínas efimeras del músculo esquelético relacionadas con el proceso de diferenciación o de inervación-denervación del músculo que toma lugar durante el desarrollo fetal. Tuvimos particular interés en el músculo fetal en las ultimas etapas de desarrollo embrionario por el intenso crecimiento neurítico y la constante actividad de inervación/denervación como un proceso normal de interacción neuromuscular.

Sin embargo no podemos determinar si estos anticuerpos están relacionados con la etiología de la enfermedad o bien es una respuesta secundaria a la destrucción neuromuscular (2).



### 3. INTRODUCCION

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad crónica de etiología desconocida, caracterizada por atrofia progresiva y fatal de la musculatura esquelética, debida principalmente a la degeneración de las neuronas motoras de las astas anteriores de la médula espinal, tallo encefálico y en menor grado corteza cerebral (7).

#### Manifestaciones clínicas (7,8)

- a) **Atrofia muscular:** En la mayoría de los casos (84%) comienza en la parte distal de miembros superiores y progresivamente asciende afectando antebrazo, cintura escapular, deltoides y músculo supra espinoso (figura 2).
- b) **Fasciculaciones:** Es un signo temprano que puede preceder a la atrofia y debilidad muscular y corresponde a contracturas aisladas y espontáneas de fibras musculares.
- c) **Síndrome piramidal:** La característica más importante de la amiotrofia es que está acompañada por signos de lesión de las vías piramidales como aumento en los reflejos miotáticos.
- d) **Síndrome bulbar:** Algunos pacientes con ELA sufren daño en las neuronas motoras bulbares inferiores, y presentan trastornos del habla, dificultad para la fonación, disfagia, pérdida del reflejo nauseoso y fasciculaciones del músculo de la lengua.

La distribución de 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 en el Pacífico Sur. 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 un promedio de inicio entre los 50 y 60 años (7,9). La etiología es desconocida, se han propuesto diferentes hipótesis que tratan de explicar su patogenia tanto infecciones virales, alteraciones hormonales, genéticas o inmunológicas (10).

Se han utilizado varios tratamientos incluyendo vitamina E, D y B12, penicilamida y otros agentes quelantes, amitriptilina, DOPA, extracto pancreático, agentes antivirales, amantadina etc. Actualmente se utiliza el Dn-417, un análogo de la hormona liberadora de la tirotropina, que tiene menor actividad endocrina pero mayor efecto estimulante en las células de las astas anteriores (8,11,12,13).

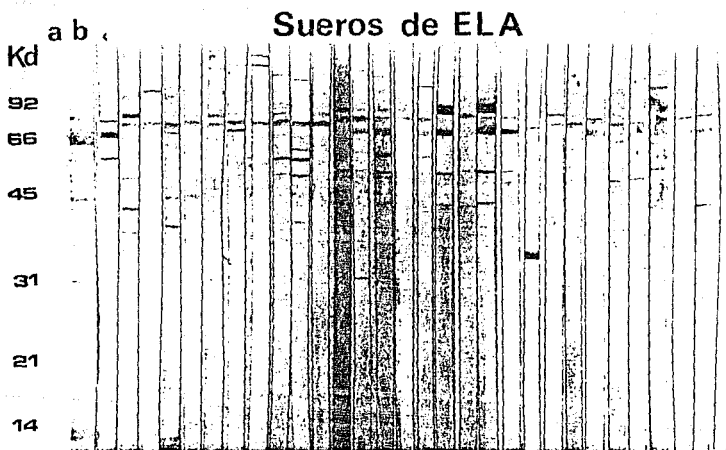


FIGURA 1

Inmunoblots de proteínas de músculo fetal de rata, incubados con 30 sueros de pacientes con ELA. a) Marcador de pesos moleculares, b) electroforesis de proteínas de músculo fetal teñidas con amidoblack.

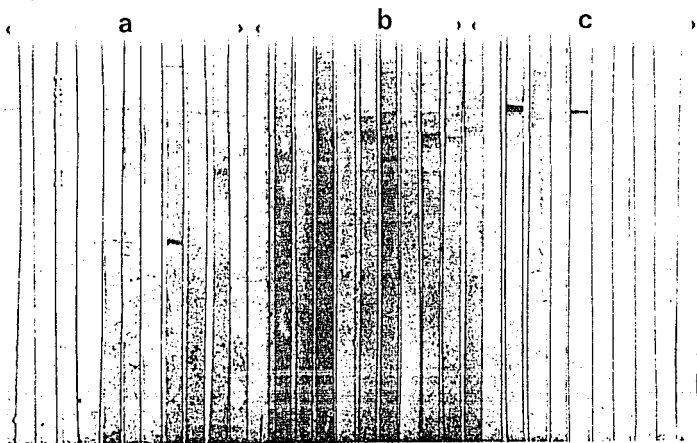


FIGURA 1a

Inmunoblots de proteínas de músculo fetal de rata incubados con 30 sueros controles. a) sujetos sanos, b) pacientes con Miastenia Gravis, c) pacientes diabéticos.



FIGURA 2

Paciente con ELA, obsérvese la disminución de la masa muscular adquiriendo un aspecto cadavérico (tomada de Human motor neuron diseases; Rowland L.).

### 3.1 ANATOMIA DE LA MEDULA ESPINAL

La médula espinal está constituida de sustancia blanca, formada principalmente por axones agrupados en tractos, y sustancia gris, donde están los cuerpos celulares con sus dendritas y células gliales. La sustancia gris, en cortes transversales se observa su forma de H o mariposa y esta subdividida en dos astas anteriores en las cuales se encuentran los núcleos motores que inervan el músculo esquelético y dos astas posteriores (17).

La sustancia gris ha sido mapeada en 10 láminas celulares orientadas en sentido dorsoventral (láminas de Rexed); este sistema de división proporciona una identificación precisa de áreas de interés (figura 3) (31). Las láminas I a IV corresponden a la cabeza del asta dorsal; la V al cuello y VI a la base. La lámina VII se encuentra en la zona intermedia entre las astas dorsal y ventral, la VIII y IX se hallan en el asta ventral y la X se ubica en torno al conducto ependimario.

Lámina I. Formada por células pequeñas medianas y grandes.

Lámina II. Contiene células pequeñas densamente acumuladas especialmente hacia la parte dorsal de la lámina. Corresponde a la sustancia gelatinosa de Rolando.

Lámina III. Sus células son menos agrupadas que la de láminas anteriores y son generalmente de mayor tamaño.

Lámina IV. Sus células están diseminadas y son de volumen variable. Hay gran número de fibras en esta capa.

Lámina V.- Se divide en dos zonas, medial y lateral; esta última contiene más células que la porción medial.

Lámina VI. Dividida en dos zonas, medial y lateral. La primera contiene células más pequeñas y densamente acumuladas que la parte lateral.

Lámina VII. En esta lámina se halla el núcleo de Clarke hacia la parte medial y el núcleo intermedio lateralmente.

Lámina VIII. Sus células son en gran parte, de forma estrellada o triangular y de tamaño variable.

Lámina IX. Incluye neuronas motoras cuyos axones forman las raíces anteriores de los nervios espinales e inervan los músculos esqueléticos. Tales células varían en tamaño, especialmente aquellas que emergen las fibras eferentes gama hacia los husos neuromusculares. Sin embargo más numerosas que estas neuronas mayores son las neuronas chicas encargadas de establecer circuitos locales en el cuerno ventral.

Lámina X. Comprende las comisuras grises dorsal, ventral y la zona contigua al conducto (17).

La médula espinal está dividida en cuatro regiones con diferente número de segmentos: 8 cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares y 5 sacros; la apariencia transversal del cordón espinal difiere a cada nivel. En la región lumbar y sacra la substancia gris es mayor respecto a la blanca, porque estas regiones contienen los cuerpos celulares de las neuronas motoras e interneuronas que inervan los miembros inferiores y el tronco. En la región torácica es más delgada que la región cervical, que contiene numerosas fibras que inervan los miembros superiores, así como tractos fibrosos que ascienden y descienden (figura 4).



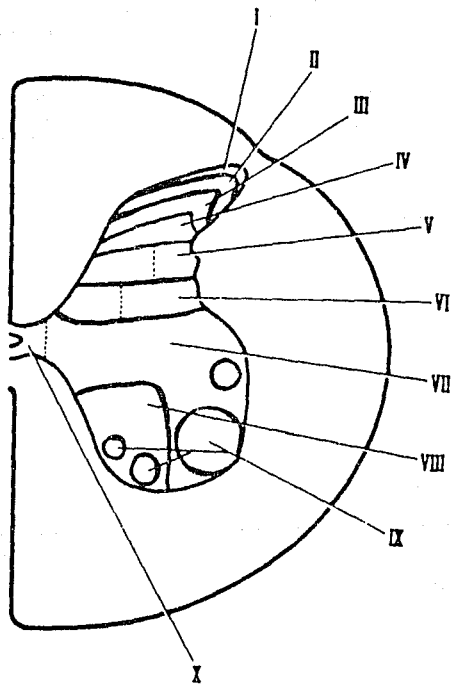


FIGURA 3

Mapeo de la sustancia gris en 10 láminas celulares  
(láminas de Rexed)

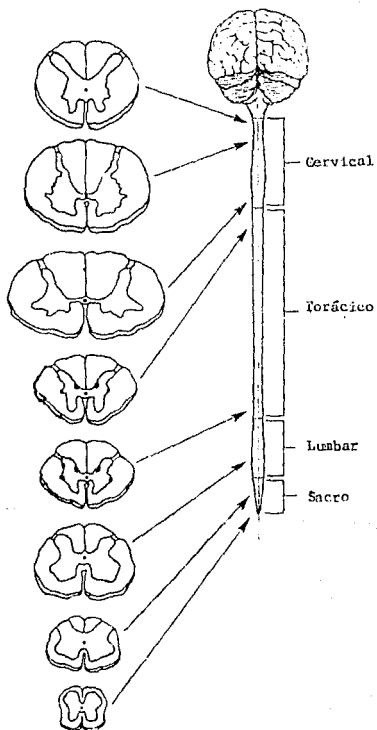


FIGURA 4

Morfología de la sustancia gris a diferente nivel de la médula espinal.

### 3.2 MUSCULO ESQUELETICO

El músculo esquelético está formado por células multinucleadas cilíndricas agrupadas estrechamente en haces paralelos y fascículos reunidos por tejido conectivo formando una sola unidad anatómica y funcional (33). Las fibras musculares se dividen en miofibrillas que exhiben un repetido bandeo obscuro (bandas A) y claro (bandas I) alineado al de la miofibrilla adyacente, formando el típico patrón estriado de la fibra muscular. Las miofibrillas están formadas por unidades menores llamadas miofilamentos finos y gruesos, constituidos por dos proteínas diferentes actina y miosina respectivamente (42).

