

Universitat Rovira i Virgili
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Unitat d'Histologia i Neurobiologia

ESTUDI FISIOPATOLÒGIC DE L'ACCIÓ D'ANTICOSSOS
IgM ANTI-GM2 D'UN PACIENT SOBRE LA UNIÓ
NEUROMUSCULAR

M. del Mar Sabaté Martínez

Tesi Doctoral

Maig 2006

Aquesta tesi ha estat realitzada a la Unitat d'Histologia i Neurobiologia del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili, sota la codirecció del Dr. Manel Santafé Martínez, del Dr. Nicolau Ortiz Castellon i del Dr. Josep M. Tomàs i Ferré.

1.-INTRODUCCIÓ

En els últims anys ha sorgit un nou camp d'investigació neurològica que relaciona els gangliòsids amb les neuropaties perifèriques. Els anticossos anti-gangliòsid han estat trobats en diferents malalties dels nervis perifèrics. Títols elevats d'anticossos contra gangliòsid s'han associats amb neuropaties agudes com són la síndrome de Guillain-Barré, la síndrome de Miller-Fisher, la neuropatia motora multifocal, i també amb polineuropaties cròniques desmielinitzants.

Els gangliòsids són un tipus de glicolípidis àcids formats per una ceramida unida a una part carbohidratada. La ceramida està immersa en la membrana lipídica i l'estructura polar es troba orientada extracel·lularment, un lloc accessible a l'atac immunològic. Els gangliòsids es troben localitzats en les membranes plasmàtiques de les cèl·lules dels mamífers on estan involucrats en diferents funcions cel·lulars. S'ha vist que interactuen amb receptors per factors de creixement, canals iònics, molècules d'adhesió i reconeixement cel·lular, etc. També tenen efectes en la sinaptogènesi i en la transmissió sinàptica.

La unió neuromuscular és vulnerable a l'atac d'anticossos donat que està fora de la protecció de la barrera hematonerviosa i recentment s'ha proposat com a possible blanc per l'atac de les immunoglobulines anti-gangliòsid en certes neuropaties perifèriques.

En aquest treball s'ha estudiat els efectes sobre la unió neuromuscular i la neurotransmissió d'uns anticossos anti-gangliòsids trobats en el sèrum d'un pacient diagnosticat de neuropatia crònica desmielinitzant que portava associat un component monoclonal IgM, i si aquest efectes correlacionen amb els que presentava el pacient.

1.1.-Unió neuromuscular

La major part del que es coneix al voltant dels mecanismes de transmissió sinàptics provenen d'experiments realitzats sobre la unió neuromuscular.

La unió neuromuscular o sinapsi neuromuscular (NMJs; *Neuromuscular Junction*) és el punt on contacten el teixit nerviós, concretament les neurones motores, i les cèl·lules del teixit muscular esquelètic. És l'estructura responsable de la transmissió de l'impuls motor nerviós a la fibra muscular estriada, el qual provocarà la contracció del teixit muscular.

La sinapsi neuromuscular és una sinapsi nicotínica i colinèrgica ideal per l'estudi de diferents aspectes de l'estructura i funció sinàptica. Té una mida relativament gran i la seva fàcil accessibilitat permet la realització d'estudis electrofisiològics i morfològics. En els últims 50 anys aquesta sinapsi ha servit com a prototipus per entendre els mecanismes involucrats en la transmissió sinàptica (Salpeter, 1987).

Aquesta estructura complexa està constituïda per una part presinàptica, composta alhora per un terminal nerviós motor i una cèl·lula de Schwann presinàptica, una part postsinàptica, que la constitueixen la superfície de la fibra muscular i la seva làmina basal, i per la separació entre les dues que s'anomena fenedura sinàptica o espai sinàptic (Figura 1).

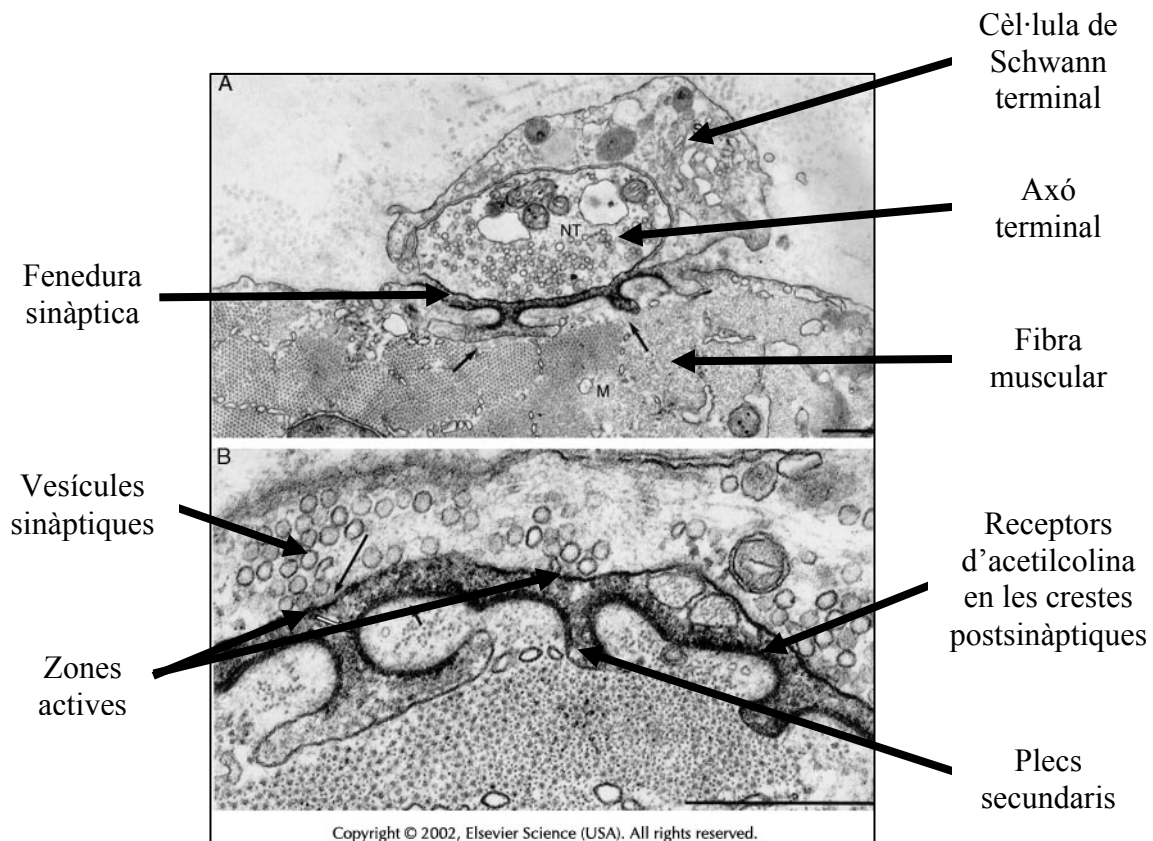


Figura 1: Sinapsi Neuromuscular. Imatge en microscopia electrònica de la unió neuromuscular.

1.1.1.- Part presinàptica

La part presinàptica de la unió neuromuscular està formada pel terminal nerviós i per una cèl·lula de Schwann.

El terminal nerviós és la part final de l'axó d'una motoneurona i fa contacte amb la fibra muscular. És l'estructura encarregada de l'alliberament del neurotransmissor, en aquest cas l'acetilcolina (ACh; *Acetylcholine*). L'ACh s'emmagatzema en el terminal nerviós en petites esferes amb coberta membranosa d'uns 50-60 nm de diàmetre, anomenades vesícules sinàptiques. Cada vesícula conté a més de molècules d'ACh, ATP i proteoglicans que s'alliberen juntament amb el neurotransmissor (Salpeter, 1987). A

part de les vesícules sinàptiques en el terminal nerviós també hi són presents les vesícules cobertes o vesícules *coated* i les vesícules de centre electro-dens o vesícules *core*. Les vesícules cobertes són de mida semblant a les vesícules sinàptiques però tenen la membrana coberta de partícules poligonals de la proteïna clatrina. Aquestes vesícules són les encarregades del reciclament de la membrana axònica després del procés de la neurotransmissió (Heuser i Reese, 1973; Heuser i cols., 1974; Schmid i cols., 1984). Les vesícules de centre electro-dens, minoritàries i de 70 nm de diàmetre, segreguen factors neurotròfics. S'han relacionat amb la inducció de la síntesi de proteïnes involucrades en la neurotransmissió a la membrana postsinàptica i són alliberades després d'una estimulació prolongada del nervi (Pecot-Dechavassine i Brouard, 1993 i 1997).

En la membrana del terminal nerviós o axolema hi ha unes especialitzacions electro-denses al microscopi electrònic situades en front dels plecs secundaris postsinàptics (especialitzacions de la membrana postsinàptica, veure més avall), on es donen agrupaments de les vesícules sinàptiques, certes proteïnes i alguns components del citoesquelet axònic. Aquests agrupaments formen el que s'anomenen les zones actives (ZA). Les zones actives són els punts d'alliberament del neurotransmissor (Salpeter, 1987). Amb l'arribada d'un impuls elèctric al terminal nerviós, les vesícules fusionen les seves membranes plasmàtiques a les del terminal i produeixen l'alliberament del seu contingut a l'espai extracel·lular per exocitosi. Cada vesícula conté 10.000 molècules d'ACh (Salpeter, 1987).

A la membrana de les zones actives i a la membrana de les vesícules sinàptiques hi ha proteïnes que es troben relacionades i faciliten l'exocitosi del neurotransmissor, mitjançant l'adhesió i posterior fusió de les dues membranes formant sinaptoporus (Heuser i Reese, 1973; Kandel, 1991). En les zones actives també hi han canals de calci

(Heuser i cols., 1974; Catterall, 1999) donat que la neurotransmissió és un procés dependent de calci (Katz i Miledi, 1965). El mecanisme molecular pel qual es dona l'adhesió i fusió de la membrana de les vesícules a les zones actives encara no es coneix amb exactitud. Es coneixen la funció de certes proteïnes, per exemple, en les vesícules hi ha proteïnes sensores de calci com la sinaptotagmina que s'activa amb l'augment de calci que es produeix en el terminal quan arriba un potencial d'acció. També trobem proteïnes en la membrana de les zones actives que formen un complex macromolecular que desenvolupa un paper essencial en la fusió de les membranes (syntaxina, sinaptobrevina i SNAP-25) (Sanes i Lichtman, 1999; Purves i cols., 2004). A part d'aquestes proteïnes n'existeixen d'altres, en les vesícules sinàptiques, que ajuden a elles i a totes les proteïnes necessàries pel funcionament del terminal nerviós, en el seu transport des del soma neural a la terminació nerviosa, en l'anomenat transport axonal. En les zones actives junt amb les vesícules sinàptiques també trobem components del citoesquelet. Aquest citoesquelet està format per microtúbuls i neurofilaments. Les vesícules sinàptiques es fixen als neurofilaments de tipus actomiosínic que estan a la vegada adherits a les zones actives, fent que les vesícules sinàptiques s'agrupin i es disposin en doble filera al voltant dels llocs d'alliberament del neurotransmissor (Heuser i cols., 1974).

En el terminal nerviós apareixen diferents orgànuls degut a que el soma neural es troba molt lluny. Es veuen abundants mitocondris, que proporcionen l'energia necessària (en forma d'ATP) per la síntesi i l'alliberament del neurotransmissor, reticle endoplasmàtic llis i endosomes on es dona el reciclatge de les vesícules per crear vesícules sinàptiques buides de neurotransmissor (que després s'ompliran amb ACh i s'utilitzaran de nou per la neurotransmissió). En el citoplasma es produeix la síntesi d'ACh per part de la colin-

acetiltransferasa (ChAT; *Choline Acetyltransferase*) mitjançant la colina recuperada de la fenedura (alliberada per l'acetilcolinesterasa o AChE) i acetil-CoA procedent dels mitocondris. Com ja em dit, també hi ha microtubuls i microfilament que actuen en el transport axoplasmàtic entre el soma de la motoneurona i el terminal, i també dirigeixen les vesícules sinàptiques a les zones actives.

Quan es produeix l'alliberament del neurotransmissor les membranes de les vesícules sinàptiques es fusionen amb la membrana del terminal. Aquest excés de membrana que es produeix es eliminat per un reciclatge en les perifèries de les sinapsis formant les vesícules cobertes (Heuser i Reese, 1973). Durant aquest procés d'endocitosi es recupera la colina que és alliberada per l'AChE.

A diferència de la cèl·lula de Schwann que envolta l'axó, la cèl·lula Schwann presinàptica o terminal (TSC; *Terminal Schwann Cell*) no forma la típica beina de mielina sobre el terminal. En aquest nivell la TSC forma una làmina plana que cobreix tot el terminal nerviós i precinta la fenedura sinàptica amb els seus extrems (Salpeter, 1987) (Figura 1).

Aquesta cèl·lula Schwann especialitzada té com a funció protegir el terminal nerviós del medi extracel·lular i contribuir al manteniment de l'estructura i la funció sinàptica a llarg termini. A més, és essencial pel creixement i manteniment de la unió neuromuscular durant el desenvolupament, dicta el patró de innervació i indueix l'expressió i agregació dels AChR postsinàptics (Koirala i cols., 2003). Aquests mateixos autors han vist que en amfibis, les TSCs no intervenen en la neurotransmissió. Estudis més recents amb rosegadors també confirmen aquesta dada (Halstead i cols.,

2005b). Altres autors, pel contrari, diuen que a part del manteniment estructural les TSCs tenen un paper essencial en la neurotransmissió ajudant a l'alliberament del neurotransmissor (Robitaille, 1998; Colomar i Robitaille, 2004).

Diferents estudis també demostren que les prolongacions esteses per les TSCs guien als nervis durant el desenvolupament sinàptic, el remodelament en l'adult i en la regeneració després d'un dany axonal (Son i Thompson, 1995; Reddy i cols., 2003).

1.1.2.- Part postsinàptica

La part oposada a la regió presinàptica de la unió neuromuscular és el que denominem la part postsinàptica (Figura 1). Aquesta part postsinàptica està formada per la membrana de la fibra muscular i la làmina basal d'aquesta, que en aquest punt sofreix una especialització.

La fibra muscular té forma cilíndrica, però en la part on rep el nervi es torna plana i forma el que s'anomena la placa motora. Aquesta estructura està centrada i ocupa una tercera part de la circumferència de la fibra. Les branques nervioses terminals descansen en depressions de la membrana postsinàptica anomenats plecs sinàptics primaris. Aquesta àrea de la superfície muscular postsinàptica es veu incrementada per invaginacions de la membrana plasmàtica formant el que es denomina els plecs sinàptics secundaris. Aquests són paral·lels entre sí i perpendiculars al plec primari, i penetren dins del miòcit (o fibra muscular) aproximadament 1 µm en els mamífers (Salpeter, 1987).

Els llocs d'alliberament del terminal nerviós estan en oposició als cims o crestes dels plects secundaris de la membrana muscular postsinàptica, i es veuen com a zones denses en microscopia electrònica (Birks i cols., 1960). En aquestes crestes es localitza la major concentració de receptors per al neurotransmissor, que en aquest cas són receptors per l'acetilcolina (AChR; *Acetylcholine Receptor*). La concentració d'AChR en la placa motora és de 10.000 receptors/ μm^2 . Fora del lloc sinàptic aquesta concentració és de 1.000 o menys (Salpeter, 1987). Els AChR estan fortament ancorats en els cims, per mig de la rapsina, a un complex proteic anomenat *dystrophin-related-complex* (DRC). D'aquest complex formen part proteïnes i glicoproteïnes com la rapsina, la utrofina i el β -dístroglican, d'entre altres, les quals s'ha vist que uneixen el citoesquelet a la làmina basal. La rapsina és una proteïna que es relaciona directament amb el *clustering* o agrupament dels AChR durant el desenvolupament (Hall i Sanes, 1993; Sanes i Lichtman, 1999). En el fons dels plects trobem canals de Na^+ postsinàptics juntament amb altres proteïnes estructurals (Flucher i Daniels, 1989).

Els AChRs de les crestes postsinàptiques són receptors nicotínics (nAChR) que formen un canal iònic. Estan constituïts per 4 subunitats, que s'agrupen formant un pentàmer. En els mamífers es coneixen dos isoformes pels AChRs: els AChRs adults estan formats per dues subunitats α , una subunitat β , una δ i una ϵ ($\alpha_2\beta\delta\epsilon$); en canvi, durant el desenvolupament la subunitat ϵ es troba substituïda per una γ ($\alpha_2\beta\delta\gamma$). Les 4 subunitats tenen seqüències d'aminoàcids semblants, cadascuna conté 4 hèlix α , anomenades de M1 a M4, que travessen la membrana. El segment M2 és el que forma el canal iònic. Els AChRs tenen dos lloc d'unió a l'ACh, un en cada subunitat α . Quan s'uneixen les dos molècules ACh el receptor pateix un canvi conformacional que obre el canal iònic i deixa entrar Na^+ a l'interior de la fibra muscular i sortir K^+ . Aquest trànsit iònic

desencadena una despolarització de la membrana postsinàptica que finalitzarà amb la contracció de la fibra muscular.

Els nAChR són contínuament renovats i els receptors vells són internalitzats i degradats.

La vida mitjana dels AChRs durant el desenvolupament és de menys de 24 h i en l'adult de 8 a 11 dies. Aquesta síntesi està regulada pels nuclis sinàptics (veure més endavant).

En la regió subsinàptica de la fibra muscular, l'espai que queda sota la placa motora, es dona una acumulació de nuclis, mitocondris i citoesquelet. Els nuclis se'ls denomina nuclis sinàptics i són els responsables de l'elevada concentració d'AChRs (i renovació d'aquests) i altres proteïnes sinàptiques específiques degut a l'alta transcripció genètica localitzada en aquests nuclis subsinàptics. A part també hi trobem aparell de Golgi, ribosomes i vesícules pinocítiques. El citoesquelet, microtúbuls i microfilament, s'encarrega del manteniment dels plecs primaris i secundaris i de l'ancoratge dels AChR; unint els AChR al citoplasma mitjançant diferents proteïnes (complex DRC).

La làmina basal sinàptica és la lamina basal que cobreix la fibra muscular en els llocs sinàptics. Aquesta làmina passa a través de la fenedura sinàptica (gruix aproximat de 10-15 nm) i s'estén dins dels plecs sinàptics, tant primaris com secundaris (Salpeter, 1987). La composició d'aquesta làmina és similar a la làmina basal extrasinàptica i a les ubicades en la resta dels òrgans, únicament que en la zona sinàptica la làmina basal adopta una composició molecular específica. Les isoformes dels components bàsics que la formen són diferents (laminina i col·lagen IV); i sobretot es diferencia en les molècules específiques que hi trobem. Aquesta làmina basal sinàptica permet la íntima adhesió de l'axó al component postsinàptic per mig de complexos laminina-integrina i molècules tipus N-CAM (molècules d'adhesió neural). A part d'aquesta funció més

estructural, també s'ha vist que organitza i manté els components pre- i postsinàptics durant el desenvolupament i la regeneració, i garanteix la neurotransmissió en l'adult (Sanes, 1983; Patton, 2003).

Una de les molècules específiques que hi trobem dins de la làmina és l'enzim acetilcolinesterasa (AChE; *Acetylcholine Esterase*). Aquest enzim desactiva els AChRs al hidrolitzar les molècules d'ACh en acetil i colina. L'AChE finalitza l'acció de l'ACh i activa de nou els AChRs. L'AChE és sintetitzada pels músculs i es localitza en la làmina basal dels plecs sinàptics. La seva concentració és aproximadament de 3.000 molècules/ μm^2 en la membrana postsinàptica i la vida mitja és de 3 setmanes (Salpeter, 1987).

L'agrina és una glicoproteïna localitzada també en aquesta làmina. És sintetitzada pel terminal nerviós i s'uneix al receptor de membrana MuSK. La unió de l'agrina neural al receptor muscular MuSK inicia una cascada de senyalització intracel·lular que presumiblement afavoreix l'agrupament dels AChRs, a més d'altres proteïnes específiques com l'AChE, la rapsina i altres (Hall i Sanes, 1993).

Altres proteïnes que interactuen amb la làmina basal són les que formen el complex proteic DRC. La interacció d'aquestes proteïnes uneix la làmina basal al citoesquelet muscular el que afavoreix l'acció de l'agrina sobre el *clustering* dels AChRs.

Quan un axó motor s'apropa al múscul que ha d'innervar es divideix progressivament i pot arribar a innervar més d'una fibra muscular. Al conjunt de motoneurona i cèl·lules musculars innervades per aquesta s'anomena unitat motora.

Normalment una fibra muscular està innervada per un sol axó, però hi ha diferents situacions on es poden trobar fibres poliinnervades (més d'una sinapsi per fibra) com són el desenvolupament i la regeneració neuromuscular.

1.1.3.- La fenedura sinàptica o espai sinàptic

L'espai entre el terminal nerviós i la membrana postsinàptica de la fibra muscular és aproximadament de 50 nm i s'anomena fenedura sinàptica. En mig d'aquesta fenedura hi trobem la lamina basal sinàptica.

La difusió de l'ACh a través de la fenedura sinàptica és molt ràpida (50 ms) deguda a la curta distància que ha de travessar i a l'elevada constant de difusió que té l'ACh en la làmina basal sinàptica (Salpeter, 1987).

1.2.- Neurotransmissió

1.2.1.- Transmissió sinàptica en la unió neuromuscular

L'impuls motor nerviós es conduït passivament des del soma neural de les motoneurons (en la medul·la espinal) als terminals nerviosos per mig de l'anomenada conducció saltatòria (Huxley i Stampfli, 1949; Tasaki, 1959). Aquesta conducció es deu al fet que els canvis de permeabilitat de la membrana de l'axó, produïts durant el pas del potencial d'acció (entrada de Na^+ i sortida de K^+ , i posterior repoblació) es donen en els nòduls de Ranvier (llocs on la beina de mielina que recobreix tot l'axó és més prima); per tant, la conducció és més ràpida i no es perd tanta energia.

Quan l'impuls nerviós arriba al terminal nerviós despolaritza la membrana obrint els canals Na^+ presinàptics. Aquesta despolarització indueix l'obertura dels canals de calci dependents de voltatge (*Voltage Dependent Calcium Channel*, VDCC; veure apartat posterior). L'entrada de calci al terminal és essencial per l'alliberament de l'ACh (Katz i Miledi, 1965; Miledi, 1973). L'obertura dels canals de calci presinàptics provoca un augment de la concentració de calci en el terminal, la qual estimula la fusió de les membranes de les vesícules sinàptiques a les zones actives del terminal amb el posterior alliberament del seu contingut a la fenedura sinàptica. Aquest procés va ser confirmat amb estudis de microscopia electrònica, on es veia que després d'una estimulació nerviosa es reduïa el nombre de vesícules en el terminal (Heuser i Reese, 1973; Birks, 1974). Aquest fenomen també es va ratificar amb tècniques de criofactura, on es van visualitzar les vesícules en el moment de l'alliberament (Heuser i cols., 1974).

Després de l'exocitosi, el neurotransmissor difon per tota la fenedura sinàptica i s'uneix als seus receptors postsinàptics, els nAChRs. La unió de dos molècules d'ACh a les dos subunitats α activa el receptor i obre el canal iònic intramolecular. El flux de corrent resultant induïda pel neurotransmissor, l'obertura del canal permet el pas simultani de ions Na^+ al seu interior i la sortida de ions K^+ , altera el potencial de membrana postsinàptic i dona com a resposta una despolarització local de la membrana de les fibres musculars (l'anomenat EPP; veure més avall). Aquesta despolarització local activa els canals de Na^+ dependents de voltatge postsinàptics, localitzats en el fons dels plecs secundaris (Flucher i Daniels, 1989), desencadenant un potencial d'acció que es propaga en totes les direccions de la fibra muscular i que va als sistemes de túbuls T musculars on s'inicia una seqüència d'esdeveniments intracel·lulars que finalitza amb la contracció de la fibra.

Després de l'activació dels seus receptors, l'ACh se separa d'aquests i difon cap a la membrana basal on es hidrolitzada per l'AChE. La hidròlisis de l'ACh finalitza el procés de transmissió sinàptica en les unions neuromusculars.

La despolarització local provocada per l'activació dels receptors d'ACh per la unió del transmissor s'anomena potencial de placa postsinàptic evocat o *endplate potential* (EPP), amb una amplitud mitja de 15-40 mV (Fatt i Katz, 1951). Aquesta amplitud depèn de varis factors com són el tipus muscular, l'espècie i l'edat. A més dels episodis d'alliberament d'ACh evocats, hi ha un alliberament espontani d'ACh en els terminals nerviosos (no necessita de l'estimulació del nervi) que dona com a resultat un potencial de placa en miniatura o *miniature endplate-potential* (MEPP). Aquestes petites despolaritzacions postsinàptiques d'aproximadament 0.5-1 mV i freqüència de 1 Hz (1 per segon) van ser descrites per primera vegada per Fatt i Katz (1952), quan estaven fent registres electrofisiològics en músculs de granota. Tant la freqüència com l'amplitud d'aquests successos depenen de diferents factors i varien entre espècies i tipus musculars, així com amb l'edat. Un MEPP individual és massa petit per disparar un potencial d'acció i el seu paper fisiològic encara està per descobrir.

En estudis electrofisiològics es va veure que l'alliberament d'una vesícula sinàptica provocava l'aparició d'un MEPP i que, comparant la mida de les amplades, els EPPs que seguien un impuls nerviós estaven formats per la suma independent de múltiples MEPPs (Fatt i Katz, 1952). Per tant, es va dir que l'alliberament del neurotransmissor es produïa en paquets separats o quantes i que cadascun produïa un MEPP. Una quanta és la suma d'ACh alliberada per vesícula i un potencial d'acció presinàptic produeix un EPP postsinàptic perquè sincronitza l'alliberament de molts quantes de transmissor

(Teoria quantal de la neurotransmissió; Del Castillo i Katz, 1954). En estudis posteriors es va determinar el número de molècules que componen un quanta, aproximadament unes 10.000 molècules d'ACh per vesícula (Kuffler i Yoshikami, 1975; Miledi i cols., 1983). La sinapsi neuromuscular és un mecanisme altament eficaç; sota condicions normals cada impuls nerviós dona una contracció muscular. Per aconseguir això, moltes molècules d'ACh s'alliberen per disparar un potencial muscular.

Una altra dada important és el número de quantes alliberades per impuls, l'anomenat contingut quàntic. Els MEPPs són el resultat de l'alliberament d'una única vesícula d'ACh o quanta i els EPPs de 20-300 vesícules alliberades depenent de l'espècie estudiada (en diferents animals de laboratori 200-300 quantes (Hubbard i Wilson, 1973; Katz i Miledi, 1979) i en músculs humans de 28-41 quantes (Engel i cols., 1990; Slater i cols., 1992)).

1.2.2.- Canals de calci dependents de voltatge

Els canals de calci dependents de voltatge (VDCC; *Voltage Dependent Calcium Channel*) són uns canals transmembrana que quan arriba un potencial d'acció al terminal nerviós augmenten la seva permeabilitat al Ca^{2+} extracel·lular. Aquest augment de calci provoca la unió de les vesícules sinàptiques a la membrana del terminal nerviós, produint-se així l'exocitosi d'ACh i provocant la neurotransmissió (Heuser i cols., 1974; Catterall, 1999). Els canals de calci han estat localitzats en les zones actives i presumiblement formen complexos amb la maquinària de neuroexocitosi, juntament amb la SNAP-25, la syntaxina i la sinaptofisina (Catterall, 1999; Taverna i cols., 2004).

En base a les seves propietats electrofisiològiques i farmacològiques, els VDCCs es poden classificar en diferents subtipus: els canals d'activació lenta o activats per baix voltatge (*low-voltatge-activated*; LVA) com serien els canals T i els canals d'activació ràpida o activats per alt voltatge (*high-voltatge-activated*; HVA) que són els canals L, N, P/Q i R. Aquests canals estan compostos per una subunitat formadora de porus o α_1 , a la qual s'uneixen la majoria dels agents farmacològics, dues subunitats estructurals-reguladores, $\alpha_2\delta$ i β , a més d'una quarta subunitat moduladora del flux de Ca^{2+} , la unitat γ (Catterall, 2000; Sandoval-Romero i Felix-Grijalva, 2003).

Diferents estudis demostren que la neurotransmissió en els terminals nerviosos de sinapsis de mamífers adults està relacionada amb el calci que entra a través dels canals P/Q, donat que diferents estudis farmacològics han suggerit que el blocador específic dels canals P/Q, ω -Agatoxina-IVA, impedeix la transmissió neuromuscular en ratolins adults (Uchitel i cols., 1992; Protti i Uchitel, 1993; Bowersox i cols., 1995; Hong i Chang, 1995) i en músculs humans (Protti i cols., 1996). D'altres estudis es desprèn que, ni el canal L ni el canal N participen en la neurotransmissió de les unions neuromusculars adultes (Penner i Dreyer, 1986; Atchison, 1989; Bowersox i cols., 1995; Lin i Lin-Shiau, 1997).

Alguns d'aquests resultats es veuen reforçats utilitzant tècniques d'immunocitoquímica amb anticossos específics per la subunitat α_1 dels VDCC. Diferents autors han trobat que la subunitat α_{1A} (formadora del canal de calci tipus P/Q) i la subunitat α_{1B} (formadora del canal de calci tipus N) se situen en la part presinàptica de la unió neuromuscular tant de músculs adults humans com de rates (Day i cols., 1997; Westenbroek i cols., 1998). La presència de la subunitat α_{1A} en la part presinàptica de la

unió coincideix amb el fet que és el canal P/Q l'involucrat en la neurotransmissió de mamífer adult.

Encara que el canal P/Q és el responsable de la neurotransmissió en l'adult, hi ha diferents condicions experimentals o patològiques on s'ha vist que estan implicats més d'un canal de calci a part del canal P/Q. Una d'aquestes condicions seria la reinnervació, on Katz i col·laboradors (1996) van trobar que la neurotransmissió també està acoblada al canal L. En estudis de la nostra unitat, també es va veure l'aparició dels canals L i N acoblats a la neurotransmissió durant el període de recuperació després d'un bloqueig de la neurotransmissió per l'administració de toxina botulínica en músculs de ratolí adult (Santafe i cols., 2000). Altres autors relacionen el canal de calci tipus L amb la neurotransmissió en l'adult quan s'inhibeixen les proteïnes fosfatases i el calci intracel·lular està compromès amb el quelant BAPTA (Urbano i cols., 2001). Una altra situació on s'ha vist una modificació dels canals de calci és quan la subunitat α_{1A} del canal P/Q és eliminada genèticament. En aquest cas la neurotransmissió depèn dels canals N i R (Urbano i cols., 2003).

No tots els autors asseguren que la neurotransmissió en l'adult únicament depèn del canal tipus P/Q, sobretot si ens fixem en la neurotransmissió espontània. La neurotransmissió espontània pot estar inhibida tant pel blocador específic de canal tipus N, ω -CgTX-GVIA (Protti i cols., 1991), com pel blocador de canal L, nifendipina (Losavio i Muchnik, 1997).

En els últims anys han sorgit diferents estudis que relacionen els canals de calci i l'alliberament del neurotransmissor durant el desenvolupament de les unions

neuromusculars d'aus (Gray i cols., 1992), amfibis (Fu i Huang, 1994) i mamífers (Uchitel i cols., 1992; Sugiura i Ko, 1997; Santafe i cols., 2001 i 2002). Dels estudis amb mamífers es desprèn que els canals de calci tipus L (Sugiura i Ko, 1997; Santafe i cols., 2001 i 2002) i N (Rosato Siri i Uchitel, 1999; Santafe i cols., 2001 i 2002) estan involucrats en la neurotransmissió del nounat, juntament amb els canals P/Q. Es va observar que utilitzant ω -Agatoxina-IVA, blocadora específica del canal P/Q, es produïa un bloqueig de la neurotransmissió del 80 % tant en l'adult com en el neonat, el que implica l'existència dels canals P/Q en el desenvolupament. La utilització de ω -Conotoxina-GVIA, blocadora específica del canal N, inhibeix l'alliberació del neurotransmissió únicament durant les primeres etapes del desenvolupament de la unió neuromuscular (Rosato Siri i Uchitel, 1999). Per altra banda, també s'ha involucrat el canal L en les sinapsis de nadó donat que, quan s'utilitza el blocador específic per aquest canal nitrendipina, s'observen certs canvis en la neurotransmissió del nounat (Rosato Siri i Uchitel, 1999; Santafe i cols., 2001).

Per tant, podem dir que en les sinapsis de nadó la neurotransmissió es deu al calci que entra pels canals P/Q, N i L mentre que en l'adult només participa el canal P/Q.

1.3.- Malalties de la unió neuromuscular

Hi ha una sèrie de malalties que afecten a la unió neuromuscular. Entre aquestes les més freqüents són les que tenen una etiopatogènia autoimmune. En les últimes dècades, han sorgit nombroses evidències indicant que el propi sistema immunitari pot dirigir el seu atac contra teixits nerviosos, amb conseqüències clíniques devastadores. En l'etiopatogènia de determinades malalties neurològiques s'han involucrat reaccions

immunitàries mediades per immunoglobulines o per limfòcits T; les dianes d'aquest atac autoimmune són antígens de les cèl·lules glials i/o de les cèl·lules neurals.

La principal malaltia de la unió neuromuscular, la miastènia *gravis* (MG), presenta una etiopatogènia autoimmune. La simptomatologia d'aquesta malaltia és purament motora. El pacients presenten fatigabilitat muscular, consistent en una debilitat que augmenta a mesura que el múscul realitza contraccions repetides. Tot i poder afectar a pràcticament qualsevol múscul estriat de l'organisme, els músculs oculomotors són els que s'afecten amb més freqüència. La majoria dels pacients presenten ptosi (caiguda de la parpella) i/o diplopia (visió doble). Més del 70 % dels casos de MG s'associen a hiperplàsia tímica, però únicament un 10-15 % tenen timoma. La feblesa muscular en aquesta malaltia es deguda a anticossos contra el receptor nicotínic de l'ACh postsinàptic. En el sèrum de gran part dels pacient (> 85 %) s'han descobert anticossos contra els AChRs. Aquests anticossos provoquen els símptomes d'aquesta malaltia per unió directa als receptors i afectar la funció d'aquests, per pèrdua d'AChR per acceleració de la degradació i per lesió de la membrana postsinàptica de la placa motora per l'activació del complement. Com a conseqüència es redueix la resposta postsinàptica a l'alliberament d'ACh (redueixen l'amplitud tant dels MEPPs com EPPs) (Vincent i cols., 1995). Per aquests pacients es troba una resposta decreixent dels potencials d'acció muscular compostos (CMAPs) en estudis d'estimulació repetitiva a baixa i alta freqüència. Aquests pacients també mostren respostes creixents, variabilitat anormal i bloqueigs en l'electromiografia de fibra única o *jitter*, el que ens indica anomalies en la transmissió neuromuscular.

Altres malalties que s'han associat amb anomalies en la transmissió i anticossos en el sèrum contra canals iònics són: la síndrome de Lambert-Eaton amb anticossos contra els canals de calci dependents de voltatge i la neuromiotonia adquirida amb anticossos contra els canals de potassi dependents de voltatge.

La síndrome miastènica Lambert-Eaton (LEMS; *Lambert Eaton Myasthenic Syndrome*) també és una malaltia en la que el pacient pateix debilitat muscular. En molts casos aquesta malaltia es troba associada a un carcinoma de cèl·lules petites de pulmó (*oat-cells*; O'Neill i cols., 1988), representant una síndrome paraneoplàsica. En la LEMS, els anticossos indueixen bloqueig de l'activitat i pèrdua dels VDCC en el terminal nerviós presinàptic conduint a una marcada reducció del contingut quàntic dels potencial de placa evocats o EPPs (Roberts i cols., 1985). Es va veure que els potencials espontanis o MEPPs eren normals, indicant que les vesícules sinàptiques contenen un nombre normal d'ACh i que el funcionament i el nombre d'AChR són normals (Molenaar i cols., 1982). Els estudis electrofisiològics d'aquests pacients mostren disminució de l'amplitud dels CMAPs que augmenten amb activitat continua o voluntària.

En la neuromiotonia (NMT) adquirida els símptomes més característics són les contraccions musculars espontànies. Els pacients pateixen fasciculacions, rampes, rigidesa i debilitat muscular. Al contrari que la MG i la LEMS, aquesta malaltia es deguda a un increment en l'activitat de la unió neuromuscular. Es va veure que els efectes que provocaven injeccions d'anticossos d'aquests malalts a ratolins eren similars als trobats quan se'ls injectava petites dosis de bloquejadors de canal de K^+ (ex. 3,4-diaminopiridina). Per tant, es va deduir que els anticossos causaven la NMT per unió i inhibició dels canals de potassi dependents de voltatge (VDKC) presinàptics, inhibien la repolarització del potencial d'acció, augmentaven l'alliberament del neurotransmissor i incrementaven l'activació del múscul (Sinha i cols., 1991).