Las fibras musculares han sido clasificadas en dos tipos 1 y 2. Este último se subdivide en 2a, 2b y 2c. Con la reacción de la enzima ATPasa a pH 9.4 las fibras de tipo 1 son claras y las de tipo 2 son oscuras; con una preincubación a un pH 4.6 la reacción es invertida, a un pH de 4.3 se revelan dos subtipos de las fibras tipo 2: las 2a, que permanecen claras, las 2b en un tono intermedio y oscuras las tipo 1. Las fibras 2c reaccionan fuertemente a pH 9.4 y 4.6 (20).

Otra reacción a través de la cual pueden ser reconocidas los tipos de fibra es la NADH tetrazolium reductasa (NADH - TR). En esta reacción de enzimas oxidativas, las fibras tipo 1 son oscuras y las tipo 2 son claras (figura 5) (28). Estos métodos histoquímicos permiten diferenciar los dos tipos de fibras, la

ausencia de alguna enzima en particular, el exceso de algún substrato o bien cambios estructurales que no pueden ser visualizados con tinciones histológicas (28). El desarrollo de las fibras varía ligeramente de hombre a mujer; las tipo 1 tienen un diámetro promedio similar para ambos sexos, pero las tipo 2 son más pequeñas en la mujer. Histográficamente, cuando se trata de músculo normal, la curva muestra un solo pico para los dos tipos de fibra (figura 6 y 7).

Los padecimientos que afectan la neurona motora inferior están asociados con cambios patológicos característicos del músculo; hay reducción del diámetro de la fibra, el núcleo adquiere forma pignótica. Las fibras atroficas generalmente se agrupan, incrementando en número a medida que aumenta la denervación. Análisis histográficos muestran una configuración bimodal (figura 8), en la degeneración de neurona motora no todas las células están involucradas simultáneamente y las fibras musculares no dañadas se hipertrofian debido a que reemplazan la función de las fibras atrofiadas, que han perdido su terminal nerviosa. Las neuronas que sobreviven ramifican sus terminales para reinervar grupos de fibras musculares denervadas (27,28).

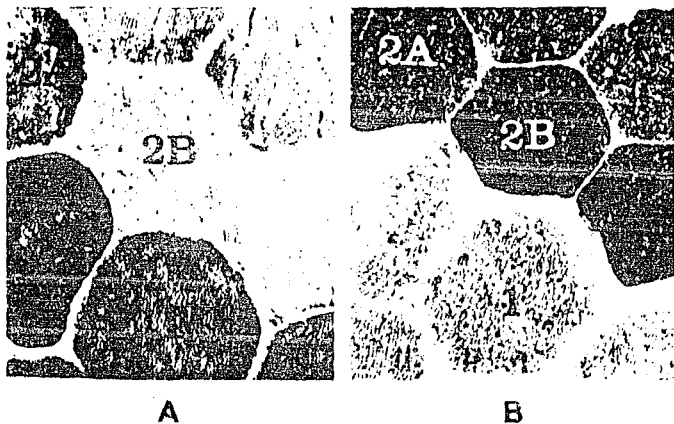
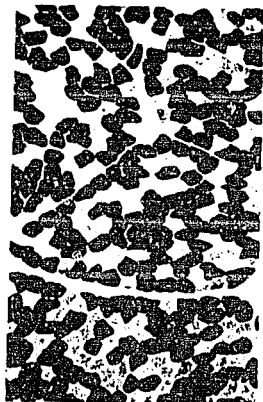


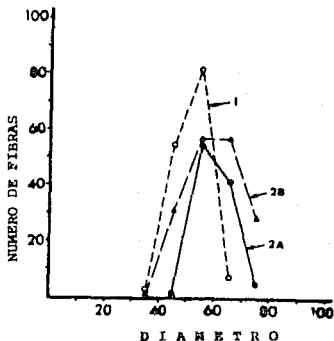
FIGURA 5

Identificación de los tipos de fibras musculares con métodos histoquímicos: A) NADH-TR las fibras tipo 1 son oscuras y las tipo 2 son claras. B) ATPasa 9.4 tipo 2 son claras y tipo 1 440X oscuras (tomada de Muscle Biopsy; Dubowitz V.)



A

Tipo de fibra muscular	1	2A	2B
Diámetro promedio	52	59	59
Porcentaje de fibras	38	22	40



B

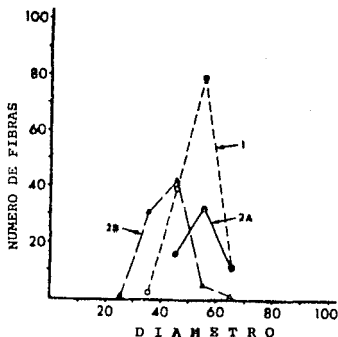
FIGURA 6

A) Corte transversal de un músculo de un hombre adulto normal, mostrando los diferentes tipos de fibras (tipo 1 claras y tipo 2 obscuras) ATPasa 55X B) Representación histográfica del diámetro y número de distintos tipos de fibras. (tomada de Muscle Biopsy Dubowitz V.)



A

Tipo de fibra muscular	1	2A	2B
Diámetro promedio	52	54	41
Porcentaje de fibras	48	22	30



B

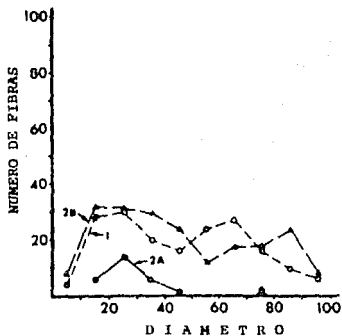
FIGURA 7

A) Corte transversal de un músculo de una mujer adulta. Obsérvese la distribución de los diferentes tipos de fibras (tipo 1 claras y tipo 2 oscuras) mostrando el típico patrón de mosaico ATPasa 55X, B) Representación histográfica del diámetro y distribución de los distintos tipos de fibras. (tomada de Muscle Biopsy; Dubowitz V.)

Tipo de fibra muscular	1	2A	2B
Diámetro promedio	46	26	46
Porcentaje de fibras	44	7	49



A



B

FIGURA 8

A) Corte transversal de un músculo denervado. Obsérvese la distribución irregular de los diferentes tipos de fibras, agrupándose y perdiéndose el típico patrón de mosaico ATPasa 55X, B) Representación histográfica mostrando 2 picos especialmente para las fibras tipo 1 y 2B. (tomada de Muscle Biopsy Dubowitz V.)



### 3.3 ELECTROMIOGRAFIA

La actividad de las unidades motoras de un músculo puede ser registrada por la electromiografía (EMG). Se realiza con la inserción de electrodos en forma de aguja en los músculos a examinar; al efectuarse el movimiento voluntario, se activan las fibras musculares que forman las unidades motoras y la suma de sus potenciales dan el potencial total de la unidad, que es registrado y amplificado. La EMG es importante en el diagnóstico de padecimientos que afectan la motoneurona, la unión neuromuscular o el músculo; por este procedimiento es posible investigar en un caso determinado que músculo o músculos están total o parcialmente denervados, como en el caso de ELA donde hay degeneración de neurona motora (32). Cuando una neurona motora es destruida o un axón es seccionado, éste degenera después de varios días. Las fibras musculares previamente inervadas por las ramificaciones del axón muerto no siguen juntas como unidad funcional. Por razones aun desconocidas, de 8 a 12 días después de la muerte del axón las fibras denervadas desarrollan actividad espontánea, aun cuando no se haga esfuerzo por contracción muscular, potenciales de axón fluyen sin cesar a lo largo de las fibras musculares denervadas, cada fibra descarga a su propia frecuencia y sin relación con la actividad de fibras vecinas resultando un conglomerado irregular de potenciales difásicos. Esta actividad se denomina fibrilación, a diferencia de las fasciculaciones, que son contracciones sincronizadas de grupos de

fibras musculares unidas entre si por un solo axón constituyendo una unidad motora; ambas son signos de la ELA (19,32).

### 3.4 PATOLOGIA DEL SISTEMA NERVIOSO

Los cambios patológicos del sistema nervioso central han sido extensamente revisados. Las neuronas motoras del tallo cerebral y de la médula espinal muestran atrofia, acumulación de lipofuscina intracitoplásmica y núcleo desplazado, con severa pérdida celular. Son frecuentes las inclusiones intracitoplasmáticas, células fantasma las cuales tienen reducida la substancia de Nissl y neuronas cromatolíticas mostrando núcleo desplazado a la periferia, los cuerpos de Nissl se desintegran y llegan a desaparecer, la célula adquiere una forma redondeada y sus bordes se hacen irregulares. En el tallo cerebral el núcleo hipoglosal es el más afectado; el núcleo motor trigeminal y facial están involucrados, pero el oculomotor, troclear y abducente, relacionados con el movimiento de los ojos no son afectados (30). Algunos estudios sugieren que existe alteración histopatológica específica en las células gliales íntimamente asociadas con cambios degenerativos en algunas neuronas de la corteza motora primaria (8).

En pacientes con prominentes signos de neurona motora superior existe una pérdida severa de las células de Betz y de otras neuronas piramidales de la corteza motora con una amplia degeneración de los tractos corticoespinales (8).

Estudios cuantitativos han mostrado una importante disminución en el número de las grandes neuronas motoras en la

médula espinal a nivel cervical y lumbar (figura 9). En el tallo cerebral, los núcleos de los nervios craneales muestran cambios similares a aquellos vistos en las neuronas motoras de los cuernos anteriores. Los nervios motores periféricos muestran atrofia, los músculos distales presentan características de atrofia neurogénica. En aproximadamente 60% de pacientes con ELA ha sido observada un aumento en la actividad de colagenasa en la piel (28,29,30).



FIGURA 9

Corte transversal de la médula espinal a nivel cervical. Severa pérdida neuronal del asta anterior (abajo) característica patológica de la ELA contrastando con una población normal (arriba). Cluver Barrera 25X (tomada de Neuropathology; Greenfield's)



FIGURA 9a

Cromatólisis en células del asta anterior a nivel lumbar. a) núcleo desplazado a la periferia b) los cuerpos de Nissl se desintegran y desaparecen c) micropilo. Tianina 400X (tomada de Greenfield's).

#### 4. HIPOTESIS

Si los anticuerpos contra proteínas de músculo fetal de rata encontrados previamente en suero de pacientes con ELA juegan un papel etiológico importante en éste padecimiento, la inducción de anticuerpos contra dichas proteínas probablemente produzcan a largo plazo trastornos en los mecanismos naturales de reinervación originando un cuadro similar a ELA.