En els últims anys s'ha vist que determinades neuropaties perifèriques d'origen autoimmune relacionades amb els gangliòsids, estan associades amb la fallida o mal funcionament de la unió neuromuscular (Buchwald i cols., 1998; Plomp i cols., 1999; O'Hanlon i cols., 2001; Ortiz i cols., 2001; Spaans i cols., 2003). Aquestes malalties seran tractades amb major extensió en l'apartat 1.5 de la Introducció.

A part de l'atac immunològic, la unió neuromuscular també pateix l'atac de diferents neurotoxines que estan involucrades en diferents malalties. La toxina del *Clostridium botulinium* provoca el botulisme. Aquesta toxina actua sobre diferents proteïnes que ajuden a l'alliberament de l'ACh i provoca una paràlisi deguda a la impossibilitat de transmetre l'impuls nerviós (veure per revisió Kessler i Benecke, 1997). La toxina tetànica (*Clostridium tetani*) i la toxina colèrica (*Vibrio cholerae*) s'uneixen als gangliòsids que estan situats en la unió neuromuscular (Fishman, 1982; Eidels i cols., 1983) per provocar els efectes musculars o diarreïcs característics de la malaltia que provoquen.

El mecanisme etiopatogènic d'aquestes i altres malalties ens han permès entendre millor la fisiologia sinàptica. En aquest context, sense ser malalties però amb una important vessant científica, moltes toxines naturals s'han utilitzat en l'estudi de la neurotransmissió com per exemple la α -bungarotoxina (extreta del verí de la serp *Bungarus multicinctus*) que té com a diana els receptors d'ACh postsinàptics, on a l'unir-se a aquests provoca un canvi de conformació en el receptor que no permet l'obertura del canal iònic quan s'uneix el neurotransmissor. La d-tubocurarina (extreta de la soca d'un arbre amazònic) també afecta als AChRs i impedeix la propagació de la neurotransmissió. Altres toxines relacionades amb bloqueigs neuromusculars són les que afecten als canals de calci, com són la ω -Agatoxina-IVA (extreta del verí d'una

aranya) i la ω -Conotoxina-GIVA (que s'extreu d'un caragol marí) (veure per revisió Uchitel, 1997).

El descobriment de moltes d'aquestes toxines ens ha ajudat a la comprensió de l'estructura i la fisiologia de la unió neuromuscular perquè s'han utilitzat com a marcadors específics per les seves dianes.

1.4.- Glicolípidis àcids de membrana. Els gangliòsids

1.4.1.- Estructura dels gangliòsids

Els gangliòsids són un tipus de glicolípidis àcids complexos. Són els constituents minoritaris de la membrana plasmàtica de gairebé totes les cèl·lules animals i es troben amb especial abundància en el teixit nerviós (aquests lípids són un 6 % del pes de lípids del cervell). Estan formats per una cua hidrofòbica que s'insereix en la bicapa lipídica i una part polar d'oligosacàrids orientada al medi extracel·lular. La part extracel·lular pot ser capaç d'actuar com a antígen i patir atacs del sistema immunitari.

La part hidrofòbica està constituïda per un aminoalcohol de cadena llarga, una esfingosina, unit a un àcid gras mitjançant un enllaç amida en el C2 (Figura 2). Aquest dos elements formen el que s'anomena ceràmida i és aquesta la que es troba immersa en la bicapa lipídica. La longitud de la cadena carbonada dels àcids grassos varia de C14 a C24, pot estar saturada o insaturada, i la de la molècula d'esfingosina de C18 a C20.

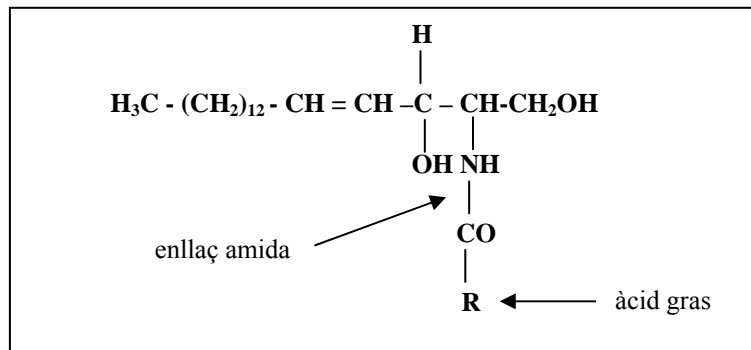


Figura 2. Estructura de la ceramida.

La cadena d'oligosacàrids s'uneix, mitjançant un enllaç β -glucosídic, al grup hidroxil terminal de la ceramida, el C1 de l'esfingosina. Els residus d'oligosacàrids s'uneixen uns amb els altres per enllaços glucosídics tipus α o β .

Els components majoritaris de la cadena glucídica són la glucosa (Glc), la galactosa (Gal), la N-acetilgalactosamina (GalNAc) i rarament la N-acetilglucosamina (GlcNAc) i la fucosa (Fuc). Dintre dels glicoesfingolípids els gangliòsids es caracteritzen per la presència d'una o més molècules d'àcid siàlic (NeuAc), nom genèric amb el que es coneix a una família de residus glicosídics carboxilats de 9 àtoms de carboni. La forma més comú en les membranes animals és l'àcid N-glucosilneuramínic, mentre que en els homes és l'àcid N-acetilneuramínic perquè no tenim l'enzim responsable per la síntesi de l'àcid N-glucosilneuramínic. Aquest àcid siàlic és qui confereix als gangliòsids la propietat d'estar carregats negativament a pH 7, una propietat molt característica d'aquest grup de molècules i que s'utilitza pel seu aïllament de la resta dels lípids de membrana.

1.4.2.- Nomenclatura dels gangliòsids

El nom de gangliòsid va ser aplicat en primer lloc pel científic alemany Ernst Klenk al 1942, per donar nom als nous lípids aïllats de les cèl·lules ganglionars de cervell. A l'any 1977 la Comissió Internacional de Nomenclatura Bioquímica (IUPAC-IUB, 1977), va començar a donar noms sistemàtics als nous glicolípidis que anaven apareixen. Els diferents gliceosfingolípidis, entre ells els gangliòsids, es van classificar depenent dels residus d'oligosacàrids, seqüència i posició amb que s'uneixen a la molècula de ceramida. Depenent del tipus i nombre de residus obtenim el que s'anomenen les sèries. La majoria dels gliceosfingolípidis dels teixits dels vertebrats deriven de la sèrie *gluco*, Glc β Cer. Per addició de la β -galactosa formen la sèrie *Lac*, Gal β 4Glc β 1Cer. Tots els gangliòsids deriven de la sèrie *ganglio*, GalNAc β 4'Lac, on després s'uneix una o més molècules d'àcid siàlic (per una revisió del tema consultar Wiegandt, 1995).

La nomenclatura tradicional és molt complicada. Per intentar solucionar aquest problema la nomenclatura que s'utilitza és la que va descriure L. Svennerholm al 1994, on els gangliòsids es classifiquen i s'identifiquen segons la seva estructura d'oligosacàrids; segons els diferents elements glicosídics i el nombre d'àcids siàlics que tenen.

Svennerholm va establir unes regles de fàcil ús utilitzant lletres i números. Així, la lletra G és per designar gangliòsid, M, D, T i Q per referir-se al número de residus de NeuAc (mono, di, tri i tetra respectivament) i el número que apareix posteriorment és 5-n, on n és el número de sucres neutres. Un exemple seria el gangliòsid GM1 on M designa la presència d'un siàlic i 1 la presència de quatre sucres neutres en la molècula.

Els subíndexs que apareixen en el nom d'alguns gangliòsids s'utilitzen per distingir dos estructures semblants que únicament es diferencien en la posició dels seus residus de NeuAc. El subíndex assignat depèn si la galactosa de la seqüència LacCer està mono, bi o tri substituïda per un àcid siàlic. El GD1a, té 2 residus NeuAc i 4 sucres neutres en la seva estructura (per tant, GD1) i el subíndex a se li assigna perquè la galactosa interna està monosubstituïda per un àcid siàlic, per diferenciar-ho de GD1b que en té dos NeuAc en la galactosa interna.

Taula 1. Representació dels gangliòsids que apareixen en aquest treball segons Svennerholm (1994).

Designació	Seqüència Carbohidratada
GM1	Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} 3 \\ \\ \text{NeuAc}\alpha 2 \end{array}$ </div>
GD1a	Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{cc} 3 & 3 \\ & \\ \text{NeuAc}\alpha 2 & \text{NeuAc}\alpha 2 \end{array}$ </div>
GM1b*	Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} 3 \\ \\ \text{NeuAc}\alpha 2 \end{array}$ </div>
GM2	GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} 3 \\ \\ \text{NeuAc}\alpha 2 \end{array}$ </div>
GD1a-GalNAc	GalNAcβ1-4Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{cc} 3 & 3 \\ & \\ \text{NeuAc}\alpha 2 & \text{NeuAc}\alpha 2 \end{array}$ </div>
GM1b-GalNAc	GalNAcβ1-4Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} 3 \\ \\ \text{NeuAc}\alpha 2 \end{array}$ </div>

* GM1b és el nom tradicional, no segueix la nomenclatura de Svennerholm (1994).

1.4.3.- Síntesi i localització dels gangliòsids

La N-acilesfingosina o ceramida es forma per la reacció d'un acil-CoA de cadena llarga (àcid insaturat (18:0), majoritàriament) amb l'esfingosina (esfingoid de C20), formant un enllaç amida. Un cop formada la ceramida, els glicolípid (GSLs), els cerebròsids i els gangliòsids, es formen per addició seqüencial de sucres a la ceramida.

Els gangliòsids, concretament, es formen a partir dels cerebròsids per addició de varis residus de galactosa, galactosamina i àcid acetilneuramínic, que són donats per nucleòsids difosfat (UDP-Gal, UDP-GalNAc i UDP-NeuAc). Els sucres s'addicionen per l'acció de glicosiltransferases específiques. La incorporació d'àcids siàlics es dona mitjançant sialiltransferases (Figura 3).

Les glicosiltransferases que participen en la biosíntesi de lípids, i per tant dels gangliòsids, es troben en les membranes de l'aparell de Golgi on té lloc la glicosilació dels glicolípid.

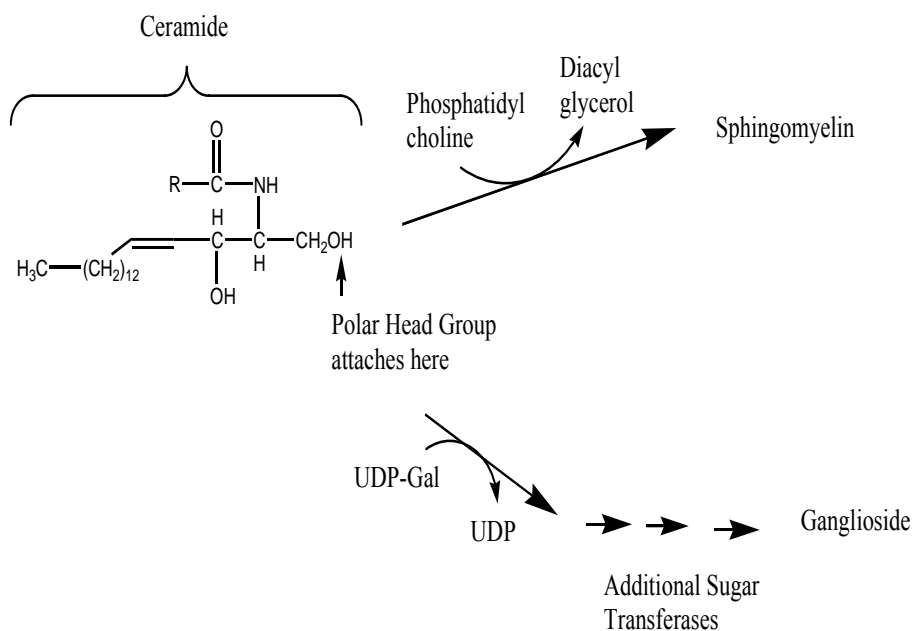


Figura 3. Esquema de la síntesi dels gangliòsids.

Finalment, les gangliòsids són transportats a la membrana plasmàtica per un sistema de transport que involucra la formació de vesícules.

En la membrana, els gangliòsids es localitzen en microdominis lipídics rics en esfingolípid i colesterol, anomenats funcionalment *rafts*, on interactuen amb proteïnes de membrana i modulen diferents funcions. Se sap que poden ser induïts canvis composicionals per estimulació nerviosa, factors mediambientals o tractaments farmacològics.

A nivell de gangliòsids, hi ha diferències entre espècies i teixits. Una de les majors diferències entre el sistema nerviós central (o CNS) i el sistema nerviós perifèric (o PNS) és l'abundància de la sèrie neolacto en el PNS, localitzada majoritàriament en la mielina. Un dels seus components principals és el gangliòsid LM1 (similar al GM1 però que utilitza una GlcNAc en lloc de GalNAc). Els gangliòsids principals en el cervell humà són el GM1, el GD1a, el GD1b i el GT1b i a nivell de sistema nerviós perifèric són el LM1, GM1, GM3, GM2 i el Hex-LM1 (gangliòsid derivat del LM1). El GM3 també es troba majoritàriament en els teixits extraneurals.

1.4.4.- Funció dels gangliòsids

S'ha vist que les diferències entre varis glicoesfingolípid en la conducta fisico-química i moltes de les propietats biològiques depèn molt de les característiques de la seva part d'oligosacàrids, més que de l'heterogènia de la seva ceramida. El paper principal de la ceramida és ser constituent de membrana, però a part també se li han atribuït funcions biològiques més específiques com a mediador de senyals transmembrana i en l'apoptosi (Buccoliero i cols., 2002).

Encara que són constituents menors de les membranes, els glicoesfingolípid (inclosos els gangliòsids) tenen molta importància en un cert nombre de funcions específiques. Aquests lípids complexos se'ls suposen funcions com a receptors de toxines bacterianes i virus, moduladors de senyals transmembrana (relacionats amb la proteïna quinasa C (PKC) i receptors per factors de creixement associats a proteïnes quinases) i com a mediadors d'interaccions cel·lulars (Hakomori, 1990).

Els gangliòsids s'uneixen específicament a una varietat de toxines bacterianes, entre elles la toxina botulínica, la toxina tetànica i la toxina colèrica (el cas més clar és el del GM1 que actua com a receptor per la toxina colèrica) (Angstrom i cols., 1994; Carlson i cols., 1994; Bullens i cols., 2002), en els últims anys han sorgit nous treballs on s'estudia la seva interacció amb diferents virus, entre ells el virus de la grip (Gilbert i Benjamin, 2004). Com a moduladors de senyal transmembrana estan involucrats en el control del creixement i la diferenciació cel·lular, i com a mediadors cel·lulars interactuen amb molècules de reconeixement i d'adhesió cel·lular. Es troben en els centres de reconeixement cèl·lula-cèl·lula, que són fonamentals per al desenvolupament i l'estructura dels teixits, on interaccionen amb factors de creixement, canals iònics, i molècules de reconeixement i d'adhesió cel·lular (Willison, 1994; Hakomori, 2000). Aquests lípids complexos també tenen una funció en el sistema de defensa immunitari. Estan implicats en la immunitat dels teixits i en estats patològics com el càncer (Nojiri i cols., 2000) o en diferents neuropaties perifèriques (veure apartat posterior).

Els gangliòsids es localitzen en la membrana plasmàtica de les cèl·lules animals, especialment en el sistema nerviós on hi ha evidències que es localitzen en les sinapsis. En el sistema nerviós perifèric, diferents estudis immunohistoquímics han demostrat que els gangliòsids es concentren en el soma neuronal, les regions paranodals o nòduls

de Ranvier i en la placa neuromuscular (Santoro i cols., 1992; Goodyear i cols., 1999; Plomp i cols., 1999; Sheikh i cols., 1999a; Willison i O'Hanlon, 1999; Bullens i cols., 2000; O'Hanlon i cols., 2001; Santafe i cols., 2005).

Degut a la seva abundància en el sistema nerviós, s'ha descrit que els gangliòsids intervenen en el desenvolupament i diferenciació del sistema nerviós (Nagai, 1995; Ledeen i cols., 1998; Buccoliero i cols., 2002). Com a conseqüència de la seva elevada concentració en les terminacions nervioses s'ha apuntat la possibilitat de que actuïn en la transmissió dels impulsos nerviosos, on estarien implicats en la regulació del flux de calci i per tant; relacionats amb l'alliberament del neurotransmissor (Nagai, 1995; Ledeen i Wu, 2002). En estudis del sistema nerviós central s'ha demostrat que la neurotransmissió es troba modulada pels gangliòsids GM1, GQ1b i GM2 (Carlson i cols., 1994; Ando i cols., 1998; Wu i cols., 2001). En els últims anys s'ha trobat una forta relació entre els gangliòsids i l'activació dels canals de calci dependents de voltatge (Tanaka i cols., 1997), s'ha vist que el gangliòsid GM1 interacciona amb el VDCC tipus L en cèl·lules de neuroblastoma N18 (Carlson i cols., 1994; Quattrini i cols., 2001), els gangliòsids GQ1b i GM1 modulen el VDCC tipus N en sinaptosomes de cervell ratolí (Ando i cols., 1998) i el GM2 interacciona amb el VDCC tipus P/Q en preparacions *in vitro* de diafragma de ratolí (Ortiz i cols., 2001). Contràriament a aquests estudis s'ha descrit que utilitzant ratolins *knockout* deficients en gangliòsids complexos per anomalies en el gen codificador de l'enzim GM2/GD2 sintetasa, aquests gangliòsids no són necessaris per donar la neurotransmissió (Bullens i cols., 2002). Encara que, altres estudis amb aquests mateixos ratolins han trobat algun signe de degeneració axonal i desmielinització tant a nivell de sistema nerviós central com de sistema nerviós perifèric (Sheikh i cols., 1999b).

L'amplia diversitat molecular que presenten converteix a aquests glicolípid complexos en marcadors específics cel·lulars amb un possible paper en el desenvolupament i l'adherència cel·lular, la transducció de senyals i la funció sinàptica. A nivell cel·lular, estan implicats en la supervivència cel·lular, la diferenciació, la sinaptogènesi i la transmissió sinàptica (Willison, 1994).

1.5.- Implicació de la resposta immunològica contra gangliòsids en malalties neuromusculars

Algunes neuropaties perifèriques, tant agudes com cròniques, s'han associat a la presència en el sèrum dels pacients de títols elevats d'immunoglobulines contra determinats gangliòsids. Aquestes molècules es converteixen en possibles blancs per atacs autoimmunes pel fet de posseir la seva part glucídica en la part externa de la membrana cel·lular (Ilyas i cols., 1985 i 1988b). En general, els anticossos anti-gangliòsids es dirigeixen contra un nombre reduït d'epítops d'aquestes molècules, i presenten abundant reacció creuada entre els diferents glicolípid, glicoproteïnes endògenes i les lipopolisacàrids de bacteris. Aquest fet condueix a establir la hipòtesi del mimetisme molecular com a possible origen d'aquestes neuropaties (Yuki i cols., 1994; Feasby i Hughes, 1998; Bullens i cols., 2002). Un cas clar d'aquest mimetisme molecular es veu en la síndrome de Guillain-Barré, on s'ha observat una forta associació amb infeccions de *Campylobacter jejuni* i virus com Epstein-Barr i cytomegalovirus (Yuki i cols., 1990; Jacobs i cols., 1998; Goodyear i cols., 1999). També s'han descrit casos d'aquesta neuropatia desenvolupats després del tractament amb gangliòsids per via parenteral, en els quals els pacients presenten anticossos contra certs gangliòsids (Illa i cols., 1995).

Existeixen evidències que els anticossos anti-gangliòsids estan associats a algunes neuropaties perifèriques agudes, les més comuns són la síndrome de Guillain-Barré (GBS; *Guillain-Barré Syndrome*) (Ilyas i cols., 1988b; Yuki i cols., 1990; Ilyas i cols., 1992; Willison i cols., 1997) i la síndrome de Miller-Fisher (MFS; *Miller-Fisher Syndrome*) (Chiba i cols., 1992). Títols alts d'anticossos anti-gangliòsid també s'han associat a neuropaties perifèriques cròniques com la polineuropatia crònica desmielinitzant (CIDP; *Chronic Inflammatory Demyelinating Polineuropathy*) (Daune i cols., 1992; Ilyas i cols., 1992; Melendez-Vasquez i cols., 1997; Baumann i cols., 1998) i la neuropatia motora multifocal (MMN; *Multifocal Motor Neurpothy*) (Pestronk i cols., 1988). Malgrat que els diferents estudis suggereixen que els anticossos anti-gangliòsids juguen un paper etiopatològic en aquestes neuropaties, encara hi ha alguns dubtes sobre el mecanisme d'acció d'aquests.

S'han trobat anticossos contra un gran nombre de gangliòsids i, l'especificitat i la classe de l'anticòs s'ha correlacionat amb determinats quadres clínics i/o troballes electrofisiològiques. La relació més constant es dona entre anticossos anti-GQ1b i la MFS (90 % dels casos) i amb la presència d'oftalmoplegia en la GBS (Chiba i cols., 1992; Jacobs i cols., 2002).

Diferents estudis han demostrat que anticossos contra GD1b provoquen neuropaties sensitives i anticossos contra GD1a neuropaties motores. S'ha vist una forta associació entre els anticossos anti-GM1, anti-GM1b, anti-GD1a i anti-GD1a-GalNAc de classe IgG i la neuropatia motora axonal aguda o AMAN (*Acute Motor Axonal Neuropathy*; la variant axonal de la GBS); encara que, els anticossos anti-GD1a són els més específics per aquesta malaltia (Ho i cols., 1999; Goodfellow i cols., 2005). En experiments d'immunització amb gangliòsid s'ha trobat que depenent del gangliòsid que s'injecta,

els animals desenvolupen una malaltia o un altre. Així doncs, Kusunoki i col·laboradors (1996) van immunitzar conills amb el gangliòsid GD1b i aquests van desenvolupar una neurotopia sensorial i, Yuki i col·laboradors (2001) van utilitzar una mescla de gangliòsids de cervell boví i els seus animals van mostrar signes de neuropatia motora associada a anticossos anti-GM1. Signes de neuropatia motora també es van trobar en humans després de ser injectats amb una mescla de gangliòsids de cervell boví (Illa i cols., 1995). Alguns estudis han relacionat els anticossos contra GT1a a formes de GBS amb disfàgia (dificultat de deglutir) (Koga i cols., 1999). Formes desmielinitzants del GBS tenen a veure amb anticossos que es troben en la mielina com és el cas del LM1 (Yuki i cols., 1996a), però encara es necessiten més estudis per assegurar que els anticossos anti-LM1 són un marcador per l'AIDP (*Acute Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy*; la variant desmielinitzant de la GBS).

Pel que fa a les malalties cròniques s'ha vist que la CIDP i les polineuropaties associades a gammapaties tenen una base autoimmune (Ilyas i cols., 1992; Ortiz i cols., 2001). Moltes d'aquestes polineuropaties estan associades a paraproteïnes IgM que reaccionen amb glicolípidis neurals. Les primeres gammapaties IgM cròniques es van associar a la proteïna associada a la mielina (MAG: *Myelin-Associated Glycoprotein*) (Latov, 1990), amb posterioritat han sorgit diferents estudis que les han relacionat amb anticossos disialo-gangliòsids (GD1b, GD3, CT1b i GQ1b) (Daune i cols., 1992; Willison i cols., 2001). L'associació entre els anticossos contra GM1 de classe IgM amb les neuropaties cròniques va sorgir quan Pestronk i col·laboradors (1988) van descriure l'associació entre anti-GM1 i MMN amb bloqueig de la conducció. En els últims anys, els anticossos IgM anti-GM2 també s'han relacionat amb síndromes motors crònics (O'Hanlon i cols., 2000; Ortiz i cols., 2001), encara que igualment s'han associat casos de GBS amb anticossos anti-GM2 després d'una infecció per cytomegalovirus (Jacobs i

cols., 1998). De forma més aïllada certs pacients amb síndromes crònics purament motors originats en el sistema nerviós perifèric també s'han relacionat amb títols alts d'anticossos contra gangliòsids minoritaris. Entre aquests destaquen els gangliòsids GM1b-GalNAc i el GD1a-GalNAc (Ilyas i cols., 1988a i 1992; Ortiz i cols., 2001; Taguchi i cols., 2004a; Santafè i cols., 2005). Per una revisió del tema consultar (Willison i Yuki, 2002).

Bàsicament hi ha tres tipus d'estudis que intenten trobar un paper etiopatogènic als anticossos anti-gangliòsid. Per una part els que estudien la fixació dels anticossos a components del sistema neuromuscular. Per una altra, els models animals de immunització amb gangliòsids. I per últim, els estudis electrofisiològics *in vivo* i *in vitro* per determinar si aquestes immunoglobulines afecten al funcionament de la conducció nerviosa i al de la unió neuromuscular.

Els estudis d'immunització d'animals s'utilitzen per intentar demostrar que els gangliòsids injectats, juntament amb adjuvants de respostes immunes, són capaços d'induir una resposta immunitària dirigida en contra seva, i aquesta reacció immunitària pot lesionar estructures que es troben alterades en la malaltia dels humans, provocant símptomes similars a aquests (Kusunoki i cols., 1996; Yuki i cols., 2001). Amb els estudis de fixació d'anticossos s'identifiquen les estructures on es localitzen els gangliòsids i si aquests fixen complement per poder saber la via d'actuació d'aquests complexes anticòs-complement i per tant, el possible mecanisme patològic (O'Hanlon i cols., 2001 i 2003; Halstead i cols., 2004; Bullens i cols., 2005; Goodfellow i cols., 2005; Halstead i cols., 2005b).

Els estudis electrofisiològics de pacients amb neuropaties mostren anomalies de la conducció nerviosa. En els pacients amb neuropaties axonals, en els que la lesió es

produeix al mateix axó, es detecta una disminució dels potencials musculars compostos (CMAPs). En els pacients amb neuropaties desmielinitzants, amb lesió de la beina de mielina, les alteracions que presenten són disminució de la velocitat de conducció, bloqueigs de conducció o dispersió dels potencials motors. S'han intentat reproduir aquestes alteracions amb estudis electrofisiològics transferint els anticossos dels pacients a nervis d'animals d'experimentació. Amb estudis de transferència passiva del sèrum de pacients amb neuropaties perifèriques i anticossos anti-gangliòsid (anti-GM1 i anti-GQ1), tant amb models *in vitro* com *in vivo*, hi ha autors que han detectat la presència de bloqueigs de la conducció axonal (Santoro i cols., 1992; Arasaki i cols., 1993; Uncini i cols., 1993) en canvi d'altres no han detectat alteracions de la conducció (Harvey i cols., 1995; Hirota i cols., 1997; Paparounas i cols., 1999). També s'ha estudiat l'efecte dels anticossos anti-gangliòsid sobre la unió neuromuscular (Buchwald i cols., 1998; Plomp i cols., 1999; Bullens i cols., 2000; Ortiz i cols., 2001). Concretament s'ha analitzat l'efecte del sèrum de pacients amb GBS (Buchwald i cols., 1998) i MFS (Plomp i cols., 1999) sobre l'alliberament del neurotransmissor. En el primer d'aquests estudis, amb tècniques de *macro-patch-clamp*, Buchwald i col·laboradors (1998) van trobar bloqueigs pre- i postsinàptic mitjançant la fracció IgG del sèrum de pacients amb GBS que mostraven reactivitat contra GM1 i contra GQ1b. En els estudis realitzats per Plomp i col·laboradors (1999) per determinar l'efecte sobre la transmissió neuromuscular del sèrum de pacients amb MFS, van trobar un bloqueig de la neurotransmissió evocada i un augment irreversible dels potencials espontanis en miniatura sense trobar una reducció de l'amplitud d'aquests potencials. Això indueix a pensar en un bloqueig purament presinàptic. Aquests efectes eren irreversibles i requerien la presència de complement, concloent que l'efecte no es produïa directament per l'anticòs sinó per l'activació del complement. Aquesta activació del complement

provocava una destrucció de la porció presinàptica de la unió neuromuscular, com s'ha observat en estudis recents utilitzant anticossos anti-GQ1b (O'Hanlon i cols., 2001 i 2003; Halstead i cols., 2004). Activació del complement que es donaria per la via clàssica (Bullens i cols., 2005).

Encara no estan ben especificats els anticossos que contribueixen al desenvolupament de totes les neuropaties associades a gangliòsid ni el seu mecanisme d'acció. La reducció terapèutica de la concentració d'aquests anticossos o la resposta clínica al tractament immunosupressor, a les immunoglobulines endovenoses i a la plasmafèresi, ha fet hipotetitzar que estan implicats en la patogènia d'aquesta malaltia.

En aquest treball s'estudia el sèrum d'un pacient amb una polineuropatia motora crònica desmielinitzant associada amb una gammapatia monoclonal IgM. El sèrum té el mateix patró de reactivitat que altres articles previs (Ilyas i cols., 1988a). Per determinar el paper etiopatogènic dels anticossos anti-[GalNAc β 1-4Gal(3-2 α NeuAc) β 1-], s'avalua de quina manera aquests anticossos afecten l'alliberament evocat i espontani del neurotransmissor en les unions neuromusculars normals del diafragma de ratolí *in vitro*, la localització d'aquests anticossos en les sinapsis neuromusculars normals de músculs LAL de ratolí i, els canvis morfològics, la conducció nerviosa i la neurotransmissió de músculs LAL de ratolins després de l'aplicació de les mIgM d'aquest pacient o altres solucions fisiològiques.

2.- HIPÒTESI I OBJECTIUS

2.1.-Hipòtesi

Determinades malalties neuromusculars han estat relacionades amb títols alts d'anticossos anti-gangliòsid en el sèrum dels malalts. Els anticossos contra gangliòsids provoquen un bloqueig de la transmissió neuromuscular, que estaria relacionat amb una acció sobre els canals de calci. Aquest bloqueig podria explicar una part del quadre clínic motor que tenen els pacients amb malalties neuromusculars i anticossos anti-gangliòsid.

2.2.-Objectius

2.2.1.- Objectius generals

Determinar l'acció d'uns anticossos IgM anti-gangliòsids sobre la neurotransmissió d'un mamífer adult tant en un estudi agut com crònic i comprovar que estan relacionats amb l'entrada de calci al terminal nerviós.

2.2.2.- Objectius concrets

1.- Determinar l'especificitat del sèrum d'un malalt diagnosticat de neuropatia motora crònica desmielinitzant amb un component monoclonal IgM.

2.- Comprovar la fixació dels anticossos a la unió neuromuscular i determinar les afinitats cel·lulars de les IgM: terminals nerviosos motors, cèl·lula de Schwann i/o component postsinàptic.

3.- Comprovar l'existència de bloqueig neuromuscular amb estudis electrofisiològics *in vitro* i la relació amb els canals de calci dependents de voltatge.

4.- Crear un model animal de neuropatia crònica desmielinitzant a partir de la inoculació de IgM anti-GM2 del pacient de forma repetitiva. Constatar l'evolució i instauració de la neuropatia d'acord amb: modificacions morfològiques, electromiogràfiques i electrofisiològiques de registre intracel·lular.

5.- En el model animal, comprovar canvis en l'expressió dels canals de calci VDCC a la membrana presinàptica de la unió neuromuscular.

3.- MATERIAL I MÈTODES

3.1.- Presentació del pacient

En aquest treball es va utilitzar el sèrum d'un malalt de 43 anys d'edat que va presentar un quadre simètric de dèficit motor i que es va iniciar a les extremitats inferiors. Aquest quatre va mostrar una progressió lenta durant els primers anys afectant també als braços. A més a més, associava una mínima atrofia muscular i els reflexos musculars estaven preservats, en canvi, no presentava símptomes ni signes d'alteració sensitiva ni esfinteriana. L'anàlisi sanguínia va mostrar un component monoclonal de classe IgM. Se li va practicar una biòpsia muscular del bessó intern esquerre que va confirmar una miopatia per dennervació.

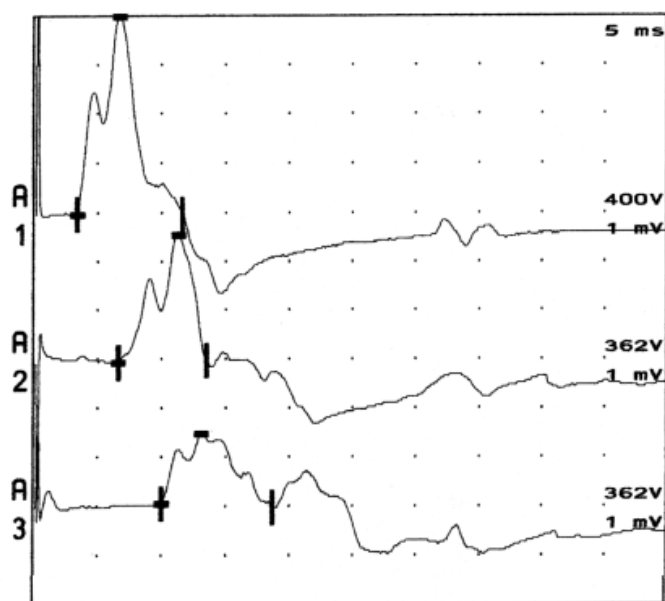


Figura 4. Neurografia motora del nervi cubital del malalt que mostra una dispersió de potencials a estímuls proximals, amplitud del potencial motor baix per estímuls distals (2.9 mV), latència distal normal (3.3 ms) i velocitat de conducció de 49 m/s en l'avantbraç i 61 m/s en el braç.

Els estudis de neurografia motora convencionals mostraren una disminució de l'amplitud del potencial compost amb una marcada dispersió a estímuls proximals (Figura 4). Les neurografies sensitives van mostrar uns resultats dins dels límits de la normalitat. En els estudis electromiogràfics s'observaven mínimes dades compatibles amb una dennervació en els músculs proximals i distals (activitat espontània en forma d'ones positives i fibril·lacions ocasionals). Els potencials d'unitat motora mostraven un mínim augment en la durada i en el grau de polifàsia i els patrons de màxim esforç estaven reduïts.

Amb aquests símptomes, signes i dades complementàries el pacient va ser diagnosticat d'una polineuropatia crònica desmielinitzant purament motora, amb un component monoclonal IgM. Després d'un tractament amb dosis elevades d'immunoglobulines intravenoses va mostrar una lleu millora clínica i electrofisiològica.

Es va determinar la presència d'anticossos anti-gangliòsids en sèrum del pacient, per la tècnica d'ELISA (veure més endavant), i va mostrar uns títols d'anticossos de classe IgM anti-GM2 de 1:150.000, que corresponia al component monoclonal. Aquest títol va persistir, i a més a més va augmentar, en totes les determinacions que es van portat a terme durant 2 anys després de l'inici dels símptomes. El pacient va donar el seu consentiment per realitzar estudis científics amb el seu sèrum.

Totes aquestes dades van ser recollides pel Servei de Neurologia del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

3.2.- Aïllament de glicolípidis àcids

Per fer els estudis de reactivitat i especificitat del sèrum recollit del pacient, es van aïllar els gangliòsids totals de cervell boví, de cervell humà i de cèl·lules YAC-1 (cèl·lules que contenen en la seva membrana majoritàriament el gangliòsid no comercial GM1b-GalNAc (Muthing i cols., 1991). El cervell humà es va obtenir per autòpsia d'un subjecte sense malaltia neurològica, cedit pel banc de teixits neurològics de l'Hospital de Bellvitge (Barcelona).

Després d'obtenir la fracció glicolípidica àcida de les cèl·lules o del teixit per partició de fases utilitzant mescles de cloroform/metanol (Svennerholm i Fredman, 1980), aquesta es va dessalar amb cartutxos C18 de fase reversa Sep-PakTM (Waters) i es va evaporar la fase líquida. L'extracte es va aplicar a una columna empaquetada amb DEAE-Sephadex A25 (Pharmacia) prèviament derivatitzada en forma d'acetat amònic (Gregson, 1993) per separar els glicolípidis neutres dels glicolípidis àcids (on es troben els gangliòsids). Després d'eluir els glicolípidis neutres amb metanol, els glicolípidis àcids es van eluir amb cloroform/metanol/0.8 M acetat de sodi en aigua (30:60:8, v/v/v). Posteriorment, els gangliòsids van ser separats amb un gradient discontinu d'acetat d'amoni en metanol en fraccions enriquides en monosialo-, disialo-, i polysialogangliòsids en la columna DEAE-Sephadex A25 en forma d'acetat amònic.

L'esquema que s'ha seguit per l'aïllament dels gangliòsids es pot veure en la Figura 5.