## 5.- OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de los anticuerpos contra proteínas de músculo esquelético fetal de rata en el sistema nervioso central y músculo esquelético de animales adultos, inmunológica, morfológica y funcionalmente. Tratando de desarrollar un modelo animal de ELA.



## 6. MATERIAL Y METODO

Se utilizaron 14 conejos Nueva Zelanda de 5 meses de edad, 10 fueron controles y 4 experimentales.

### 6.1 PREPARACION DEL ANTIGENO (Ag):

El músculo fetal se obtuvo de las extremidades posteriores de fetos de rata de 18 días de gestación. Se homogenizó y sonicó en solución salina (1 gr. de músculo por mililitro de NaCl 0.9%) sobre hielo 3 veces en un total de 10 minutos. El homogenizado se centrifugó a 15,000 rpm a 4°C durante 30 minutos y se colectó el sobrenadante. La determinación de proteínas se hizo según el método de Lowry et al (1915), usando albumina de suero bovino (ASB) como standard (14).

### 6.2 ESQUEMA DE INMUNIZACION

Antes de empezar el esquema de inmunización, se sangraron los conejos para obtener el suero control (preimmune).

Después fueron inoculados con dos inyecciones subcutáneas de 0.5 a 1.0 ml (300 µg/ml de proteína) del extracto volumen a volumen con el adyuvante completo de Freund, a intervalos de 7 días.

Siete días más tarde se les inyectó por vía intramuscular la misma emulsión. Después de una semana los animales recibieron otra inyección intramuscular de una emulsión hecha con extracto más adyuvante incompleto de Freund en proporción 1:1; esta inyección se repitió cinco veces a intervalos de una semana y después fue repetida cada mes como refuerzo. Siete días después de la última inmunización fueron sangrados (41).

### 6.3 WESTERNBLOT

#### a) Electroforesis vertical

El extracto proteico de músculo esquelético fetal se fraccionó en geles discontinuos de poliacrilamida y sulfato dodecil de sodio (PAGE-SDS) se mezcló volumen a volumen en amortiguador de la muestra (0.08 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1 M de B mercaptoetanol, 1% de SDS, 1% glicerol y 0.2% de azul de bromofenol), la mezcla fue calentada a 100°C por 3 minutos.

Se realizó en el Protean II vertical cell (Bio-Rad) en amortiguadores discontinuos de SDS de acuerdo a Laemli (15) a 4°C. Se aplicaron 30 mA para el gel superior y 35 para el inferior durante 4 horas con un agitador magnético para asegurar la continua mezcla del amortiguador.

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

#### b) Electrotransferencia

El extracto proteico previamente fraccionado en geles de poliacrilamida fue transferido a membranas de nitrocelulosa (MNC) como ha sido descrito previamente (16).

Los geles y las membranas de nitrocelulosa (0.45 micrómetros tamaño del poro) fueron preequilibradas en amortiguador de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 8.5, 192 mM de glicina 20% v/v de metanol pH 8.3) durante 20 minutos para eliminar parcialmente el SDS en el caso del gel.

El antígeno fue 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 cámara de electrotransferencia (transblot cell Bio-Rad); el papel filtro fue humedecido con amortiguador de transferencia. Se colocó en seguida el gel en el papel filtro y se agregaron 20 ml del mismo amortiguador, fue colocada cuidadosamente la MNC, evitando la formación de burbujas. Sobre la MNC se colocaron dos hojas de papel filtro previamente humedecidas, la otra fibra o esponja y el segundo marco de plástico. El conjunto fue

verticalmente en la cámara de electrotransferencia, la cual se llenó con amortiguador 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 Amperio por 1 hora (16,34).

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 ac. acético al 1%.

### c) Inmunodetección

Después de la transferencia de proteínas, la MNC se incubó con albumina de suero bovino (ASB) al 3% a 4°C durante la noche para bloquear los sitios libres en el papel.

La nitrocelulosa fue lavada 4 veces con agitación lenta durante periodos de cinco minutos con amortiguador de fosfatos (PBS) tween-20 al 0.1%. Se incubó con los sueros de los conejos obtenidos antes y después de la inmunización diluidos 1:20 en PBS toda la noche a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron nuevamente y se incubaron con el segundo anticuerpo marcado, proteína A biotinilada, diluida 1:400 en PBS tween-20 al 0.1% 1 hora con agitación lenta, a temperatura ambiente (33).

Posteriormente, se incubaron con estreptoavidina peroxidasa diluida 1:400 en PBS tween-20 al 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 en 50 ml de PBS y 150  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno) al 3% (figura 10). Al término de la reacción, las MNC se lavaron en agua destilada, se secaron, se protegieron de la luz y se procedió a su análisis (33, 34).

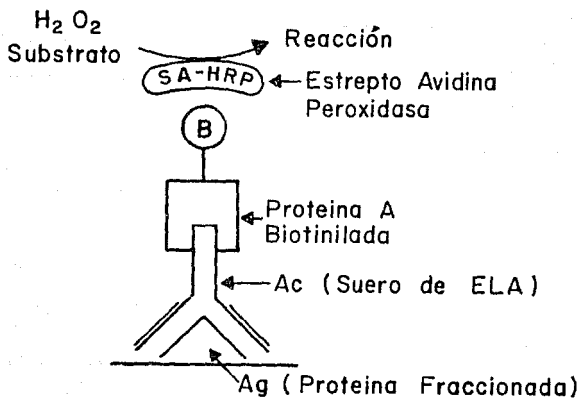


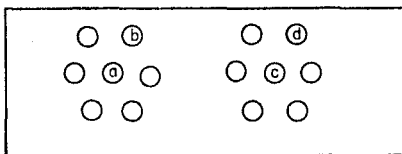
FIGURA 10

Sistema de detección de la reacción antígeno-anticuerpo en Westernblot

#### 6.4 DOBLE DIFUSION (OUCHTERLONY)

Se realizaron inmunodifusiones en placas de agar al 1%. Se disolvió 1 gr. de agar en 100 ml de buffer de fosfatos 0.15 M, añadiendo 40 mg de mertiolate como conservador; la mezcla se calentó a 100°C con agitación para disolver el agar.

Se colocaron 3 ml de la mezcla en portaobjetos limpios dispuestos sobre una superficie plana. Cuando se enfrió, se marcó el siguiente patrón:



Los pozos se llenaron con 20  $\mu$ l de cada una de las muestras de la siguiente manera:

- Antígeno concentrado
- Suero inmune concentrado y diluido (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32)
- Suero concentrado
- Antígeno concentrado y diluido (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32)

Los sueros o antígenos difundieron por dos días en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se lavaron con solución salina al 0.9% haciendo cambios cada hora. Se colocó un papel filtro sobre la placa cerca de un ventilador para secar el gel.

Posteriormente se tñieron con azul de Comassie por 1 hora, finalmente se destñieron con ácido acético al 10% (18).

## 6.5 ELECTROMIOGRAFIAS

El estudio electromiográfico se realizó antes de sacrificar los animales. Un electrodo concéntrico en forma de aguja se insertó en el músculo gastrocnemio del miembro inferior derecho y fue valorada la actividad muscular a la inserción, durante el reposo y a la contracción voluntaria, en un equipo de registro de respuestas fisiológicas (Nicolet-compact four) manteniendo al animal inmovilizado.

## 6.6 ESTUDIO HISTOLOGICO

Dos años después de iniciada la inoculación de proteínas de músculo fetal, los conejos se sacrificaron mediante anestecia con 2 ml de Ketalar vía intravenosa y se exsanguinaron por punción cardiaca, se realizó biometría hemática y química sanguínea. Inmediatamente se obtuvo un fragmento de músculo intercostal, soleo y gastrocnemio para realizar cortes por congelación. Posteriormente se perfundieron con glutaraldehído al 2.5% con amortiguador de cacodilatos 0.1 M, pH 7.4 y se extrajo la médula espinal. Las muestras se procesaron de la siguiente manera:

Fragmentos frescos de músculo intercostal, gastrocnemio y soleo se cubrieron con talco, se montaron en la platina de



criostato con tissue-tek II, se congeló el conjunto en nitrógeno líquido, se hicieron cortes de 6 micrómetros de grosor en criostato (Reichert Histostat) se realizaron las siguientes reacciones histoquímicas y tinciones histológicas, con la finalidad de medir el diámetro, observar la distribución y morfología de las fibras musculares tipos 1 y 2:

ATPasa pH 9.4, 4.6 y 4.3

NADH-TR

Hematoxilina Eosina (HE)

Tricrómico modificado de Gomori

En las muestras de músculo intercostal se realizó la técnica de colinesterasa Namba para observar las uniones neuromusculares.

La médula espinal se fijó en formol al 10% durante 15 días, se procesó histológicamente, se incluyó en parafina y se hicieron cortes de 6 micrómetros en microtomo (Reichert Histostat rotatory microtome), se tiñeron con Hematoxilina Eosina para identificar cambios morfológicos en neuronas motoras de astas anteriores.

## 6.7 MORFOMETRIA DE FIBRAS MUSCULARES

Para el estudio morfométrico se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

- 1.- Proporción de fibras
- 2.- Porcentaje de núcleos centrales
- 3.- Diámetro de fibra muscular
- 4.- Coeficiente de variabilidad

### 1.- Proporción de fibras musculares

Se realizó en el músculo gastrocnemio o soleo en la reacción de ATPasa pH 9.4 o NADH.

Se contaron 110 fibras de tipo 1 y 2 tomando en cuenta el color. Para la reacción de ATPasa pH 9.4, las fibras tipo 1 son claras y las tipo 2 son oscuras y en NADH es al contrario.

### 2.- Porcentaje de núcleos centrales

En músculo gastrocnemio y/o soleo cortados transversalmente, teñidos con Hematoxilina Eosina (HE) y/o tricrómico modificado de Gomori se contaron 300 fibras musculares y de estas cuantas tenían núcleos centrales.

3. Diámetro de las fibras musculares

Se midió el diámetro de 100 fibras tipo 1 y 100 tipo 2, en preparaciones con ATPasa pH 9.4 o NADH, usando un graticula ocular.

4.- Coeficiente de variabilidad (CV)

Se obtiene multiplicando la Desviación Standard (D.S.) por 1000 y dividiendo entre el valor de la media, para cada tipo de fibra.

## 7. RESULTADOS

En la separación electroforética de proteínas de músculo esquelético fetal son visibles varias bandas (figura 11).