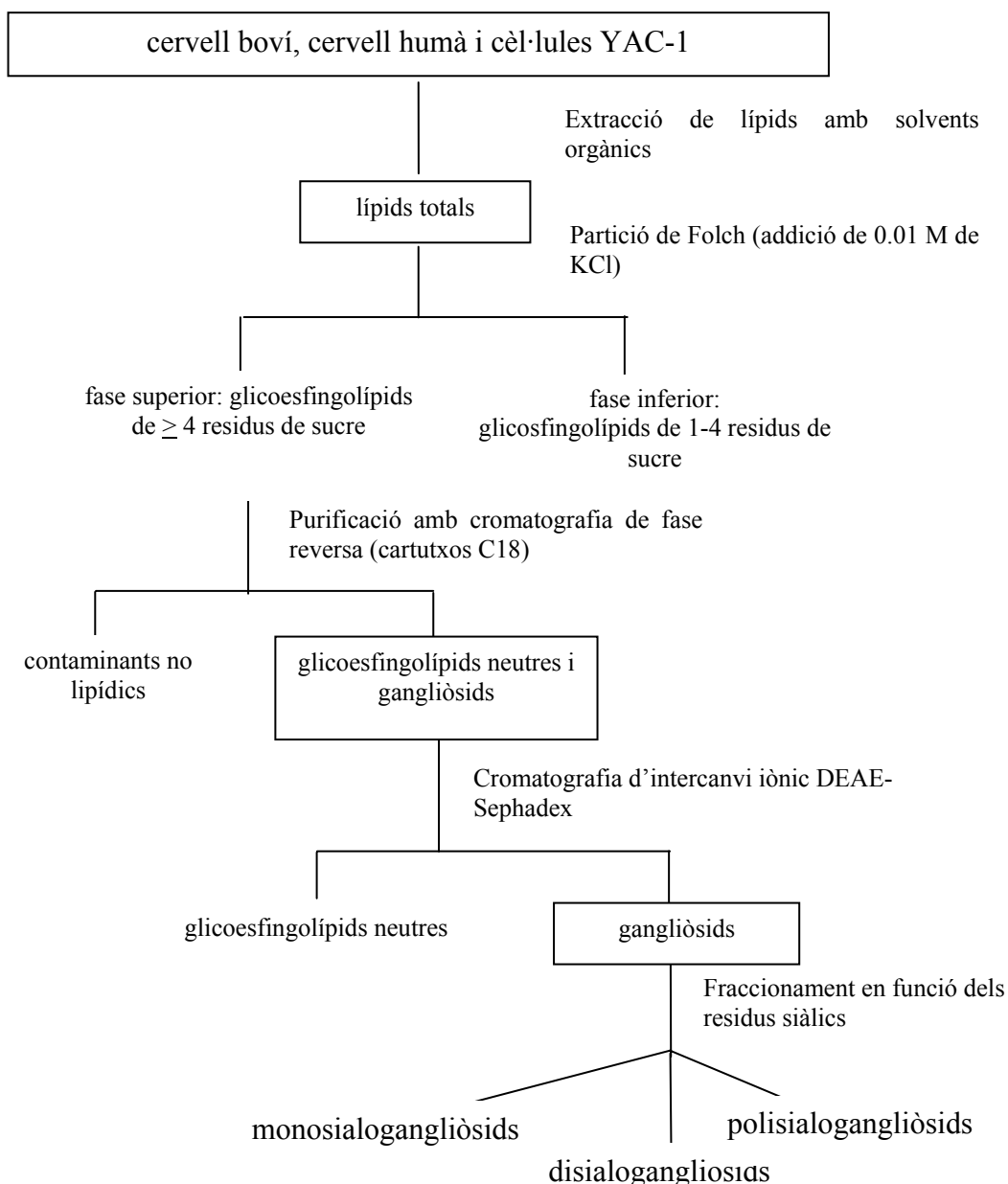


Figura 5. Esquema del protocol d'extracció i purificació dels gangliòsids.

3.3.- Purificació de gangliòsids

Als gangliòsids comercials de cervell boví GM1, GM2, GM3, asialoGM1, GD1a, GD1b, GD3, GT1b, i GQ1b, proporcionats per Sigma, es va comprovar la seva puresa per cromatografia en capa fina d'alta resolució o HPTLC (explicat més endavant).

El gangliòsid no comercial GD1a-GalNAc utilitzat per estudis d'especificitat, es va aïllar en el nostre laboratori a partir de la fracció disialogangliòsid de cervell boví, obtinguda com es descriu en l'apartat anterior, mitjançant HPLC (cromatògraf Hewlett Packard sèrie 1050 (columna Lichrosorb-NH₂; Merk) connectat a un col·lector de fraccions Pharmacia. Posteriorment, per purificar el gangliòsid GD1a-GalNAc es va portar a terme un tractament amb sialidasa (neuroaminidasa de *Clostridium perfringens*, 1585886 5U), enzim que provoca la transformació de GD1a i GD1b en GM1 escindint el residu d'àcid siàlic que queda més allunyat del cos d'oligosacàrids (Yuki i cols., 1996b), i per tant; facilita l'aïllament del GD1a-GalNAc que es resistent a aquest enzim (Figura 6).

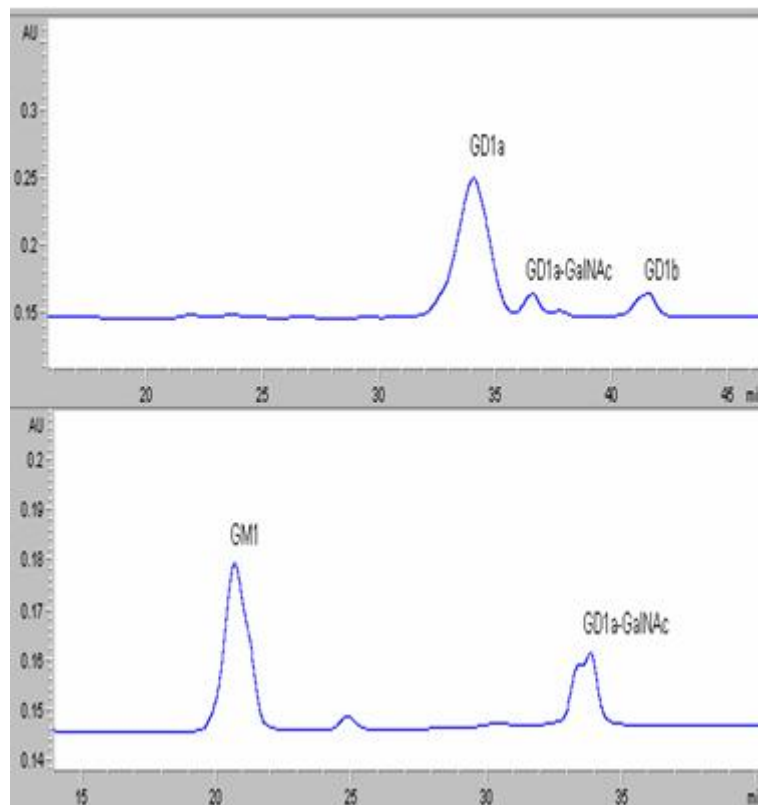


Figura 6. Cromatogrames de la fracció disialo gangliòsid abans i després del tractament amb neuroaminidasa de *Clostridium perfringens*.

El gangliòsid GM1b-GalNAc (utilitzat també per estudis d'especificitat) es va purificar de la fracció monosialogangliòsid de les cèl·lules YAC-1 per HPLC (cromatògraf Hewlett Packard sèrie 1050 (columna Lichrosorb-NH₂; Merk) connectat a un col·lector de fraccions (Pharmacia).

En la Figura 7 es poden veure esquematitzats els processos de purificació seguits.

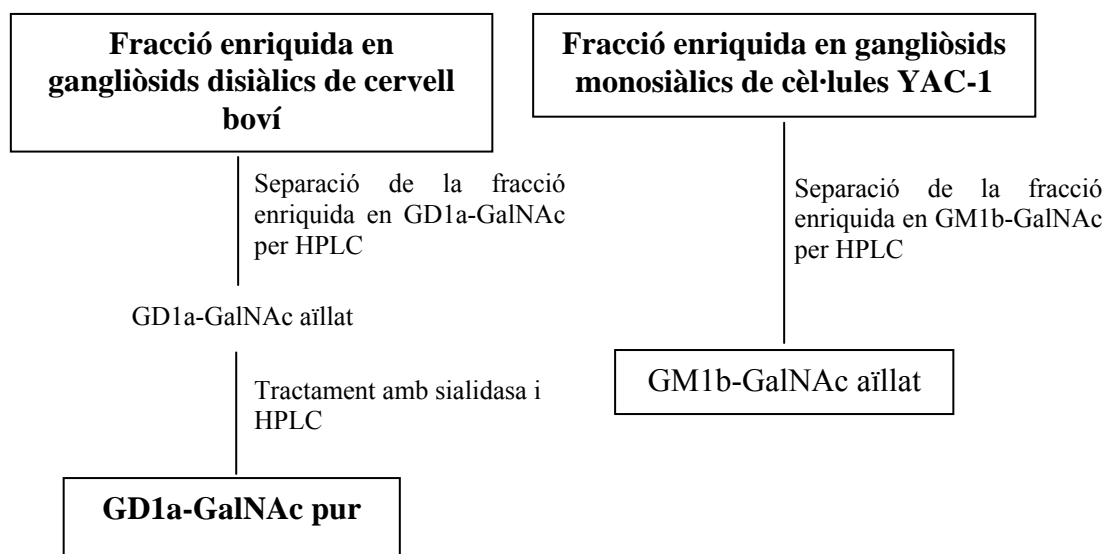


Figura 7. Purificació de gangliòsids. A l'esquerra, l'aïllament del gangliòsid minoritari de cervell boví GD1a-GalNAc i, a la dreta, l'aïllament del gangliòsid no comercial GM1b-GalNAc de les cèl·lules YAC-1.

3.4.- Estudi de detecció d'anticossos en sèrum pel mètode d'ELISA

L'assaig d'ELISA (*Enzyme-Link Immunosorbent Assay*) es va utilitzar per estudiar la reactivitat dels anticossos IgM i IgG, presents en el sèrum del pacient diagnosticat de polineuropatia crònica desmielinitzant i en diferents sèrums de control, contra els gangliòsids GM1, GM2, GM3, asialo-GM1, GD1a, GD1b, GD3, GT1b, GQ1b i GD1a-GalNAc, com havia estat descrit prèviament (Willison i cols., 1999; Ortiz i cols., 2001).

Als pous problema es van afegir 0.2 µg de gangliòsid en metanol i els pous control es van omplir amb 100 % de metanol. Es va deixar que s'evaporés el dissolvent. Després del bloqueig dels llocs inespecífics amb 1 % d'albumina de sèrum boví (BSA) durant tota la nit a 4 °C, es van addicionar les dilucions seriades dels sèrums i es van deixar 2 hores d'incubació a temperatura ambient. Després dels rentats amb tampó fosfat (PBS), es va incubar cada pou amb l'anticòs secundari de conill anti-IgM o IgG humà conjugat amb peroxidasa (Dako) durant 2 h més. Les plaques es van revelar utilitzant ABTS (cristalls de diamoni 2,2'-Azino-di-[sulfonat de 3-etilbenziazoline]; Boehringer Mannheim).

La lectura de la densitat òptica (DO) es va fer amb un espectòmetre adaptat a plaques d'ELISA a 405 nm, als 5 minuts d'afegir el substrat revelador. El títol (1:x) dels anticossos correspon a la dilució més alta de sèrum en que la diferència de DO respecte la columna de blanc és superior a 0.1. Aquest valor és la mitja ± 3 DS (desviacions estàndards) entre pous blancs i pous problema en els controls. Un títol es considera positiu quan és superior o igual a 1:640. Els títols es van comparar amb un pannel de mostres de sèrums control de persones sanes i amb diferents malalties.

En estudis posteriors, la tècnica d'ELISA es va utilitzar per trobar el títol de les IgM aïllades del pacient enfront del gangliòsid GM2. Com a anticòs secundari es va utilitzar l'anticòs secundari de conill anti-IgM humà conjugat amb peroxidasa.

Les plaques que es van utilitzar van ser de 98 pous subministrades per Iwaki (Japan).

3.5.- Immunofixació en cromatografia de capa fina

Per confirmar la presència i puresa dels gangliòsids i per trobar la reactivitat del sèrum reconeixent la presència d'un antigen determinat, es va dur a terme una immunofixació en cromatografia de capa fina.

Aquesta tècnica consisteix en primer lloc en separar els diferents gangliòsids, 5 µg/línia, en una placa d'alumini recoberta amb gel de sílice (60 WF 16484 DC; Merck) per cromatografia en capa fina d'alta resolució (HPTLC; *High Performance Thin Layer Chromatography*). Els gangliòsids es separen en la placa atenen a la diferent solubilitat que tenen en la fase mòbil que es fa servir, en aquest cas es va utilitzar cloroform/metanol/0.2 % CaCl₂ en aigua (55:45:11, v/v/v).

Un cop els gangliòsids es van separar, les plaques es van submergir en hexà amb 0.2 % de poliisobutimetacrilat per crear una pel·lícula protectora i poder seguir amb el protocol. Després d'incubar amb 1 % d'albumina de sèrum boví (BSA), les plaques es van cobrir durant 4 hores a 4 °C amb la dilució 1:100 del sèrum. Passat aquest temps, les plaques es van rentar amb tampó fosfat (PBS) i es van incubar 2 hores més a 4 °C amb l'anticòs secundari de conill anti-IgM humà conjugat amb peroxidasa (Dako) diluït a 1:3000. Per últim, les plaques es van revelar amb diaminobenzidina (Dako).

En l'esquema que es mostra a continuació (Figura 8) podem veure el procés que té lloc en la tècnica d'immunoHPTLC.

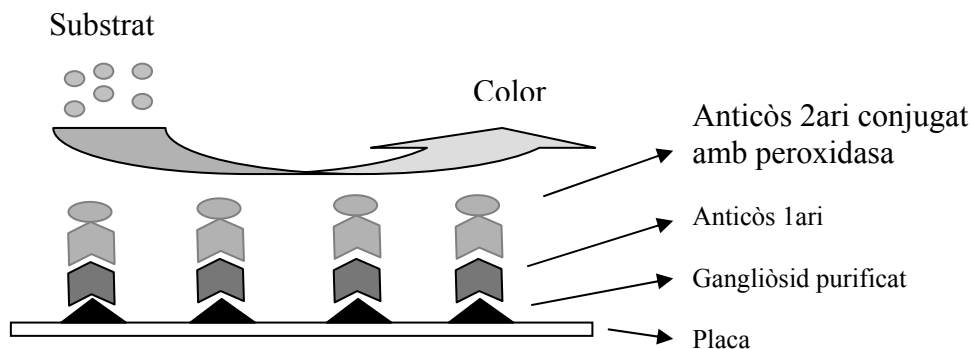


Figura 8. Procés esquematitzat que té lloc en la tècnica d'immunoHPTLC.

Juntament amb les plaques utilitzades per la immunofixació es va fer una HPTLC revelada amb resorcinol (colorant específic per glicolípids) amb els estàndards bovins comercials, per poder identificar les bandes que apareixien en la immunoHPTLC.

3.6.- Purificació dels anticossos de classe IgM i obtenció del sèrum lliure de IgM

Per fer estudis més acurats d'electrofisiologia i per la seva posterior utilització en els estudis crònics, els anticossos del sèrum del pacient de classe IgM es van purificar per cromatografia d'afinitat utilitzant un anticòs IgM de cabra anti-humà (específic per la cadena μ) acoblat a bromur de cianogen com a lloc actiu de la resina d'agarosa (3.9 mg anticòs/ml de resina; Sigma) (Ortiz i cols., 2001).

El sèrum del pacient es va diluir en tampó fosfat de sodi a pH 7.2 i es va addicionar a la columna. L'eluit es va tornar a aplicar a la columna diverses vegades i per últim es va incubar durant 30 minuts a 4 °C. La fracció no retinguda, en aquest pas, es va conservar per estudis posteriors on es necessites del sèrum sense IgM. Després d'un rentat

extensiu de la columna amb tampó fosfat, les IgM es van eluir de la columna amb 0.1 M de glicina amb 0.15 M NaCl, pH 2.3. Les fraccions es van recollir i es van portar a pH neutre amb 1 M de tampó Tris-HCl. Un cop neutralitzades, les immunoglobulines es van dialitzar immediatament amb cassettes de diàlisi Slide-A-Lyzer^R (Pierce) enfront una solució de Ringer (veure més avall) i posteriorment, es van concentrar amb columnes Centricon^R (Centrifugal Filter Devices; Millipore).

L'activitat dels anticossos es va testar per ELISA, com s'ha descrit anteriorment.

3.7.- Procediment experimental amb animals

3.7.1.- Característiques dels animals

Els animals utilitzats per realitzar aquest estudi van ser ratolins adults mascles de l'espècie Swiss de 6 setmanes d'edat i d'un pes entre 20-25 g. Els animals van ser subministrats per la firma comercial Charles River (Barcelona) i mantinguts a l'estabulari, prèviament a l'inici del treball, per aclimata'ls a les condicions d'estabulació estàndard.

Els procediments experimentals amb els animals van ser realitzats seguint la llei 5/1995, del 21 de Juny, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques, aprovada pel Parlament de Catalunya l'any 1995.

La selecció dels animals pels diferents estudis va ser aleatòria i en condicions de vida idèntica entre tots els animals mentre va durar l'estudi. Les condicions de vida en l'estabulari van ser les següents: gàbies MAKROLON^R de 27x27x14 cm³ per cada 4

animals, temperatura ambient de 20-25 °C i humitat relativa del 60-70 %. Els animals estaven sotmesos a cicles de 12 hores de llum artificial, amb neó de llum blanca, i 12 hores de foscor. L'alimentació va ser subministrada *ad libitum* i consistia en pinso de manteniment per rata i ratolí VRF-1 de Charles River i l'aigua clorada.

3.7.2.- Model muscular

3.7.2.1.- Estudis aguts

Per fer els estudis aguts d'afectació de la neurotransmissió per part del sèrum (i el seu component monoclonal) del malalt amb polineuropatia crònica desmielinitzant, es va utilitzar com a model muscular de múscul esquelètic el diafragma i el seu nervi frènic de ratolins mascles Swiss de 20-25 g de pes, per la seva fàcil extracció de l'animal i posterior dissecció. A més, aquest múscul s'utilitza molt en experiments d'electrofisiologia perquè és un múscul prim i pla i té ben definides les regions en les quals les sinapsis neuromusculars estan localitzades.

El múscul i el seu nervi es van dissecar com s'explica en l'apartat d'obtenció de la mostra.

3.7.2.2.- Estudis crònics

Per crear un model animal de desmielinització i polineuropatia crònica, van ser injectades subcutàniament (s.c.) en el múscul Levator Auris Longus (LAL) o Elevador Llarg de l'Orella (ELO) esquerra de ratolins mascles Swiss de 20-25 g de pes, les IgM purificades del sèrum del pacient amb polineuropatia crònica desmielinitzant i altres solucions fisiològiques utilitzades com a controls.