Cuando son incubadas con los sueros obtenidos antes de inmunizar los animales, no se observan líneas reactivas; en contraste, cuando se incubaron con las muestras obtenidas después de inmunizarlos, se observan múltiples bandas ubicadas a diferente peso molecular, que variaban entre 20 a 92 Kd. No se encontró reacción a una proteína en común, sino a múltiples proteínas (figura 12). En los sueros control presentaban dos bandas en común (figura 13). La misma reacción pudo observarse en las inmunodifusiones realizadas para cada muestra (figura 14). El estudio electromiográfico en ambos grupos muestran un patrón normal, sin ninguna alteración en el registro que indicara un proceso de denervación (fasciculación y fibrilaciones) (figura 15).

Los núcleos centrales se observan en un porcentaje mínimo de 0.37 y un máximo de 2.2 de las fibras del músculo gastrocnemio y soleo de ambos grupos, quedando dentro del intervalo normal (tabla y gráfica II). No se observa infiltrado inflamatorio o fibrosis intersticial, ni figuras de necrosis o fagocitosis (figura 16).

La proporción o distribución de las fibras musculares se muestra en la reacción de NADH para ambos grupos. En el músculo soleo predominan las fibras tipo 2 obteniendo un 71.43 y 72.38 por ciento para el grupo experimental y control respectivamente (figura 17). En el músculo gastrocnemio (figura 18) la distribución es homogénea, para ambos tipos de fibras 50.55, 49.38 y 48.45, 51.52 por ciento para el grupo control y experimental respectivamente observándose un comportamiento semejante en ambos músculos y grupos (tabla y gráfica 1). En la reacción de ATPasa pH 9.4 en ambos músculos no hay grupos de fibras atróficas ni fibras hipertróficas; el diámetro promedio es de 50 micrómetros semejante a nuestro grupo control (figura 19).

Los valores del coeficiente de variabilidad (C.V.) de las fibras tipo 1 y 2 del grupo control en ambos músculos es menor al valor normal de 250. En contraste, en el músculo soleo y gastrocnemio del grupo experimental el CV de las fibras tipo 2 y 1 respectivamente es ligeramente mayor al 250 (268 y 287 para cada uno) lo cual indica que hay una pequeña variabilidad en el diámetro de la fibra (Tabla IV y V). Sin embargo, tales fibras no se consideran hipertróficas (diámetro mayor a 80 micrómetros) o atróficas (menor a 30 micrómetros). El promedio del diámetro de fibras para ambos grupos se encuentra entre 40 a 50 micrómetros, considerado dentro de valores normales.

Analizando estadísticamente los resultados mediante la prueba no paramétrica de Mann Whitney, no hay diferencia significativa en ambos grupos para cada parámetro medido ( $p > 0.05$ )

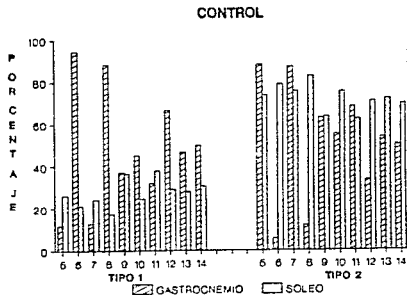
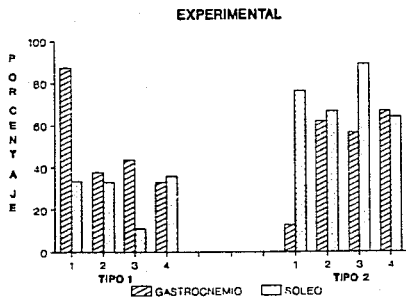
El análisis histológico de las neuronas motoras de las astas anteriores de médula espinal del grupo experimental, comparado con el grupo control, no mostró cambios morfológicos que indiquen algún proceso degenerativo; muestran bien definido tanto su cuerpo como los organelos celulares, núcleo prominente, su nucléolo y cuerpos de Nissl muy nitidos, no hay pérdida celular (figura 20, 21 y 22).

Las uniones neuromusculares observadas con la técnica de colinesterasa-Namba presentan la terminal axonal haciendo contacto con la fibra muscular en ambos grupos. En el caso del grupo experimental, no hay ramificaciones colaterales a la fibra adyacente o algún otro proceso que indicara denervación (figura 23). Los análisis clínicos indican que ambos grupos se encuentran dentro de valores normales (tabla VI).

**TABLA I. PROPORCION DE FIBRAS MUSCULARES**

	EXPERIMENTAL			
	Gastrocnemio		Soleo	
	T-1	T-2	T-1	T-2
1	87.27	12.72	33.63	66.36
2	38.00	61.80	33.33	66.66
3	43.63	56.36	10.90	89.09
4	33.33	66.66	36.36	63.63
$\bar{X}$	50.55	49.38	28.55	71.43
DE	21.50	21.47	10.26	10.26
	CONTROL			
5	11.71	88.28	26.36	73.63
6	94.54	5.45	20.90	79.09
7	12.50	87.50	24.30	75.67
8	88.28	11.71	17.27	82.72
9	37.27	62.72	36.66	63.33
10	45.08	54.96	24.54	75.45
11	32.00	68.00	37.81	62.18
12	66.60	33.30	29.36	70.63
13	46.60	53.30	28.20	71.79
14	50.00	50.00	30.63	69.36
$\bar{X}$	48.45	51.52	27.60	72.38
DE	26.63	26.63	6.10	6.10

# GRAFICA 1. PROPORCION DE FIBRAS MUSCULARES





**TABLA II. PORCENTAJE DE FIBRAS CON NUCLEOS CENTRALES**

EXPERIMENTAL		
	Gastrocnemio	Soleo
1	1.48	0.37
2	1.48	1.85
3	1.80	1.48
4	1.40	0.37
$\bar{x}$	1.54	1.01
DE	0.15	0.66
CONTROL		
5	1.48	0.37
6	0.74	2.22
7	1.11	0.37
8	0.37	0.37
9	1.80	1.85
10	0.74	1.48
11	0.37	1.11
12	1.80	0.74
13	1.11	0.74
14	0.74	0.74
$\bar{x}$	1.02	0.99
DE	0.50	0.62

GRAFICA 2. PORCENTAJE DE FIBRAS CON NUCLEOS CENTRALES

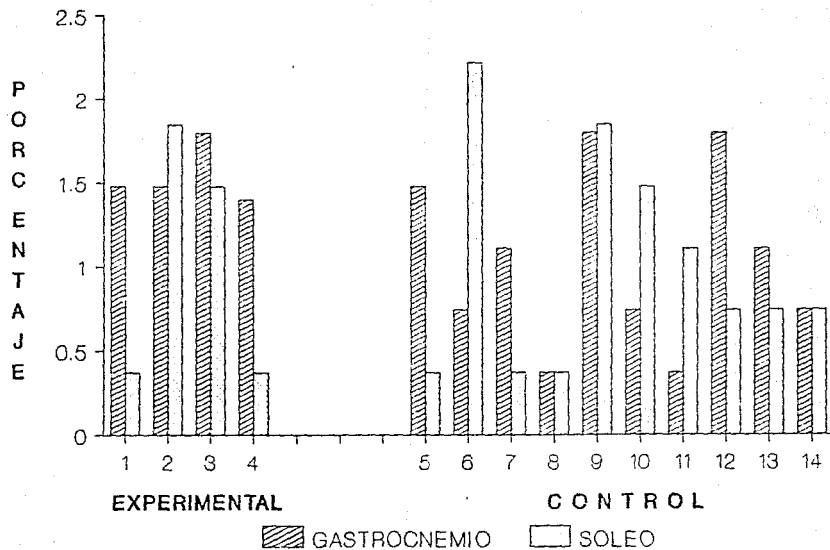


TABLA III. PORCENTAJE DEL DIAMETRO DE FIBRAS MUSCULARES

Diámetro	EXPERIMENTAL			
	Gastrocnemio		Soleo	
	T-1	T-2	T-1	T-2
11 - 20		0.50	3.53	7.57
21 - 30	3.03	10.60	18.18	5.80
31 - 40	24.49	23.73	36.86	15.40
41 - 50	39.89	24.74	26.01	19.44
51 - 60	17.42	14.39	8.58	15.40
61 - 70	15.15	26.01	6.81	36.36

CONTROL				
11 - 20	0.10		0.70	0.20
21 - 30	1.51	0.10	4.04	0.70
31 - 40	17.77	10.47	27.87	8.38
41 - 50	28.78	23.92	34.24	20.40
51 - 60	16.36	19.51	18.48	19.39
61 - 70	35.45	45.97	14.64	50.90

GRAFICA 3. PORCENTAJE DEL DIAMETRO DE FIBRAS MUSCULARES

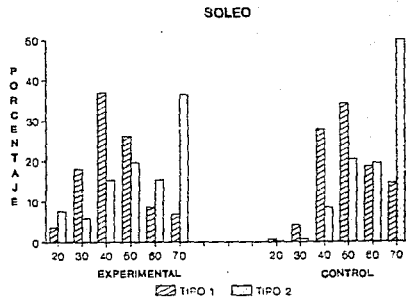
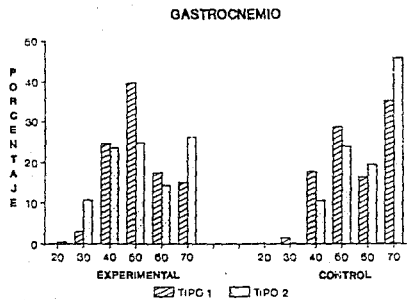


TABLA IV  
MUSCULO GASTROCNEMIO  
FIBRAS TIPO 1

EXPERIMENTAL				CONTROLES			
No.	$\bar{X}$	D.E.	C.V.	No.	$\bar{X}$	D.E.	C.V.
1	54.0	11.90	220.3	5	50.40	9.43	187.1
2	41.5	9.57	230.2	6	56.40	13.80	244.4
3	53.7	12.00	223.0	7	47.37	10.92	230.5
4	50.6	9.14	180.6	8	67.22	5.65	84.0
$\bar{X}$	49.9	10.65	188.5	9	46.06	16.68	322.1
				10	55.41	12.70	229.2
				11	57.52	11.44	198.8
				12	58.70	11.44	194.8
				13	53.78	11.65	216.6
				14	50.70	12.62	248.9
				$\bar{X}$	54.35	11.63	215.6

FIBRAS TIPO 2

1	47.3	14.77	312.2	5	57.80	11.83	204.6
2	51.9	13.70	263.9	6	54.89	12.18	221.8
3	41.6	12.08	289.9	7	57.30	10.90	190.2
4	58.2	12.21	209.7	8	59.65	11.29	189.2
$\bar{X}$	49.7	13.19	268.9	9	56.11	15.70	279.8
				10	59.90	11.95	199.5
				11	54.89	11.78	214.6
				12	54.89	12.18	221.8
				13	62.22	7.72	122.8
				14	59.09	9.38	158.7
				$\bar{X}$	57.67	11.49	200.2