Les solucions fisiològiques o les mIgM (IgM monoclonals) van ser aplicades per injeccions subcutànies sota la superfície externa del múscul LAL, com es va descriure prèviament en altres estudis de la nostra unitat (Santafe i cols., 2000; Lanuza i cols., 2001; 2002 i 2003).

Es va triar aquest múscul per fer els estudis crònics donat que és un múscul ideal per realitzar estudis amb drogues o neurotoxines. És un múscul subcutani que es troba immediatament per sota de la capa de pell dels animals, per tant les drogues o toxines injectades subcutàneament *in vivo* tenen accés a tota la superfície muscular i a les terminacions nervioses provocant efectes sobre les unions neuromusculars (NMJs). A més a més, és molt pla (està constituït per cinc o sis capes de cèl·lules musculars) i també té ben definida la innervació. La seva morfologia permet fer estudis morfològics i electrofisiològics amb el múscul sencer, *in toto*. La funció d'aquest músculs és moure l'orella de l'animal. Està innervat per una branca posterior del nervi facial i va a parar a la part caudal externa del múscul entrant per la part de sota de l'orella. (Angaut-Petit i cols., 1987; Tomas i cols., 2000).

Els animals van seguir un tractament durant 15 dies. El primer dia els animals eren anestesiats amb 2 % de tribromoetanol (TBE, 0.15 ml / 10 g pes animal; Sigma), via intraperitoneal (i.p.), se'ls rasurava la zona de l'orella esquerra i se'ls injectava 50 µl dels diferents controls o les mIgM actives (títol 1/10000) subcutàniament (s.c.) en el múscul LAL esquerra. La injecció es repetia en dies alterns, cada 48 h, durant 15 dies.

En un estudi com el que aquí s'exposa és important tenir controlades totes les variables experimentals que s'introdueixen. En aquest sentit es van realitzar els controls que s'especifiquen en la Taula 2.

CONTROLS	ANIMALS
I	Sense tractar
II	Injeccions s.c. de solució Ringer
III	Injeccions s.c. de solució Ringer + corticoids i.p.
IV	Injeccions s.c. de IgM desactivades per calor + corticoids i.p.

Taula 2: Controls i paradigmes experimentals.

Control I: animals no tractats; Control II: animals que rebien 7 injeccions s.c. de solució de Ringer Normal (50 µl) -una cada 48 hores durant 15 dies-; Control III: animals que seguien el mateix protocol que els Controls II més 4 injeccions intraperitoneals (i.p.) (una un dia abans i durant els tres primers dies del protocol d'injeccions s.c.) de corticoids (6-metilprednisolona, Urbason^R, Hoechst; 5.3 mM; 2 mg/ml; 40 mg/kg) per suprimir la inflamació. Aquests animals eren estudiats al final del protocol d'injeccions s.c. (15 dies); Control IV: animals que rebien el mateix protocol que el Control III, però la injecció s.c. de Ringer incloua IgM desactivades per calor (títol de 1/10000). Les mIgM purificades inactivades per calor s'obtenien per incubació durant 20 minuts a 90 °C.

Els animals tractats amb les IgM actives seguien el mateix protocol que els Controls IV, però canviant les IgM desactivades per IgM actives (títol de 1/10000). Tots els animals van ser estudiats el dia 15. En alguns animals es van dur a terme experiments electrofisiològics utilitzant IgM humanes normals (un Control amb IgM normals en lloc de IgM desnaturalitzades) i no es van trobar diferències significatives en cap dels paràmetres d'alliberament del neurotransmissor quan es comparaven els músculs LAL d'aquests animals amb els d'animals Control IV.

3.7.3.- Obtenció de la mostra

Per l'obtenció de la mostra en els diferents estudis, els animals van ser anestesiats amb 2 % de tribromoetanol (TBE, 0.15 ml / 10 g pes animal; i.p.), i van ser sacrificats per exsanguinació sota els efectes de l'anestèsia.

El múscul i el seu nervi es van extreure de l'animal i es van dissecar, amb l'ajuda d'una lupa estereoscòpica i material per microcirurgia, en una placa de Petri coberta amb Sylgard^R que contenia una solució de Ringer Normal (en mM): NaCl, 137; KCl, 5; CaCl₂, 2; MgSO₄, 1; NaHCO₃, 12; Na₂HPO₄, 1 i glucosa 11, contínuament bombollejada amb 95 % O₂ / 5 % CO₂ perquè el múscul es mantingués amb vida. El múscul i el seu nervi van ser subjectats i estirats amb agulles entomològiques.

Un cop es tenia el múscul i el seu nervi aïllats, si aquests eren utilitzats per registre intracel·lular la preparació era traspasada a una camareta de registre de 1.5 ml (Figura 9), on el múscul també era estirat i subjectat amb agulles entomològiques; en canvi, si el múscul era usat per estudis d'immunohistoquímica, la preparació seguia el protocol que s'explica en els apartats corresponents.

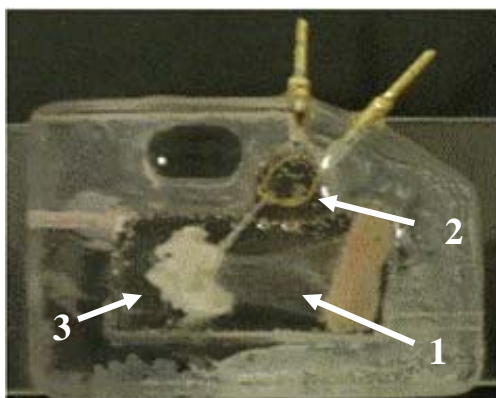


Figura 9. Camareta utilitzada pel registre intracel·lular. Construïda amb material neutre i transparent, normalment metracrilat amb la base coberta de Sylgard (3). La mostra (1) es manté subjecta a la base, estirant-la, mitjançant agulles entomològiques. El nervi es situa sobre dos filaments de platí o or (2) i s'aïlla amb pasta de silicona o vaselina. La mostra es irriga amb Ringer oxigenat per mig d'un sistema de perfusió. Aquest sistema de perfusió permet a més introduir drogues per al seu estudi. A distància es col·loca una vareta de plata clorada com a elèctrode de referència.

Pels experiments de registre electrofisiològic es reproduïx *in vitro* la fisiologia neuromuscular, per aquest motiu l'extracció del múscul ha de ser incruenta i s'ha de mantenir "viu". La camareta de registre permet mantenir el múscul viu mitjançant un sistema de perfusió contínua que pot servir també per crear diferents situacions experimentals a curt termini (per exemple, modificant l'ambient iònic extracel·lular, perfundir drogues, o rentar la mostra d'una droga prèviament perfundida) (veure Figura 9).

3.8.- Electrofisiologia

Es van realitzar experiments d'electrofisiologia intracel·lular convencional per estudiar si els gangliòsids, utilitzant el sèrum o el component monoclonal anti-gangliòsid d'un pacient amb polineuropatia crònica desmielinitzant i músculs de ratolí tractats amb les mIgM d'aquest pacient, estan relacionats amb la neurotransmissió i/o la conducció nerviosa.

3.8.1.-Equip bàsic d'electrofisiologia

Amb les tècniques d'electrofisiologia es pretén reproduir artificialment la resposta fisiològica d'un sistema, en el nostre cas la sinapsi neuromuscular, en diferents condicions experimentals per al seu estudi. Per aquest motiu es precisa d'un equip que provoqui l'estímul nerviós o potencial d'acció (la unitat estimuladora) i un sistema que registri la resposta neuromuscular que es genera (el sistema de registre). Per tant, el nervi va ser contínuament estimulat per dos elèctrodes de platí acoblats a un generador

de polsos o unitat estimuladora (Cibertec Stimulator CS-20) associada a una unitat d'aïllament d'estímuls.

La unitat estimuladora crea uns polsos de diferència de potencial de pocs volts (0.1-10 volts), el voltatge ve determinat pel llindar mínim d'estimulació necessari per què s'observi activitat elèctrica en una fibra muscular, multiplicat per 3. Aquests polsos es generen a una freqüència determinada (entre 0.5 i 100 Hz) amb una durada de dècimes de segon (0.1-0.2 ms).

L'elèctrode de registre que s'insereix dins del citoplasma de la fibra muscular és un capil·lar ple de KCl que s'estira fins aconseguir una punta afinada de menys de 1 μm de diàmetre i una resistència d'entre 20-40 megaohms ($\text{M}\Omega$).

Els elèctrodes de registre es connecten a un amplificador diferencial (Tecktronics, AM502 o NEURO DATA IR183) donat que les senyals elèctriques que es pretenen enregistrat són de pocs mil·livolts (entre 0.5 i 5 mV). L'amplificador rep la senyal elèctrica tant de l'elèctrode de referència com del de registre; la seva funció és restar aquestes dues senyals i el resultat multiplica'l per múltiples de 10. Aquest amplificador permet a més, filtrar les senyals elèctriques alienes al model neuromuscular.

Com a referència s'utilitza un elèctrode distant de Ag-AgCl connectat a la solució del bany mitjançant un pont d'Agar (3.5 % d'Agar en 137 mM NaCl).

Les senyals enregistrades es digitalitzen (DIGIDATA 1300 Interface, Axon Instruments Inc. CA), es guarden i s'analitzen amb l'ordinador. Permetent, a més, amplificar, filtrar

el senyal i emmagatzemar els registres pel seu anàlisi posterior. La senyal que prové de l'amplificador es reproduïda en una escala temporal i mostra una línia que indica les variacions del potencial entre l'elèctrode de registre i el de referència. El software Axoscope 9.0 (Axon Instruments Inc.) es va utilitzar per l'adquisició de dades i el seu anàlisi.

En la Figura 10 es mostra un esquema de l'equip d'electrofisiologia bàsic.

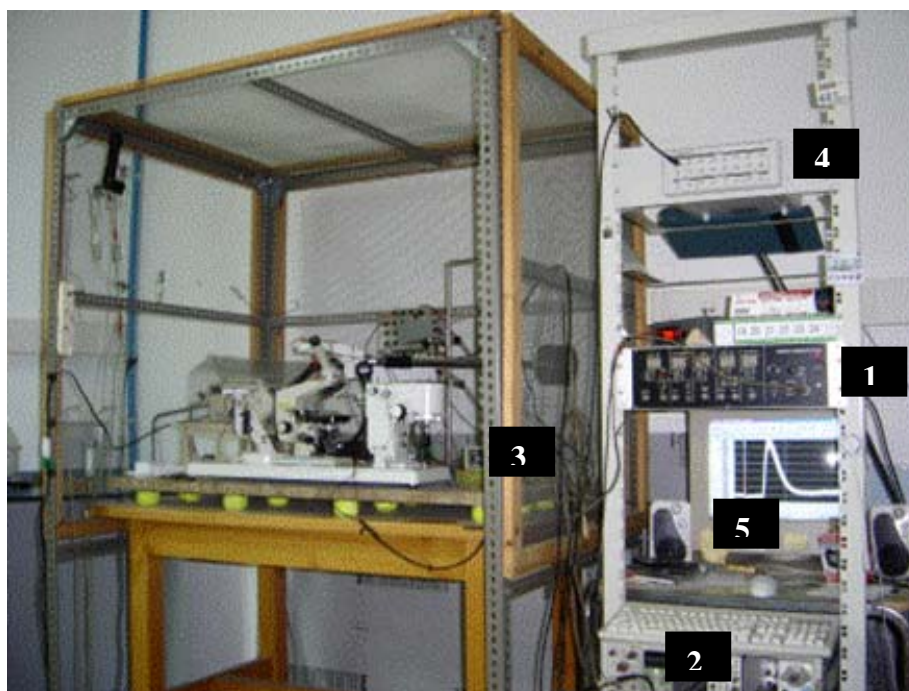


Figura 10. Equip bàsic d'electrofisiologia de registre intracel·lular. Elements bàsics d'un equip d'electrofisiologia. 1) Unitat estimuladora, 2) Amplificador, 3) Unitat aïlladora, 4) Taula digitalitzadora i 5) Sistema informàtic (Axoscope 9.0).

3.8.2.- Registre de l'activitat sinàptica

3.8.2.1.- Registre de l'activitat sinàptica evocada

L'activitat sinàptica evocada és el registre postsinàptic que obtenim després de provocar un potencial d'acció presinàptic amb la unitat estimuladora. Aquest registre si l'observem d'esquerra a dreta consisteix en, una línia de base que presenta un pic de

poca durada corresponent a l'artefacte d'estímul elèctric, un curt lapse de temps (1-2 ms, la latència) i una ona de major durada: el potencial de placa evocat o EPP (*End Plate Potential*). L'EPP correspon al procés de trànsit iònic postsinàptic desencadenat per la unió del neurotransmissor, ACh, amb els seus receptors nicotínics. Per si mateix aquest EPP pot donar informació quantificable, per exemple, de la conducció axonal del potencial d'acció a través de l'estudi de la latència i de l'efectivitat en l'alliberament del neurotransmissor per mitjà de la seva amplitud o amb el càlcul del contingut quàntic.

En els nostres estudis, els potencials de placa evocats (EPPs) es van enregistrar intracel·lularment amb microelèctrodes de registre fets amb capil·lars de vidre borosilicat convencionals (GC150F-10, Harvard Apparatus Ltd., diàmetre 0.86 mm, diàmetre externs 1.5 mm) omplerts amb 3 M KCl i 20-40 M Ω de resistència de punta (estirador de puntes Narishige Scientific Instrument Lab.). Els experiments es van desenvolupar a temperatura ambient entre 21-25 °C i la temperatura del bany va ser també monitoritzada durant els experiments (23.4 °C \pm 1.7) amb un termòmetre digital TMP 812, Leica.

Per evitar ruptures anòmales de la membrana de la fibra muscular provocada per l'elèctrode de registre durant el registre dels EPPs, la contracció del múscul es va prevenir amb d-tubocurarina (dTC; 0.7-1.2 μ M) en els experiments aguts i amb una concentració elevada de magnesi (4.5 mM de MgSO₄) en els experiments crònics. La utilització de MgSO₄ en els estudis crònics va ser degut a que en estudis preliminars es va veure que la d-tubocurarina es fixava d'una manera inestable als AChR.

Després de punxar una fibra muscular, el nervi va ser contínuament estimulat a 0.5 Hz utilitzant 2 elèctrodes de platí acoblats a la unitat estimuladora associada a la unitat d'aïllament d'estímuls. La intensitat de l'estímul va ser tres vegades el llindar mínim d'estimulació. Per captar els potencials evocats es va seguir el següent protocol: els primers 20 EPPs van ser rebutjats i es van enregistrar els 50 EPPs següents (mínim 15 fibres per múscul). Es van excloure els registres en que el potencial de membrana (V_m) era < -50 mV o queien més de 5 mV durant el període de registre.

En els estudis poblacionals, les amplades dels EPPs van ser enregistrades en un mínim de 15 fibres per músculs, abans (control) i després d'una hora d'incubació amb les diferents solucions. En els experiments de fibra única, es va estudiar l'efecte de les drogues o toxines en els EPPs d'una mateixa fibra muscular inserida permanentment.

Els paràmetres que es van avaluar en aquests estudis van ser la mitja del contingut quàntic (M) i, la latència, el temps de pujada i l'amplitud mitja dels EPPs. No va ser necessari la correcció del sumatori no lineal de la neurotransmissió ja que la concentració de d-tubocurarina i de Mg^{2+} es va ajustar per obtenir EPPs de menys de 4 mV (McLachlan i Martin, 1981).

La mitja del contingut quàntic (M) de la resposta evocada es va avaluar pel mètode del coeficient de variació, que es va calcular com:

$$M = (V_{EPP})^2 / ((S_{EPP})^2 - (S_{noise})^2),$$

on V_{EPP} és la mitja de les amplituds dels EPPs, i S_{EPP} i S_{noise} són la desviació estàndard de les amplituds dels EPPs enregistrats i la desviació estàndard del soroll, respectivament (Hubbard i cols., 1969).

L'amplitud mitja per fibra es va calcular i es va corregir assumint un potencial de membrana de -80 mV. La latència de la resposta evocada es va analitzar com el temps transcorregut des de l'inici de l'artefacte d'estímul fins a la base de l'EPP i el temps de pujada, com el temps transcorregut de la base al cim de l'EPP.

3.8.2.2.- Registre de l'activitat sinàptica espontània

De manera espontània apareixen EPPs en miniatura, els potencials de placa espontanis o MEPPs (*Minimal End Plate Potentials*), a una freqüència d'aparició mitjana de 60 episodis per minut. L'estudi de l'activitat espontània no necessita cap bloqueig de la contracció muscular ni l'activació del potencial d'acció axonal per part de la unitat estimuladora.

Es van enregistrar els MEPPs intracel·lularment abans (control) i després d'una hora d'incubació amb les diferents solucions, i es va calcular la freqüència d'aparició dels MEPPs, el temps de pujada i l'amplitud mitja d'aquests. La freqüència amb la que apareixien els MEPPs es va quantificar en períodes de 1 minut. El temps de pujada dels MEPPs es va avaluar com el temps transcorregut entre la base i el cim del pic.

Tant pel que fa als experiments de registre de l'activitat sinàptica evocada com espontània, totes les solucions van ser afegides directament al bany: el sèrum del pacient i les IgM aïllades, les toxines (ω -Conotoxina-GVIA ω -CgTX-GVIA- i ω -Agatoxina-IVA ω -Aga-IVA-) i la nitrendipina.

3.9.- Neurografies motores

Per estudiar l'afectació muscular i nerviosa en el múscul i nervi LAL d'animals tractats amb les mIgM del malalt i en els diferents grups control, se'ls hi va determinar el potencial d'acció muscular compost (*Compound Muscle Action Potencial*, CMAP) i la latència distal amb un aparell convencional d'electromiografia (Medelec Mystro).

A la Figura 11 es representa un esquema del procediment de registre. Es van utilitzar elèctrodes d'agulla per estimular el nervi auricular. Els estímuls supramàxims van ser trobats incrementant progressivament el voltatge de l'estímul, fins comprovar que l'amplitud del CMAP no augmenta malgrat un posterior augment del voltatge. La mitjana del voltatge d'estímul va ser de 9 mV i es van utilitzar estímuls de 0.1 ms. Els filtres de banda alta i baixa (*high-pass* i *low-pass*) utilitzats van ser de 10 kHz i 2 Hz respectivament. Com elèctrode de registre actiu es van usar elèctrodes receptors subcutanis, del tipus d'agulla d'entomologia, localitzats horitzontalment sobre el múscul LAL estimulat. L'elèctrode de referència va ser un elèctrode similar col·locat sobre el múscul LAL contra lateral. Per a cada enregistrament es van realitzar tres assaigs consecutius. Per fer les comparacions entre els diferents animals es van analitzar els CMAP de major amplitud (expressats en mV) i la latència més curta (en ms).