$\bar{X}$ =Promedio del diámetro de la fibra

D.E.=Desviación estandar

C.V.=Coeficiente de variabilidad

**TABLA V**  
**MUSCULO SOLEO**  
**FIBRAS TIPO 1**

EXPERIMENTAL				CONTROLES			
No.	$\bar{X}$	D.E.	C.V.	No.	$\bar{X}$	D.E.	C.V.
1	50.0	13.30	266.0	5	37.12	10.90	293.6
2	34.4	12.10	350.8	6	49.94	14.90	298.3
3	30.2	9.28	306.7	7	50.30	9.68	192.4
4	42.3	9.58	226.7	8	47.92	11.67	243.5
$\bar{X}$	51.5	10.41	287.5	9	45.30	9.35	206.1
				10	54.79	9.34	170.4
				11	60.90	9.17	150.4
				12	52.20	11.80	226.0
				13	41.31	8.92	215.9
				14	45.50	8.80	193.4
				$\bar{X}$	48.52	10.45	219.0

**FIBRAS TIPO 2**

1	61.96	10.20	164.6	5	51.60	12.78	247.6
2	53.78	11.12	206.7	6	60.00	10.00	166.6
3	29.30	11.10	378.8	7	60.40	11.30	187.7
4	61.21	9.24	150.9	8	60.00	10.80	180.0
$\bar{X}$	51.56	10.41	225.2	9	52.98	12.82	241.9
				10	63.43	11.88	187.2
				11	66.03	7.39	111.9
				12	62.22	12.27	197.2
				13	49.47	11.32	228.8
				14	65.00	6.51	100.1
				$\bar{X}$	59.11	10.70	184.9

$\bar{X}$ =Promedio del diámetro de la fibra

D.E.=Desviación estandard

C.V.=Coeficiente de variabilidad

TABLA VI. ANALISIS CLINICOS

	VALORES NORMALES	GRUPO EXPERIM.	GRUPO CONTROL
Hemoglobulina (%)	14 - 18	12	13
Hematocrito (%)	42 - 52	38	40
C.M.H.G. (gr/dl)	32 - 36	32	33
Leucocitos (X10 )	4X10 - 1X10	7750	9920
Plaquetas (X10 )	150X10 - 450X10	99000	203242
Glucosa (mg/100 ml)	78 - 155	126	151
Urea (mg/100 ml)	20 - 40	37	38
Creatinina (mg/100 ml)	0.8 - 1.5	1.5	1.7
Acido Urico (mg/100 ml)	2.1 - 7.4	0.32	0.30
Proteínas			
Totales (gr/100 ml)	5 - 8	6	6
Albúmina (gr/100 ml)	2.5 - 4	3	4
Globulina (gr/100 ml)	2.5 - 3.0	3	3
Deshidrogenasa Láctica	109 - 193	121	183
T.G.O. (Transaminasa Glutámica)	10 - 30	14	13
T.G.P. (Transaminasa Pirúvica)	6 - 37	22	18
Fosfatasa Alcalina	36 - 92	30	23
Colesterol (mg/100 ml)	20 - 83	33	76
Creatin Fosfocinasa ( $\mu$ I/lt)	45 - 235	338	700
Aldolasa ( $\mu$ I/lt)	0 - 7.6	2	5

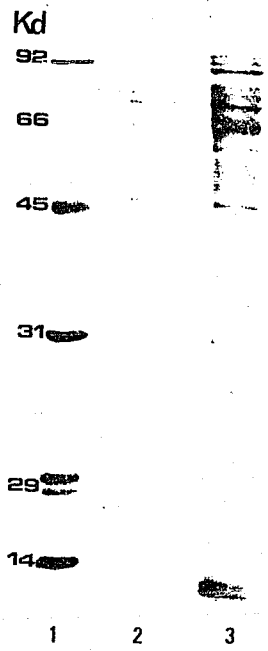


FIGURA 11

Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS al 10% teñido con azul de Comassie R-250 de proteínas de músculo esquelético de rata a diferentes días de gestación. 1) Marcador de pesos moleculares, 2) 16, 3) 18 días.



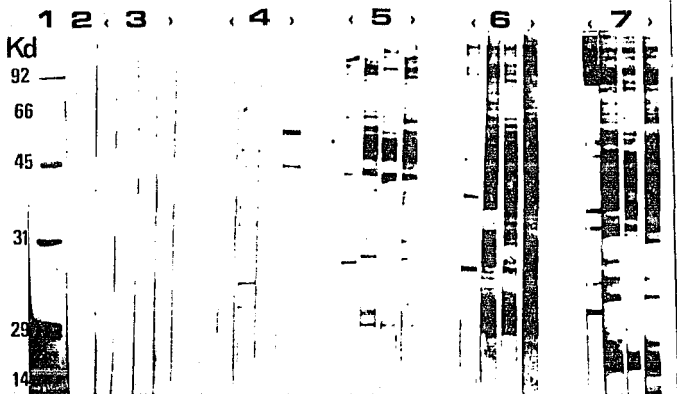


FIGURA 12

Inmunoblots de proteínas de músculo esquelético fetal de rata incubadas con sueros de conejo inmunizados con las mismas. 1) Marcador de pesos moleculares, 2) electroforesis de proteínas teñidas con amido black, 3) suero preinmune, 4) 6 días, 5) 2 meses, 6) 10 meses, 7) 2 años después de haber iniciado el esquema de inmunización.

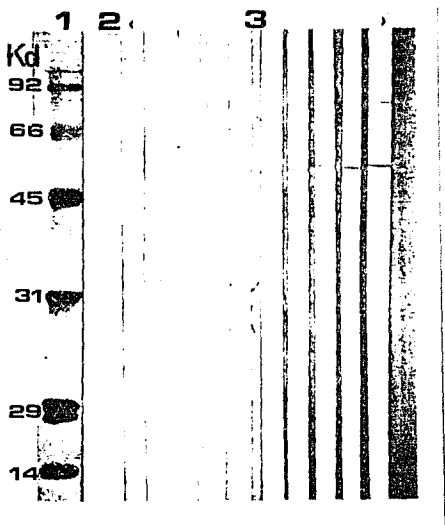


FIGURA 13

Proteínas de músculo esquelético fetal de rata incubados con sueros control. 1) Marcador de pesos moleculares, 2) electroforésis de proteínas teñidos con amido negro, 3) sueros control.

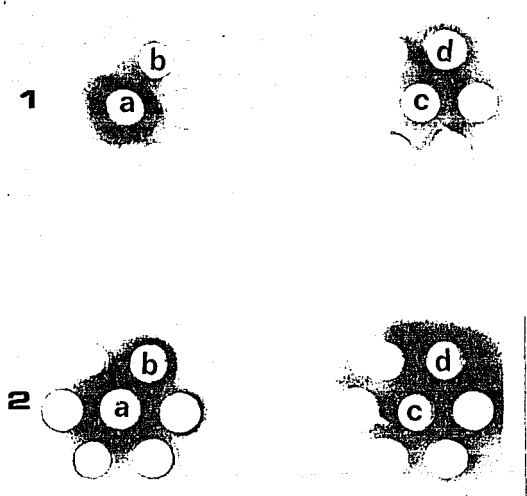
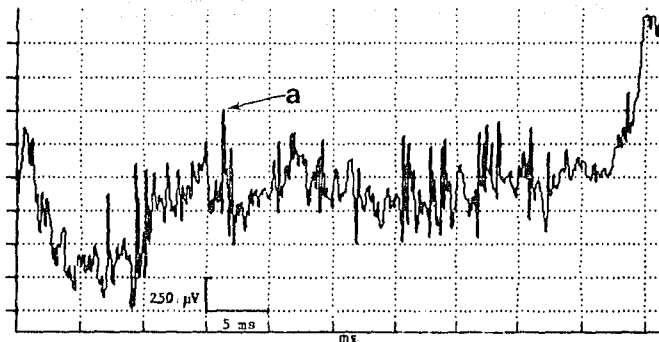


FIGURA 14

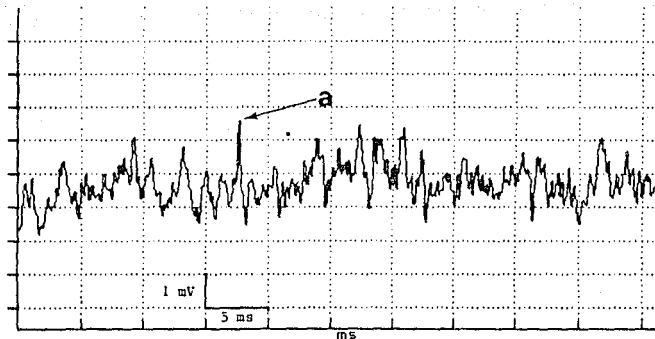
Inmunodifusiones en geles de agarosa al 1%. 1) Sueros de conejos inmunizados con proteínas de músculo esquelético de 18 días de gestación, 2) suero de conejo control. a) Antígeno, b) suero concentrado y diluido 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32; c) suero concentrado, d) antígeno concentrado y diluido como anteriormente.



M: #PP/DIV 1 ms/DIV:TEST/DI: RM:AK  
 11244.1 W:13.0 111:25:39:ACT. MAX. PATA DER.

FIGURA 15

Registro electromiográfico control en contracción máxima que demuestra patrón de interferencia completo. a) Potencial de unidad motora.



M: AMP/DIV 1 mV/DIV TIME: 5 ms REMARK  
 1:0.9 mV/5.0 :1:13:51:ACT. MAX. PATA DER.

FIGURA 15a

Registro electromiográfico experimental en contracción máxima que demuestra patrón de interferencia completo. a) Potencial de unidad motora.



FIGURA 16

Corte transversal de músculo soleo, grupo control. Obsérvese la morfología normal de las fibras musculares, núcleos periféricos, excepto uno central (flecha) H.E. 350X.

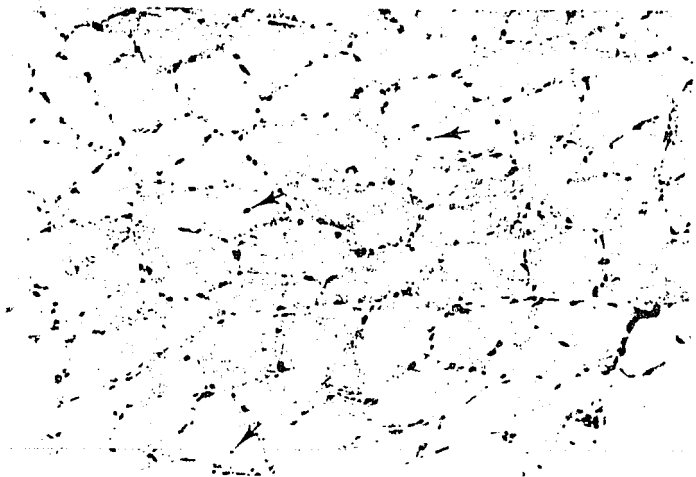


FIGURA 16a

Corte transversal de músculo soleo, grupo experimental. Obsérvese la morfología normal de las fibras musculares, núcleos periféricos excepto algunos centrales (flechas). H.E. 350X.

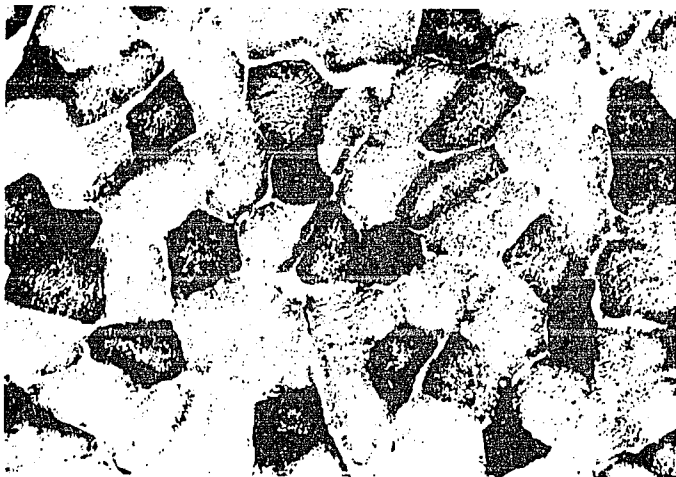


FIGURA 17

Corte transversal de músculo soleo, grupo control. Obsérvese la mayor proporción de las fibras tipo 2 (claras) sobre las tipo 1 (oscureas) NADH 350X.



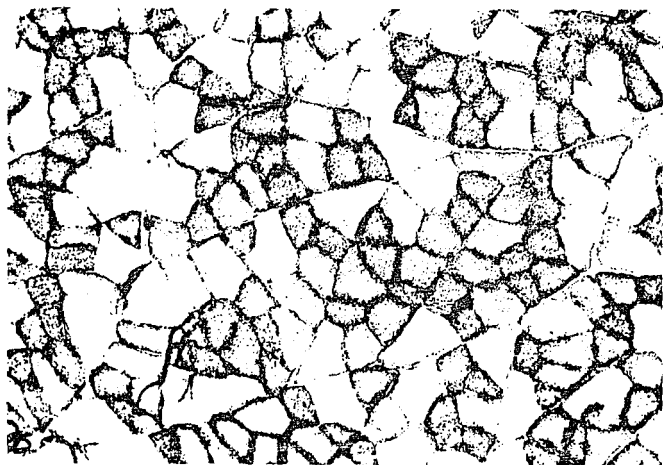


FIGURA 18

Corte transversal de músculo gastrocnemio, grupo experimental. No hay predominancia de ningún tipo de fibra. Fibras tipo 1 (oscurecidas) y tipo 2 (claras) NADH 200X



FIGURA 19

Corte transversal de músculo gastrocnemio, grupo experimental. Obsérvese el diámetro de ambos tipos de fibras (tipo 1 claras, tipo 2 oscuras) es homogéneo, no existen fibras atróficas o hipertróficas ATPasa pH 9.4 380X.

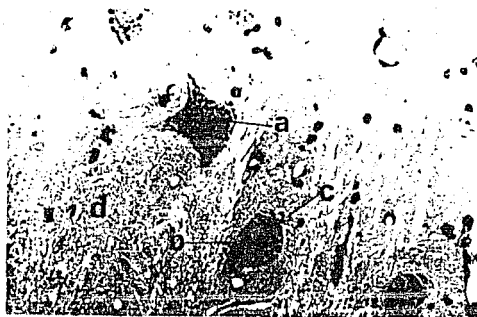


FIGURA 20

Neuronas motoras del asta anterior de médula espinal, grupo control. a) núcleo, b) nucléolo, c) cuerpos de Nissl (filas de cisternas de retículo endoplásmico rugoso) d) neuropilo (conjunto de prolongaciones dendríticas y axónicas) H.E. 265X.

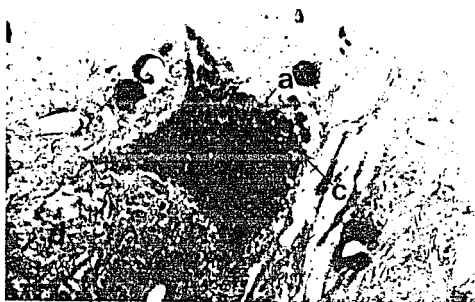


FIGURA 21

Neurona motora del asta anterior de médula espinal, grupo control. Obsérvese a mayor aumento sus organelos bien definidos: a) núcleo b) nucléolo c) cuerpos de Nissl d) neuropilo H.E. 690X.

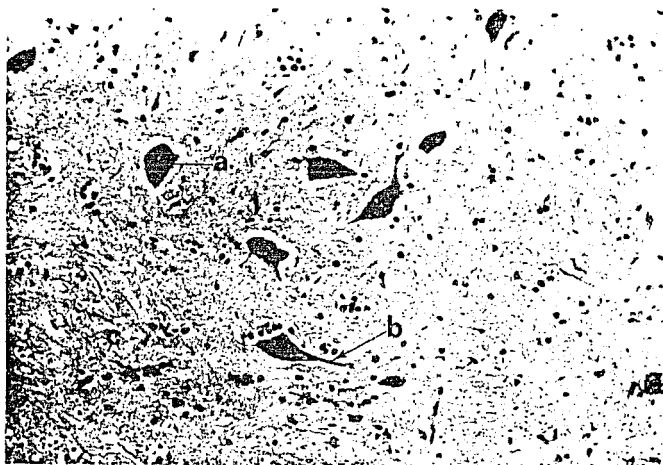


FIGURA 22

Neuronas motoras del asta anterior de médula espinal, grupo experimental. Obsérvese las células sin cambios morfológicos a) nucleólo, b) axón. c) neuropilo H.E. 145X.



FIGURA 22a

Neuronas motoras del asta anterior de médula espinal del grupo experimental. Obsérvese a mayor aumento los organelos celulares sin cambios morfológicos: a) núcleo, b) nucleólo, c) cuerpos de Nissl, d) neuropilo H.E. 290X



FIGURA 23

Unión neuromuscular, grupo experimental. Obsérvese a) la fibra nerviosa b) ramificación de la terminal nerviosa haciendo contacto con la fibra muscular (c). Colinesterasa Namba 850X.

## 8. DISCUSION

Los pacientes con ELA sufren atrofia de la musculatura esquelética debido a la denervación constante; si existe denervación ¿por que no ocurre reinervación subsecuente? esta pregunta se ha formulado varias veces sin encontrar respuesta. Existen evidencias apoyando que los factores liberados por el músculo esquelético estimulan el crecimiento y sobrevivencia de motoneurona (10). El efecto de factores neurotróficos específicos para el sistema motor ha sido probado en cultivo de tejidos. Se ha visto que la adición de músculo esquelético a cultivos de cordón espinal, aumenta el tiempo de sobrevivencia de las neuronas, promueve el crecimiento de neuritas e incrementa la actividad de la colina-acetiltransferasa; este efecto es similar en proteínas de músculo esquelético tanto humano, como de rata y ternera (10).

En un trabajo previamente realizado, probamos 30 sueros de pacientes con ELA y 30 controles por inmunoblot con extractos de proteína obtenidos de músculo adulto, denervado humano y de rata, de un recién nacido y fetal de rata. Los resultados con músculo adulto y denervado de ambas especies confirman previos reportes que muestran una carencia de reactividad particular de los sueros de ELA cuando comparamos con el grupo control (36,37). Sin embargo, se observaron bandas reactivas cinco veces más frecuentemente en sueros de ELA que en controles cuando el inmunoblot fue hecho con extractos de proteína de músculo fetal



de rata (figura 1). Los resultados negativos obtenidos con el extracto de músculo del recién nacido indican que las proteínas antigenicas están restringidas a la etapa fetal. Estos resultados apoyan la posibilidad de una reacción inmune en suero de pacientes con ELA, contra proteínas efímeras de músculo que están presentes en grandes cantidades en etapas primarias de diferenciación e inervación (2). Recientemente ha sido demostrado un factor neurotrófico presente en músculo involucrado en la regulación y supervivencia de las motoneuronas in vivo. Este factor está presente en abundantes cantidades en músculo fetal actuando solamente sobre motoneuronas de médula espinal; siendo inefectivo en neuronas sensoriales, simpáticas, parasimpáticas y colinérgicas (43). Aunque la producción de factores motoneurotróficos (FMNTs) por el músculo adulto no ha sido demostrado, es concebible la idea de que exista una constante producción de FMNT en pequeñas cantidades para contrarrestar la denervación que ocurre normalmente y promover la supervivencia de las motoneuronas durante la vida posnatal. Los anticuerpos encontrados previamente en los suero de ELA pueden estar dirigidos contra los FMNTs, evitando la reinervación del músculo al bloquear directamente su inervación; esto puede explicar la lenta progresión de la enfermedad y el daño selectivo de motoneuronas (2).

En condiciones normales, el músculo esquelético continuamente es inervado y denervado. Esto es más común en músculos que tienen gran demanda de crecimiento y función, como es el caso del músculo fetal y las fibras musculares que

umentan de volumen debido a la intensa actividad por el ejercicio. Por el contrario, se atrofian o denervan debido a la falta de actividad o movimiento o bien secundario a alguna enfermedad neuromuscular como es el caso de ELA, donde existe denervación constante sin subsecuente reinervación por un mecanismo que no ha podido ser explicado. El no contar con un modelo experimental de ELA aún limita más los estudios para entender su etiología.