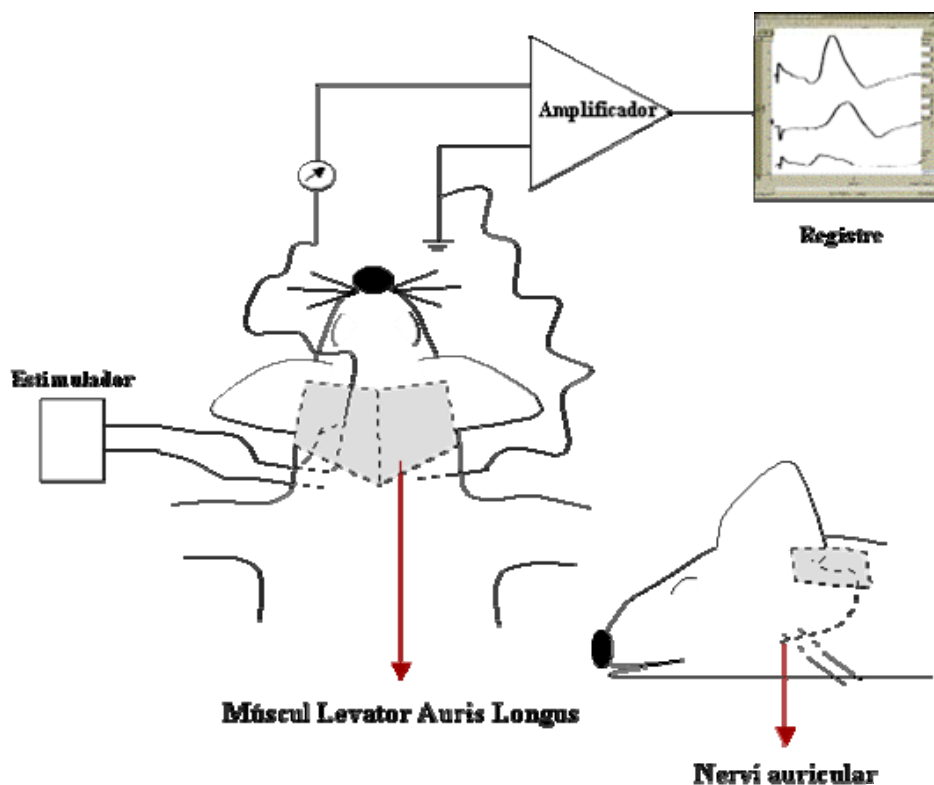


Figura 11. Esquema representatiu del procediment de registre de les neurografies motores.

3.10.-Tècniques fluorescents d'immunohistoquímica

Amb la finalitat de conèixer la localització de l'antigen contra el que van dirigits els anticossos IgM presents en el sèrum del nostre pacient i els seus possibles efectes sobre les diferents parts de la unió neuromuscular, es van dur a terme dobles i triples marcatges immunofluorescents en músculs LAL i els seus nervis, i posteriorment es van fer els anàlisis amb el microscopi confocal.

3.10.1.- Immunohistoquímica per detectar la fixació dels anticossos anti-gangliòsids en múscul

Per detectar la fixació de les mIgM del pacient en el múscul esquelètic, en unions neuromusculars dennervades i en fibres aïllades es van processar diferents músculs LAL de ratolins adults control (Control I), es van dur a terme dennervacions completes del múscul LAL i finalment, es van fer aïllaments de fibres musculars d'aquest mateix múscul.

3.10.1.1.- En músculs controls

La unió de les mIgM a la placa motora es va visualitzar utilitzant el sèrum del pacient amb IgM anti-GM2 juntament amb la bungarotoxina (BgTX-conjugada amb un fluorocrom) que s'uneix específicament als receptors d'acetilcolina (AChR) i marquen la part postsinàptica de la unió. També es va utilitzar, simultàniament a les IgM anti-GM2, anticossos contra la syntaxina (molècula que es troba en les zones actives de la membrana presinàptica) que marquen el terminal nerviós, o anticossos contra S-100 (molècula situada en la superfície de les cèl·lules de Schwann) que ens marquen la cèl·lula de Schwann. En certs casos es van detectar simultàniament IgM anti-GM2, AChR i S-100.

3.10.1.2.- Obtenció de fibres musculars aïllades

Amb l'obtenció de les fibres musculars aïllades podem estudiar unions neuromusculars on ni els terminals nerviosos (marcats amb syntaxina) ni les cèl·lules de Schwann (marcades amb S-100) hi són presents; mentre que les molècules postsinàptiques (marcades amb BgTX) s'hi mantenen.

Per obtenir fibres musculars aïllades es va fer l'extracció del múscul LAL de diferents animals i posteriorment un tractament amb col·lagenasa tipus I (0.3 % en RN) (Bekoff i Betz, 1977). El múscul LAL va ser incubat 1 h a 37 °C en una solució de Ringer saturada amb 95 % O₂ / 5 % CO₂ que contenia un 0.3 % de col·lagenasa I. La solució de Ringer amb col·lagenasa va ser canviada cada 15 minuts. Després del tractament amb col·lagenasa, els músculs van seguir el protocol que s'explica al processament de les mostres.

3.10.1.3.- Obtenció de músculs dennervats

El procés de dennervació ens permet estudiar les sinapsis neuromusculars sense la seva component nerviosa. En aquests estudis veiem com després de la dennervació es mantenen les molècules postsinàptiques (AChR; marcats amb BgTX) i la cèl·lula de Schwann (marcada amb S-100), mentre que el terminal nerviós (marcat amb syntaxina) desapareix.

Per obtenir els músculs LAL dennervats, els animals van ser anestesiats (com s'ha vist prèviament) i col·locats sota una lupa estereoscòpica. Sota la lupa als animals se'ls hi feia una incisió a la part baixa del pavelló auricular i es buscava la branca posterior del nervi facial, branca que va ha innervar el múscul LAL. Un cop trobat, es tallava el nervi a pocs mil·límetres del punt on aquest entra en el múscul. Els talls provocats en les orelles dels animals es van suturar. La dennervació va ser controlada visualment denotant que l'orella dennervada no mostrava moviment i també seguint un protocol de neurografia motora, similar al descrit prèviament però utilitzant com a receptor agulles concèntriques convencionals d'electromiografia i no es van detectar potencials d'unitat

motora en el múscul LAL després de 3 dies post-dennervació (signe de dennervació) (Lanuza i cols., 2003).

Després de 12 dies de la dennervació els músculs van ser extrets de l'animal. Els músculs que no van ser processats immediatament es van conservar a – 80 °C per la seva posterior utilització.

3.10.2.- Immunohistoquímica per detectar la fixació dels anticossos anti-gangliòsid en nervi

Els nervis del LAL també van ser processats per immunohistoquímica per detectar la unió de les mIgM en nervis motors.

Es van obtenir axons aïllats per un aixafament dels nervis (Goodyear i cols., 1999). En aquests estudis es van detectar simultàniament mIgM anti-GM2 i neurofilament 200 KDa (neurofilament axònic) per identificar el recorregut axonal i, mIgM anti-GM2 i S-100 (molècula situada en la superfície de les cèl·lules de Schwann) per detectar la cèl·lula de Schwann i/o beina de mielina.

3.10.3.- Immunohistoquímica en músculs tractats

A part dels músculs LAL sense tractar (Control I), amb els estudis immunohistoquímics també es van estudiar músculs LAL tractats amb les mIgM actives (títol 1/10000) per detectar possibles canvis morfològics o estructurals degut als anticossos anti-gangliòsid.

3.10.3.1.- Detecció de canvis estructurals en el terminal

Per determinar si la injecció de les IgM monoclonals produïa una modificació en les unions neuromusculars, es va realitzar una immunohistoquímica dels músculs tractats amb mIgM activa amb BgTX (per marcar els AChRs) i neurofilament 200 KDa (que marca recorregut axonal) per detectar creixement axonal, en forma de rebrots o *sprouts*, i/o retracció axonal. Els *sprouts* s'identifiquen com marca positiva per neurofilament sense tenir la corresponent marca positiva per la BgTX sota i la retracció axonal com a marca positiva per BgTX sense tenir damunt marca positiva per neurofilament.

3.10.3.2.- Detecció de dipòsits de complement

3.10.3.2.a.- En LALs tractats amb mIgM

Per estudiar si els músculs tractats amb les mIgM tenien dipòsits de complement de ratolí es van utilitzar anticossos monoclonals anti-C5b-9 humà de ratolí prèviament biotinitzat (Illa i cols., 1995), juntament amb BgTX i/o S-100.

De cara a comprovar que l'anticòs monoclonal es fixava a la fracció C5b-9 de ratolí, es va utilitzar com a control positiu l'aorta de ratolins homozigots *knockout* en apo-E híbrids de ratolins arterioscleròtics C57BL/6J (Jackson Laboratory, West Grove, PA). A la íntima arterial d'aquests ratolins es va observar una important presència de complement activat en forma de C5b-9 (Figura 12).

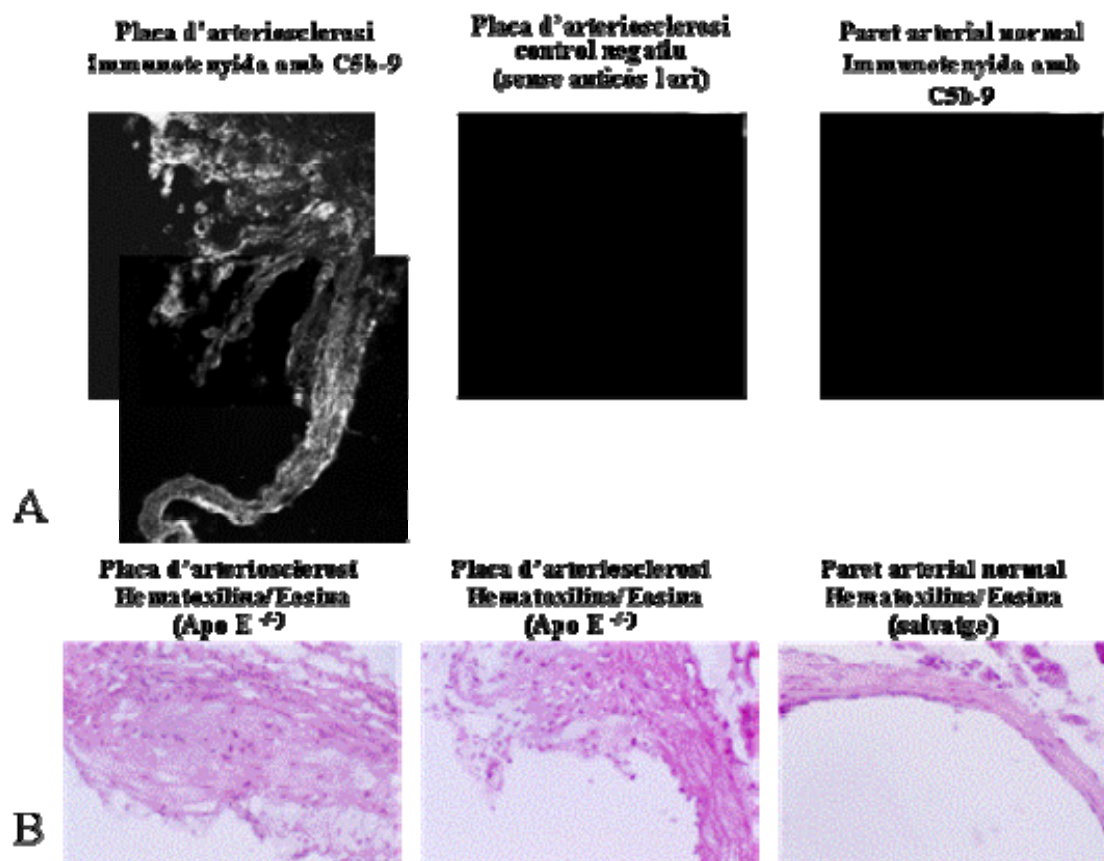


Figura 12. Control positiu per comprovar la fixació de l'anticòs anti-C5b-9 a ratolí. A, reacció positiva amb l'anti-C5b-9 en la paret de la aorta del ratolins homozigots *knockout* en Apo-E híbrids dels ratolins arterioscleròtics C57BL/6J (Jackson Laboratory). En l'arteriosclerosi està ben documentat la presència de monòcits/macròfags, components del complement i limfòcits (per revisió veure Rus i Niculescu, 2003). Tant en humans com en models experimentals d'arteriosclerosi es donen activació del complement i dipòsits de C5b-9, i la formació del C5b-9 es necessària per la progressió de lesions en l'arteriosclerosi. **B,** Morfologia de la íntima arterial de ratolins homozigots *knockout* en Apo-E híbrids dels ratolins arterioscleròtics C57BL/6J i ratolins salvatges. Tinció H/E.

En la Figura 12A podem veure la marca fluorescent per C5b-9 en l'aorta de ratolins deficients en Apo-E utilitzats com a controls positius, i que demostra que l'anticòs monoclonal utilitzat reconeix la fracció C5b-9 de complement de ratolí. En la Figura 12B veiem que la íntima de l'aorta d'aquests ratolins, marcada amb H/E, està engrossida per la formació de la placa heteromatososa.

3.10.3.2.b.- En LALs tractats amb mIgM més complement humà

Per comprovar que les mIgM del nostre pacient podien fixar complement humà es van fer estudis amb els mateixos anticossos monoclonals anti-C5b-9 humà de ratolí biotinitzat (Illa i cols., 1995), juntament amb BgTX, sobre LALs que prèviament se'ls havia injectat mIgM i complement humà (sèrum humà amb el complement complet de Sigma, 3 unitats per una hemòlisi del 50 % o CH₅₀).

Aquests animals seguien el mateix protocol d'injeccions que els animals tractats amb les mIgM actives, però juntament amb les mIgM també se'ls afegia complement humà de Sigma (dilució 1:1). Aquests animals únicament es van utilitzar per aquesta prova.

3.10.3.3.- Detecció de canals de calci dependents de voltatge

A més dels estudis de plasticitat, en els músculs tractats amb les IgM actives (títol 1/10000) també es va estudiar la presència dels diferents tipus de canal de calci dependent de voltatge (VDCCs): tipus L, P/Q i N. En aquests estudis es va marcar el terminal nerviós amb syntaxina i els canals amb anticossos específics contra el fragment α_1 dels diferents canals de Ca²⁺. També es van detectar simultàniament els AChR amb la BgTX conjugada amb Alexa-647. Com a control es van utilitzar músculs injectats amb les mIgM inactivades amb calor (Control IV).

3.10.4.- Processament de les mostres per immunohistoquímica

El procés d'immunohistoquímica que es va realitzar en els músculs de ratolí adult (tractat o no tractat) i els nervis, va consistir en primer lloc en l'extracció i la dissecció dels músculs i nervis dels ratolins, prèviament anestesiats, com s'ha explicat en l'apartat d'obtenció de mostra. Posteriorment, van ser fixats durant 30 minuts en

paraformaldehid al 4 % en tampó fosfat (PBS). Un cop fixades, les mostres van ser netejades en PBS i incubades durant 30 minuts en una solució de glicina 0.1 M en PBS per aturar l'acció del paraformaldehid, bloquejant els grups aldehid que hagin quedat lliures, i disminuir el soroll de fons. Un cop fixades i rentades amb glicina, les mostres van ser incubades en 4 % d'albúmina de sèrum boví (BSA) més 1 % de Tritó X-100 en PBS, per bloquejar els llocs inespecífics i permeabilitzar la membrana respectivament.

A continuació, els músculs van ser submergits tota la nit a 4 °C en una barreja dels diferents anticossos primaris de varies espècies amb les combinacions següents: anticòs policlonal anti-GM2 humà (1/10), anticòs monoclonal anti-sintaxina de ratolí (1/300) i anticòs policlonal anti-S100 de conill (1/10000) en PBS amb BSA o anticòs policlonal anti-GM2 humà (1/10) i anticòs monoclonal anti-neurofilament 200 KDa (1/300). Previ a la incubació amb els anticossos primaris es va fer la incubació amb bungarotoxina conjugada amb Alexa Fluor 647 o 546 (BgTX-Alexa Fluor 647 o 546 (Rho)) durant 1 hora a temperatura ambient. En el cas dels VDCCs, es van incubar els músculs tractats amb els diferents tipus de anticossos policlonals de conill pels diferents canals de Ca^{2+} (canals de Ca^{2+} dependent de voltatge tipus L, N i P/Q; diluïts 1/50) i amb BgTX i/o sintaxina. Pel que fa als dipòsits de complement, els músculs tractats es van incubar amb un anticòs monoclonal anti-C5b-9 humà de ratolí biotinitzat (1/25).

Després de la incubació amb els anticossos primaris, els músculs van ser rentats amb PBS tres vegades durant 30 minuts i posteriorment incubats durant 2 hores amb una mescla d'anticossos secundaris conjugats amb FITC i TRICT. Com a anticòs secundari per l'anticòs anti-C5b-9 es va utilitzar Avidin D conjugat amb FITC. Per incrementar la senyal donada pel GM2 es va emprar un sistema d'amplificació de senyal (Alexa Fluor^R 488 Signal-Amplification Kit for Fluorescein-and Orangon Green^R Dye-Conjugated Probes; Molecular Probes). Després del rentat corresponent, les mostres van ser

muntades amb Mowiol (Calbiochem) i una solució per a prolongar la marca fluorescent (Prolong antifading solution; Molecular Probes).

Amb les tincions múltiples, es va tenir especial cura en que no es produïssin reaccions creuades entre els anticossos secundaris i anticossos primaris no apropiades. Per eliminar la marca fluorescent inespecífica es van realitzar diferents controls negatius. Primer, incubant alguns músculs amb sèrum control de donants normals (sense cap malaltia); segon, per incubació amb absència d'anticòs primari, i finalment per incubació amb anticossos secundaris inespecífics. Per exemple es van incubar els músculs amb primari per GM2 i secundari per S-100 o, es van incubar les mostres amb primari per GM2 i secundari per syntaxina.

3.11.- Microscopia làser confocal

Els músculs marcats amb els diferents fluorocroms van ser visualitzar amb un Microscopi Làser Confocal Leica TCS 4D i un Microscopi Confocal Scanning Spectral Leica SP2 (Leica Laser Technik GmbH, Heidelberg, Germany). Les imatges van ser captades utilitzant un objectiu de 63x Leitz Plan-Apocromatic (d'obertura numèrica 1.4 oil).