Se ha observado que fragmentos de músculo esquelético de pacientes con ELA permanecen viables, llegan a regenerarse y a reinervarse cuando son transplantados en ratones inmunodeficientes (38). Esto nos indica que probablemente algún agente ajeno al músculo origina el daño; dicho suceso apoya resultados previos (2). En nuestro estudio, al inmunizar conejos con proteínas de músculo fetal de rata encontramos que éstos, como esperábamos, desarrollaron respuesta inmune contra casi todas las bandas de proteínas de músculo esquelético previamente fraccionadas (figura 11), siendo cada vez más intensa como resultado de las frecuentes inmunizaciones y conservándose activa dicha inmunidad hasta el momento de sacrificar a los animales (figura 12). Sin embargo al analizar nuestros resultados en los estudios electrofisiológicos, no se registró alteración en la actividad muscular de los animales experimentales en comparación con controles. Esto nos indica que la respuesta inmune desarrollada contra las proteínas de músculo esquelético de rata no alteró la actividad e inervación muscular del conejo, De acuerdo a nuestra hipótesis, esperábamos que los anticuerpos

desarrollados contra proteínas de músculo fetal bloquearan a los factores promotores del crecimiento elaborados por la fibra muscular, a su vez las terminales nerviosas al no recibir dicha estimulación no inervarían al músculo produciéndose así denervación (39,40). Aunque son especies heterólogas, existen evidencias que apoyan que factores liberados por el músculo esquelético estimulan el crecimiento y supervivencia de motoneurona, incrementa la actividad de la colina y acetiltransferas, este efecto es similar en proteínas de músculo esquelético tanto humano como de rata y ternera (10). Dicha acción es específica del músculo esquelético, se han probado extractos de otros tejidos incluyendo músculo cardiaco, cerebro, hígado, riñón, y bazo, no tienen efecto sobre el proceso de crecimiento o densidad de células de astas ventrales (45). Existe la evidencia que sueros de pacientes con ELA reaccionan con varias proteínas de diferente peso molecular de músculo esquelético fetal de rata (2). De cumplirse la hipótesis, esperábamos encontrar actividad espontánea, como dato indirecto de denervación en ausencia de contracción voluntaria del músculo, como los potenciales de acción que fluyen a lo largo de las fibras denervadas, descargándose cada fibra a su propia frecuencia y sin relación con la actividad de otras fibras, resultando un conglomerado irregular de potenciales o bien fasciculaciones que son contracciones sincrónicas de grupos de fibras musculares unidas entre si por un solo axón constituyendo una unidad motora (19). Ninguno de estos patrones anormales fue registrado en los animales experimentales.

En la denervación la proporción de fibras musculares con núcleos centrales es de 5, 8 y en algunos casos 10% en contraste con las miopatías primarias aumenta el número de núcleos centrales hasta un 90%. En nuestros animales no se observaron proporciones arriba del 3%, que es el nivel máximo normal.

En procesos degenerativos de neuronas motoras se aprecia agrupamiento de fibras, perdiéndose el clásico patrón en mosaico debido al crecimiento axonal de fibras nerviosas que se encuentran cerca del músculo denervado. Dicho crecimiento puede ocurrir de uno u otro nodo de Ranvier a lo largo del axón siendo un crecimiento colateral o terminal (25). Dicho proceso de denervación no se observó en los animales experimentales.

Tampoco pudo observarse degeneración de neurona motora o gliosis en astas anteriores. La células neuronales se observaron claramente y bien delimitados sin datos de proceso degenerativo o similar a la patología observada en los casos de ELA.

Nuestros resultados no comprueban la hipótesis propuesta. Existen varias posibles explicaciones a nuestro intento de desarrollar un modelo experimental de ELA. El proceso patológico de ELA es delicado y toma varios meses; quizá era necesario más de dos años para observar algún cambio, o usar otros animales. Probablemente los anticuerpos encontrados en los sueros de pacientes con ELA sean un epifenómeno que resultan como una respuesta secundaria a la destrucción muscular y no tengan relación con su etiología.

Aunque con ésta metodología no se pudo establecer un modelo experimental de ELA, una de las posibles hipótesis a seguir en una segunda etapa, es la de purificar la porción más reactante del extracto proteico muscular que se obtuvo cuando fue incubada con los sueros de pacientes con ELA e inmunizar primates, que serán estudiados inmunológicamente antes y después de la inoculación por largo tiempo, con objeto de tener un modelo crónico en animales filogenéticamente similares al hombre y con periodos vitales largos que permitan estudios a largo plazo (3-5 años).

Igualmente sueros obtenidos de estos primates y las fracciones purificadas, se aplicarán a cultivos de neuronas motoras para estudiar el posible efecto inhibitorio sobre el crecimiento neurítico y así determinar si los anticuerpos previamente encontrados tienen relación etiológica en el proceso de denervación del músculo esquelético de pacientes con ELA.

## ANEXO I

### SOLUCIONES Y REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS

1. Acrilamida 30%, bis 2.7%

Acrilamida ----- 30.0 gr

Bis acrilamida ----- 0.8 gr

Agua destilada ----- 100.0 ml

Almacenar a 4°C protegida de la luz

2. Amortiguador para gel separador

(Tris-HCl 1.5 M pH 8.8)

Tris-base ----- 36.0 gr

Agua destilada ----- 200.0 ml

Se ajusta a pH 8.8 con HCl antes de aforar

3. Amortiguador para el gel concentrador

(Tris-HCl 0.5 M pH 6.8)

Tris-base ----- 3.0 gr

Agua destilada ----- 50.0 ml

4. Persulfato de amonio al 10%

(preparar antes de usarse)

Persulfato de amonio ----- 0.1 gr

Agua ----- 1.0 ml

5. Dodecil Sulfato de Sodio 10%

(SDS)

SDS ----- 5.0 gr

Agua destilada ----- 50.0 ml

6. Amortiguador para guardar el gel separador

(Tris-HCl 0.375 M pH 8.8 0.1% SDS)

Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 ----- 2.5 ml

SDS al 10% ----- 0.1 ml

Agua destilada aforar a ----- 10.0 ml

7. Amortiguador para tratamiento de la muestra

(Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 2% y glicerol 20% 2-mercapto  
etanol 10% EDTA 0.74%)

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 ----- 2.5 ml

SDS al 10% ----- 2.0 ml

Glicerol ----- 2.0 ml

EDTA ----- 7.4 mg

2-B-mercaptoetanol\* ----- 0.1 ml

Agua destilada aforar a ----- 10.0 ml

Se divide en alícuotas de 1 ml y se congela

\* Se agrega al descongelar cada alícuota 10  $\mu$ l/ml

8. Amortiguador de corrida

(Tris 0.024 M pH 8.3, glicina .192 M SDS 0.1%)

Tris-base ----- 15.0 gr

Glicina ----- 72.0 gr

Agua destilada ----- 5.0 l

9. Solución para teñir los geles

Azul de comassie R-250 -----	0.3 gr
Metanol -----	150.0 ml
Ac. acético glacial -----	50.0 ml
Agua destilada aforar a -----	500.0 ml

10. Solución para desteñir los geles

Acido acético glacial -----	100.0 ml
Agua destilada -----	1.0 l

11. Amortiguador para transferencia

Tris-base -----	3.0 gr
Glicina -----	14.4 gr
Metanol -----	200.0 ml
Agua destilada -----	1.0 l

12. Substrato para peroxidasa

(o-cloronaftol 0.5 mg/ml H2O2 0.03%)

p-cloronaftol -----	30.0 mg
Metanol -----	10.0 ml
PBS -----	50.0 ml
H2O2 al 30% -----	50.0 µl

El o-cloronaftol primero se disuelve en el metanol, se mezcla con el PBS e inmediatamente antes de usarlo se le agrega el H2O2.



TABLA No. 1

	GEL SEPARADOR 10%	GEL CONCENTRADOR 4%
Acrilamida-Bis	26.6 ml	2.6 ml
Amortiguador (2)	20.0 ml	---
Amortiguador (3)	---	5.0 ml
SDS al 10% (5)	0.8 ml	0.2 ml
Agua destilada	31.2 ml	12.2 ml
Persulfato (4)	0.4 ml	0.1 ml
Desgasificar con vacio y agitaci3n 10 minutos		
TEMED	26.0 $\mu$ l	10.0 $\mu$ l
Desgasificar con vacio y agitaci3n 1 minuto		

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## ANEXO II

### TRICROMICO MODIFICADO DE GOMORI

#### SOLUCIONES

##### I Solución tricromica

Chromotrope 2R -----	0.3 gr
Verde rápido -----	0.15 gr
Acido fosfotunstico -----	0.3 gr
Agua destilada -----	50.0 ml
Acido acético -----	0.5 ml

Ajustar el pH a 3.4 bajar a menos de 3.4 con ácido acético, después ajustar a 3.4 con solución saturada de acetato de sodio. Después de una semana se desecha.

##### II Solución de Hematoxilina de Mayer

Cristales de hematoxilina -----	1.0 gr
Agua destilada -----	100.0 ml
Yodato de sodio -----	0.2 gr
Alumbre de potasio o Amonio -----	50.0 gr
Acido cítrico -----	1.0 gr
Hidrato de cloral -----	50.0 gr

Disuelva el alumbre en el agua sin calentar; después agregue la hematoxilina, luego el yodato, el ácido acético y el cloral, agitar hasta que todo esté disuelto.

#### PROCEDIMIENTO

1. Hidratar los cortes (pasándolo desde los alcoholes hasta xilol y agua)
2. Sumergirlos en la hematoxilina de 4 a 5 minutos
3. Lavar tres veces en agua destilada rápidamente
4. Teñir con la solución tricrómica durante 10 a 13 minutos.
5. Diferenciar en solución acuosa de ácido acético al 0.2% (más o menos cinco sumergidas).
6. Deshidratar, aclarar y montar.

## ANEXO III

### HEMATOXILINA EOSINA

#### SOLUCIONES

##### I Solución de hematoxila de Gill

Hematoxilina -----	2.0 gr
Etilenglicol -----	250.0 ml
Yodato de sodio -----	0.2 gr
Sulfato de aluminio -----	17.6 gr
Agua destilada -----	200.0 ml
Acido acético glacial -----	2.0 ml

##### II Solución de Eosina

Eosina -----	5.00 gr
Agua destilada -----	100.00 ml

Diluir al 1% para su uso

#### Procedimiento

- 1.- Desparafinar e hidratar los cortes
- 2.- Teñir con hematoxilina de Harris por 3 minutos
- 3.- Lavarlos en agua de la llave por un minuto en continua agitación.
- 4.- Virar el tejido en carbonato de litio saturado por 20 segundos.
- 5.- Pasar las laminillas a Eosina al 1% por 40 segundos.

6.- Deshidratar

7.- Aclarar y montar en resina.

## ANEXO IV

### NADH - TETRAZOLIUM REDUCTASA (NADH-TR)

#### SOLUCIONES

I Amortiguador de fosfatos 0.2 M a pH 7.4

II Medio de incubación

- |                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| a) Agua bidestilada -----             | 4.0 ml  |
| b) Nitro blue tetrazolium (NBT) ----- | 4.0 gr  |
| c) NADH -----                         | 10.0 mg |
| d) Amortiguador de fosfatos -----     | 6.0 ml  |
| e) Disolver en agua el NBT y NADH     |         |
| f) Agregar el amortiguador (filtrar)  |         |

#### Procedimiento

- 1.- Coloque cortes frescos en una caja de petri en papel filtro
- 2.- Incubar con 2 a 3 gotas con medio de incubación las laminillas asegurándose que quede completamente cubierto el tejido por 50 minutos a 37°C.
- 3.- Lavar en agua bidestilada
- 4.- Montar en glicerol

## ANEXO V

### ADENOSIN TRIFOSFATASA (ATPasa)

pH 9.4

I	Amortiguador de barbital sódico	
	a) Barbital sódico -----	4.12 g
	b) Cloruro de calcio anhidro -----	1.99 g
	c) Agua destilada -----	100 ml
	Se disuelve previamente el cloruro de calcio	

II	Cloruro de Cobalto al 2%	
	Cloruro de cobalto -----	2.0 gr
	Agua destilada -----	100 ml

III Sulfuro de Amonio (1:10)

IV	Medio de Incubación	
	Amortiguador de Barbital sódico -----	30 ml
	Adenosin 5 trifosfato (ATP) -----	45 mg

V Cloruro de Calcio al 2%

#### Procedimiento:

- 1.- Ajustar el pH al medio de incubación a 9.4 con hidróxido de sodio.
- 2.- Incubar los cortes a 37°C en la solución IV

- 3.- Enjuagar en agua destilada
- 4.- Transferir al cloruro de calcio al 2% por 3 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Transferir al cloruro de cobalto por 3 minutos.
- 6.- Lavar en agua destilada 10 cambios de 60 segundos cada uno.
- 7.- Transferir a la solución diluida de sulfuro de amonio de 10 a 30 segundos.
- 8.- Lavar en agua de la llave de 7 a 10 minutos y checar al microscopio que no queden precipitados.
- 9.- Deshidratar, aclarar y montar.



ANEXO VI  
COLINESTERASA NAMBA

SOLUCIONES

I Medio de incubación

a) Ioduro de acetiltiocolina -----	200 mg
b) Agua destilada -----	8 ml
c) Sulfato de Cobre Pentahidratado 0.1M -----	14 ml
d) Glicina -----	124 mg
e) Acetato de sodio 1.0M -----	6 ml

Modo de preparar

Disolver el ioduro de acetiltiocolina en agua y añadir muy lentamente la solución de sulfato de cobre. El producto final tiene color café. Dejar descansar por 10 minutos y después filtrar; la solución entonces deberá tener un color verde. Añadir la glicina y el color nuevamente cambiará para verde oscuro, agregar el acetato y la solución se volverá azul, Aforar a 100 ml con agua destilada. Dejar descansar por 15 minutos.

II Solución Reductora

Sulfuro de Amonio al 0.5% (usar agua de la llave)

III Solución de Plata

Nitrato de Plata -----	10.00 gr
Sulfato de cobre pentahidratado -----	0.05 gr
Carbonato de Calcio -----	0.10 gr
Agua destilada -----	100 ml

(No se disuelve completamente)

#### IV Solución Reductora

Hidroquinona -----	1 gr
Na SO -----	5 gr
Agua destilada -----	100 ml

#### Procedimiento

- 1.- Incubar las laminillas en la solución I por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 2.- Lavar en agua de la llave 4 veces.
- 3.- Revelar una laminilla de 1 a 2 minutos con la solución II para estandarizar el tiempo y procesar las demás.
- 4.- Lavar 4 veces en agua de la llave.
- 5.- Lavar 4 veces en agua destilada.
- 6.- Dejar 1 hora en agua destilada.
- 7.- Sumergir en ferrocianuro de potasio al 0.25% por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 8.- Lavar 2 veces en agua destilada durante 10 minutos.
- 9.- Alcohol absoluto por una hora.
- 10.- Agua destilada por una hora.
- 11.- Incubar en la solución III a 37°C por 90 minutos.
- 12.- Escurrir la laminilla sobre papel filtro pasar rápidamente por agua destilada y volver a escurrir.
- 13.- Pasar a la solución IV por 10 minutos agitando en el primer minuto.
- 14.- Lavar en agua destilada.
- 15.- Lavar en agua de la llave.
- 16.- Deshidratar, clarificar y montar.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Antel JP, et al. Immunology of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Human motor neuron diseases. Ed: Lewis P. Rowlando. Raven Pres. New York 1982; 395-401.
2. Ordóñez LG, Sotelo MJ. Antibodies against fetal muscle proteins in serum from patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. Neurology 1989; 39; 683-686.
3. Weiner LP, Stohlman SA, David RL. Attempts to demonstrate virus in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Neurology 1980; 30; 1319-1322.
4. Hauser SL, Cazinul PA, et al. Immunoblot analysis of circulating antibodies against muscle proteins in Amyotrophic Lateral Sclerosis and other neurologic diseases. Neurology 1986; 36; 1614-1618.
5. Brown RH, Johnson D, Orgonowski M, Weiner HL. Antineural antibodies in the patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. Neurology 1987; 37; 152-155.
6. Gurney ME, Belton AC, et al. Inhibition of terminal axonal sprouting by serum from patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. N. Engl. J. Med. 1984; 311; 933-939.

7. Colmant HJ. Progressive bulbar palsy in adults. In: Vinken PJ, Bruyn GW (eds). Handbook of Clinical Neurology. North Holland, Amsterdam 1975, Vol. 22, Cap. 16; 111-156.
8. Tandam R, Bradley WG. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Part 1. Clinical features, pathology and ethical issues management. Ann. Neurol. 1985; 18; 271-280.
9. Tandam R, Bradley WG. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Part 2 Etiopathogenesis. Ann. Neurol. 1985; 18; 419-431.
10. 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.
11. Hawley RJ, Kratz R, Goodman RR. Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis with the TRH analog DN-1417. Neurology 1987; 37; 715-717.
12. Imoto K, Saida K, Iwamura K. Amyotrophic Lateral Sclerosis a double blind crossover trial of thyrotropin- relaxing hormone. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1984; 47; 1332-1334.

13. Mora JS, Munsat TL, Kao KP. Intrathecal administration of natural human interferon alpha in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Neurology 1986; 36; 1137-1140.

14. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Faro AL, Rondall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193; 265-275.

15. Laemli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227; 680-685.

16. Towbin H, Staenli T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheath; procedures and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979; 76; 4350-4354.

17. Kandel RE, Schwartz HJ, Jessell TM. Principles of neural science. E. Elsevier, New York, 3a. ed. 1991; 283-287.

18. Thompson RA. Techniques in clinical immunology. Ed. Blackwell Scientific Publications, London. 2a. ed, 1981; 2-8.

19. Harrison TR. Medicina interna. Ed. La prensa médica, México, 3a. ed. 1970; 524-529.

20. Greenfield's. Neuropathology. Ed. John Wiley Sons. New York, 4a. ed. 1984; 1027-1055.

21. Iwasaki Y, Ikeda K, Kinoshita M. Plasma amino acid levels in patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. J. Neurol. Sci. 1992; 107; 219-222.
22. Li F, Pestronk A. Autoantibodies to GM1 ganglioside: Different reactivity to GM1-liposomes in Amyotrophic Lateral Sclerosis and lower motor neuron disorders. J. Neurol. Sci. 1991; 104; 209-214.
23. Drachman BD, Kunkel RW. Amyotrophic Lateral Sclerosis: An unconventional autoimmune disease. Ann. Neurol. 1989; 26; 269-274.
24. Lamb LN, Pattern MB. Clinical correlations of anti-GM1 antibodies in Amyotrophic Lateral Sclerosis and neuropathies. Muscle and Nerve. 1991; 14; 1021-1027.
25. Irant R, Brow MC, Halland RL. Stimuli to intramuscular nerve growth. Brain Res. 1978; 156; 351-354.
26. Kusaka H, Imai T, Hashimoto S, Yamamoto T, Maya K, Yamasaki M. Ultrastructural study of chromatolytic neurons in an adult onset sporadic case of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Acta Neuropathol. 1981; 75; 523-528.

27. Bjornskow EK, Norris FH, Kuby MJ. Quantitative axon terminal and end-plate morphology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Arch. Neurol. 1984; 41; 527-530.
28. Dubowitz V. Muscle biopsy. Ed. Bailliere. Tindal 2a ed, 1985: 19-129.
29. Toyokura Y, Mannen T, Ishibashi Y. Amyotrophic Lateral Sclerosis histologic, histochemical and ultrastructural abnormalities of skin. Neurology 1986; 36; 948-956.
30. Kamo H, Haerbara H, Akiguchi I, Kameyama M. A distinctive distribution of reactive astroglia in the precentral cortex in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Acta Neuropathol. 1987; 74; 33-38.
31. Barr LM. The human nervous system. Ed. Harla, México, 4a. ed. 1986: 49-69.
32. Behnia M. Kelly JJ. Role of electromiography in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Muscle and Nerve. 1991; 14; 1236-1241.
33. Langone JJ. Use of labeled protein A in quantitative immunochemical analysis of antigens and antibodies. J. Immunological Methods. 1982; 51; 3-22.
34. Towbin H, and Gordon. Immunoblotting and dot immunobinding current status and outlook. J. Immunological Methods. 1984; 72; 313-340.

35. Sadaul 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.
36. 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.
37. Brown RH, Johnson D, Ogonowski BA, Ulenier HL. Antineural antibodies in the serum of patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurology*. 1987: 37; 152-155.
38. Gulati AK, Riuner MH, Swift TR, Sohal G. Growth of skeletal muscle from patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. Transplanted into nude mice. *Muscle and Nerve*. 1988: 11; 33-38.
39. Lonat and Rosenthal J. Control of acetylcholine sensitivity by muscle activity in the rat. *J. Physiol (London)* 1972: 221; 493-513.
40. Drachman DB, Witzke T. Trophic regulation or acetylcholine sensitivity of muscle effect of electrical stimulation. *Science* 1972: 176; 514-516.
41. Herzenberg LA. *Handbook of experimental immunochemistry*. Oxford (London) 1986: Cap. 8.



42. Walton J. Disorders of voluntary muscle. London and New York: Ed. Churchill, Livingstone. 4a. ed. 1981.

43. Oppenheim RW, Haverkamp LJ, Prevetie D. Reduction of naturally occurring motoneuron death in vivo by a target derived neurotrophic factor. Science 1988; 240: 919-922.

44. Guillen EL, Neale JN, Bullock PN, Schrier SK, Nelson PC. Choline acetyltransferase activity of spinal cord cell cultures increased by coculture with muscle and muscle cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977; 78: 2625-2629.

45. Smith RG, Appel SH. Evidence for a skeletal muscle protein enhances neuron survival neurite extension and acetylcholine synthesis. Neurosci. Abstr. 1981; 7: 144.