Els fluorocroms FITC i TRIC van ser seqüencialment excitats a les línies 488 nm (verd) i 568 nm (vermell) d'un làser argon-krypton 75 mW. La força del làser es va ajustar per eliminar qualsevol senyal en el canal vermell durant l'excitació de la línia 488 nm. Per l'adquisició de les imatges digitals de tres longituds d'ona d'emissió es va utilitzar el microscopi Leica TCS SP2. Els fluorocroms FITC, TRIC i Alexa 647 van ser

seqüencialment excitats a les línies 488 nm, 568 nm i 633 nm (vermell llunyà) del làser argon-krypton-HeNe. En aquest cas, també es va ajustar la força del làser per eliminar qualsevol senyal no desitjada.

En els dos microscopis usats, les seccions “x” i “y” van ser recollides en la direcció “z” d’una mostra utilitzant una *z-stage* (o platina mòbil) d’elevada resolució. Les projeccions tridimensionals (3D; projecció de màxima intensitat) de les successives seccions “x/y” de dos colors es van transformar utilitzant un mòdul de 3D d’un software específic per microscopi làser confocal.

3.12.- Microscopia electrònica

Per estudiar com l’aplicació crònica de les mIgM contra GM2 afectaven la conducció nerviosa i la conformació de les beines de mielina, es van realitzar estudis de microscopia electrònica de transmissió en els nervis que van ha innervar el múscul LAL de diferents animals.

Els nervis dels músculs LAL d’animals tractats amb les IgM purificades del pacient i els dels Control IV es van fixar en una placa de Petri coberta amb Sylgard^R que contenia solució de Ringer normal, on van ser tallats en petites fraccions.

Aquestes petites fraccions dels nervis ($\sim 0.1 \text{ mm}^3$), es van fixar per immersió en 2 % glutaraldehyd en 0.1 M tampó fosfat sòdic amb sacarosa a pH 7.4, durant 2 hores. Posteriorment, es van rentar amb en tampó fosfat, i postfixades 1 hora en 2 % de tetraòxid d’osmi a 4 °C. Després de la deshidratació de les mostres amb concentracions creixents d’etanol i acetona, els nervis van ser col·locats en una orientació transversal i

endurits en resina Spurr. Seccions de 0.7 µm de gruix es van tenyir amb blau de toluidina i examinades en un microscopi òptic convencional.

Seccions ultrafines de 60 nm es van muntar sobre reixetes de coure i es van contrastar amb acetat d'uranil i citrat de plom per l'observació en un microscopi electrònic de transmissió Zeiss 10 CA.

Finalment, es va utilitzar un sistema de captació d'imatge d'alta definició per analitzar les seccions dels diferents nervis intramuscular amb una magnificació final de 19,000X.

3.13.- Estadística

Pels estudis de registre intracel·lular: els valors estan expressats com la mitja ± error estàndard de la mitja (S.E.M.). Es va utilitzar l'anàlisi de la variança (ANOVA) per avaluar les diferències entre grups i el test de Bonferroni per fer comparacions múltiples. Quan es va avaluar diferències entre dos grups, es va utilitzar el test t de Welch de dos cues (per dades no aparellades i assumint variàncies no iguals). Les diferències es van considerar significatives per $p < 0.05$.

Per les dades morfològiques: per comparar percentatges es va aplicar una Chi quadrat o un test de Fisher. Les dades es presenten com a mitja ± S.E.M. En tots els casos el criteri per la significació estadística va ser $p < 0.05$.

3.14.- Solucions utilitzades

Les solucions que es van utilitzar en aquest treball van ser les següents:

Sèrum d'un malalt amb polineuropatia crònica desmielinitzant amb un component monoclonal IgM (títol: > 1/150000). Proporcionat per l'Hospital Sant Pau de Barcelona.

Els gangliòsids comercials de cervell boví GM1, GM2, GM3, aGM1, GD1a, GD1b, GD3, GT1b, i GQ1b van ser proporcionats per Sigma (St. Louis, USA). Van ser diluïts amb metanol i emmagatzemats a – 20 °C. La solució de treball va dependre de la tècnica utilitzada.

Neuroaminidasa de *Clostridium perfringens* (1585886 5U), va ser proporcionada per Boehringer Mannheim. Es va diluir amb 0.1 M de tampó d'acetat (pH 5) per aconseguir una solució de 20 U/ml que va ser emmagatzemada a – 20 °C. La solució de treball va ser 0.1 U/ml.

d-tubocurarina (curare) va ser subministrada per Sigma, emmagatzemada a 4 °C en aigua bidestil·lada a una concentració de 1 mM. La solució de treball va ser de 3-1.5 µM.

Sulfat de magnesi (MgSO₄) va ser subministrat per Sigma, emmagatzemat a 4 °C en aigua bidestil·lada a una concentració de 250 mM. La solució de treball va ser de 4.5 mM.

ω-Agatoxina-IVA (ω-Aga-IVA), blocador del canal de calci dependent de voltatge (VDCC) tipus P/Q, subministrada per Alomone Labs. i Research Biochemicals Inc. Va ser emmagatzemada a – 20 °C a una concentració de 10 µM en aigua bidestil·lada. La solució de treball va ser de 100 nM.

ω -Conotoxina-GVIA (ω -CgTx-GVIA), blocador del VDCC tipus N, proporcionada per Research Biochemicals Inc. i emmagatzemada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una concentració de $100\text{ }\mu\text{M}$ en aigua bidestil·lada. La solució de treball va ser de $1\text{ }\mu\text{M}$.

Nitrendipina, blocador del VDCC tipus L, subministrada per Reserch Biochemicals Inc. i emmagatzemada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una concentració de 50 mM en dimetilsulfòxid (DMSO) i protegida de la llum. La solució de treball va ser de $1\text{ }\mu\text{M}$. Els experiments que es van portar a terme en presència de nitrendipina van ser realitzats en absència d'il·luminació directa. Per fer comparacions adequades, el DMSO es va afegir a les preparacions control dels experiments on les preparacions eren posteriorment tractades amb nitrendipina; el DMSO era afegit tant en músculs controls com músculs tractats. La concentració final de DMSO, tant en els controls com en les preparacions tractades amb la droga, va ser de $0.1\text{ }\%$ (v/v). En experiments control, aquesta concentració de DMSO es va veure que no afectava cap dels paràmetres control.

El DMSO és un conegut anti-colinesteràsic i per arribar a la concentració final que no afectés cap dels paràmetres estudiats es van realitzar experiments control previs. En ells es va relacionar una dosi-resposta entre el DMSO i la freqüència i l'amplitud dels MEPPs, on es va veure que únicament concentracions superiors a $0.1\text{ }\%$ donava un canvi significatiu en l'amplitud dels MEPPs (Figura 13).

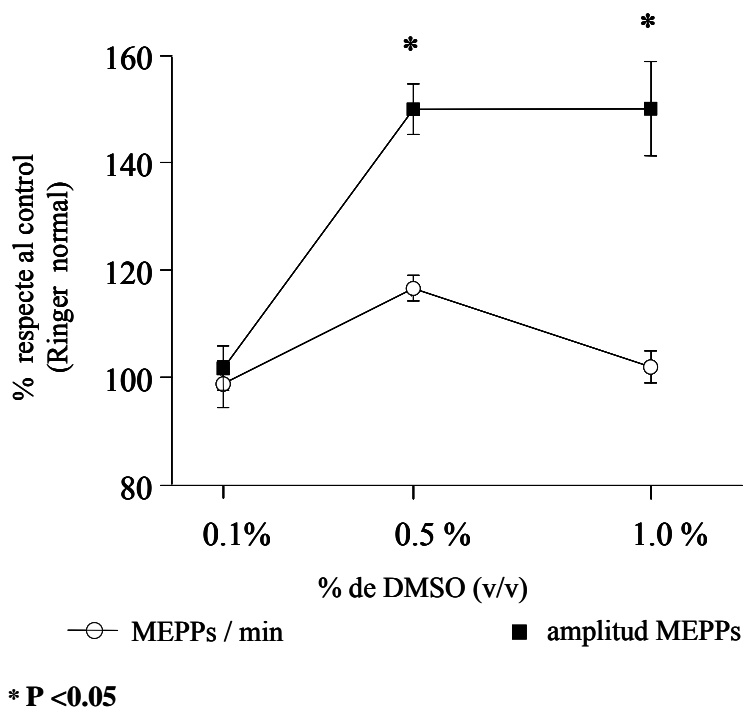


Figura 13. Relació dosis-resposta del DMSO en la neurotransmissió espontània.

Altres autors, a part de nosaltres, han utilitzat solucions que contenen un 0.1 % (v/v) de DMSO en diferents estudis amb els canals de calci dependents de voltatge de la unió neuromuscular, i no s'han trobat canvis en els paràmetres estudiats que es podrien atribuir al DMSO (per exemple (Katz i cols., 1996; Rosato Siri i Uchitel, 1999). Cal destacar que quan s'utilitzen altres models com són els invertebrats concentracions més baixes de DMSO (per sota de 1.4 mM que és la concentració final en experiments amb sinapsis neuromusculars de mamífers) poden inhibir l'acetilcolinesterasa.

Dimetil Sulfòxid (DMSO), utilitzat com a dissolvent, va ser subministrat per Sigma i emmagatzemat a temperatura ambient i protegit de la llum. La concentració de treball va ser al 0.1 % (v/v).

Albúmina de sèrum boví (BSA) subministrada per Sigma, va ser emmagatzemada a 4 °C. La concentració de treball va ser de 1-4 % en solució salina.

Tritó X-100 proporcionat per Sigma i emmagatzemat a 4 °C. La concentració de treball va ser de 1 %.

Paraformaldehid subministrat per Sigma, emmagatzemat a 4 °C en solució salina. La concentració de treball va ser de 4 %.

Glicina subministrada per Sigma, emmagatzemada a 4 °C en solució salina. La concentració de treball va ser de 0.1 M.

Col·lagenasa tipus I va ser subministrada per Sigma i emmagatzemada a 0 °C. La solució de treball va ser 0.3 % en RN.

α -bungarotoxina conjugada amb Alexa Fluor 647 o 546 va ser proporcionada per Molecular Probes (The Netherlands) i emmagatzemada a -20 °C a una concentració de 1 mg/ml en solució salina (PBS). La concentració de treball va ser de 5 μ g/ml.

Els anticossos primaris utilitzats en estudis d'immunohistoquímica van ser: l'anticòs monoclonal anti-sintaxina de ratolí i el monoclonal anti-neurofilament 200 KDa de ratolí proporcionats per Sigma, l'anticòs de conill anti-S100 proporcionat per Dako. Els anticossos anti- Ca_v 1.3 (α_{1D} , *L-type of voltage gated channels*), anti- Ca_v 2.2 (α_{1B} , *N-type of voltage gated channels*) i anti- Ca_v 2.1 (α_{1A} , *P/Q-type of voltage gated channels*)

van ser proporcionats per Alomone Labs. L'anticòs contra el complement anti-C5b-9 va ser subministrat per Dako i la Biotin per (Vector laboratories).

Els anticossos secundaris de conill contra immunoglobulines classe M (IgM) i de classe G (IgG) humanes amb peroxidasa conjugada, utilitzats tant per la tècnica d'immunofixació en cromatografia en capa fina com per l'ELISA, van ser proporcionats per Dako. Tots els anticossos secundaris utilitzats en la tècnica d'immunocitoquímica, IgG de cabra anti-humà conjugat amb FITC i IgG de ratolí anti-conill o de cabra anti-ratolí conjugat amb TRICT, eren de laboratoris Jackson ImmunoResearch. L'Avidin D-FITC va ser subministrada per Vector laboratories.

Totes les sals utilitzades en aquest treball en grau analític van ser proporcionades per Sigma i els solvents orgànics (cloroform, metanol, etc.) van ser subministrats per Merck.

4.- RESULTATS

4.1.- Especificitat dels anticossos

Donat que aquest treball es basa en la participació i l'efecte dels anticossos del sèrum d'un pacient amb una malaltia neuromuscular sobre la unió neuromuscular, el primer pas va ser determinar amb precisió quina era l'especificitat antigènica d'aquests anticossos. Per tant, es va determinar la reactivitat dels anticossos del sèrum del malalt contra gangliòsids comercials (degut a la relació preexistent entre malalties neuromusculars i títols alts d'anticossos anti-gangliòsid, Ilyas i cols., 1985) amb tècniques d'ELISA i posteriorment, es va estudiar l'especificitat-afinitat d'aquests anticossos amb la tècnica d'immunoHPTLC.

4.1.1.- Reactivitat utilitzant l'ELISA

Quan es van utilitzar els gangliòsids comercials estàndards, els resultats de l'ELISA van mostrar que el sèrum del pacient estudiat reaccionava únicament amb el gangliòsid GM2, amb un títol pels anticossos IgM sempre superior a 1:150000.

Per contrastar aquest resultat, en el laboratori es van estudiar més de 1000 pacients amb malalties neuromusculars i únicament es va trobar que 11 pacients tenien títols elevats d'anticossos anti-GM2 de classe IgM (amb un rang que anava de 1:500 a 1:12300). El sèrum de controls sans no van reaccionar contra GM2.

Donat que el sèrum del pacient diagnosticat de polineuropatia motora tenia aquest títol tant elevat contra el gangliòsid GM2, es va voler estudiar l'especificitat d'aquestes immunoglobulines enfront barreges de gangliòsids.

4.1.2.- ImmunoHPTLC

Per determinar l'especificitat dels anticossos del sèrum davant de gangliòsids amb la tècnica d'immunoHPTLC (immunofixació en plaques de sílice), es van utilitzar barreges de gangliòsids de cervell boví, de cervell humà i de cèl·lules YAC-1.

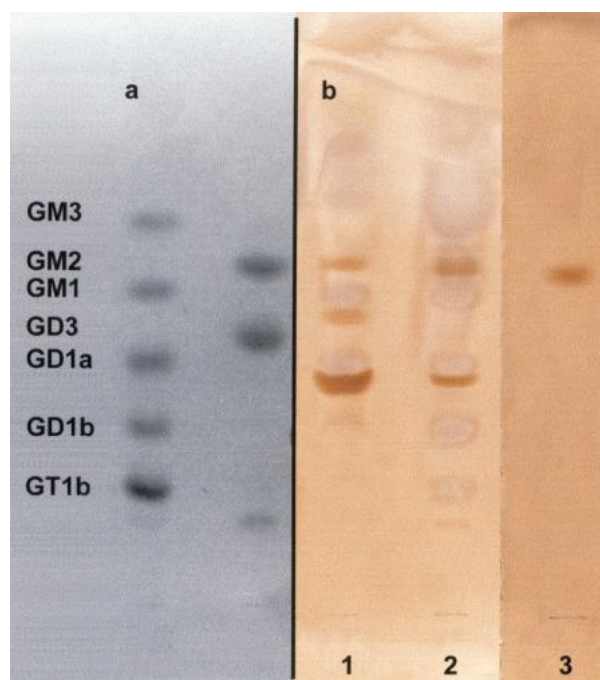


Figura 14. ImmunoHPTLC amb barreges de gangliòsids de cervell boví i humà. (a) Cromatografia en capa fina d'alta precisió (HPTLC) d'estàndards bovins revelats amb resorcinol. (b) Immunotinció amb el sèrum del pacient i anti-IgM humanes conjugades amb peroxidasa: línia 1, gangliòsids de cervell boví; línia 2, de cervell humà; i línia 3, GM2 estàndard boví.

Amb la barreja de gangliòsids obtinguts a partir de cervell boví, la immunotinció de la placa de sílice amb el sèrum del pacient va mostrar reactivitat de les immunoglobulines contra GM2 i també contra dos gangliòsids més. La banda corresponent a un d'aquests gangliòsids apareixia entre les bandes corresponents a GM1 i a GD1a i l'altre migrava just per sota de la banda corresponent a GD1a. Quan es va utilitzar la barreja de gangliòsids de cervell humà es va observar fixació de les IgM del sèrum a nivell de

GM2 i per sota de GD1a, com es pot apreciar en la Figura 14. Aquest patró de reconeixement no es va trobar en el sèrum de cap altre pacient.

Per esbrinar els gangliòsids corresponents a les dues bandes que ens apareixien en la immunoHPTLC de cervell boví, es va utilitzar el gangliòsid GD1a-GalNAc aïllat al nostre laboratori i la barreja de gangliòsids de les cèl·lules YAC-1 (cèl·lules que contenen en la seva membrana majoritàriament el gangliòsid no comercial GM1b-GalNAc; Muthing i cols., 1991), donat que en un estudi precedent Ilyas i col·laboradors (1988a) també van estudiar el sèrum d'un malalt amb polineuropatia crònica i una reactivitat semblant a la del nostre pacient.

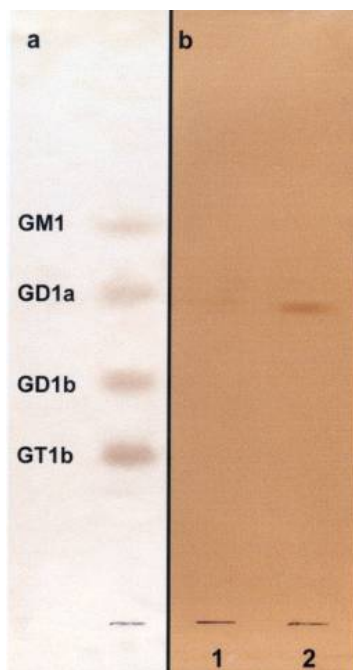


Figura 15. ImmunoHPTLC amb gangliòsids purificats. (a) Cromatografia en capa fina d'alta precisió (HPTLC) d'estàndards bovins revelats amb resorcinol. (b) Immunotinció amb el sèrum del pacient i anti-IgM humanes conjugades amb peroxidasa: línia 1, GD1a purificat; i línia 2, GD1a-GalNAc purificat.

Les IgM del malalt van reconèixer la banda corresponent al gangliòsid GD1a-GalNAc aïllat, que apareixia just per sota de la banda per GD1a (Figura 15). La immunotinció en HPTLC dels gangliòsids purificats de les cèl·lules YAC-1 amb les IgM del pacient (Figura 16) va revelar un patró de bandes que correspon al gangliòsid GM1b-GalNAc

(Muthing i cols., 1991). En aquest cas les diferents bandes es trobaven entre GM1 i GD1a, coincidint amb el patró de bandes que es va detectar pel sèrum en els gangliòsids de cervell boví, però no en els gangliòsids de cervell humà (Figura 14). Aquest fet ja havia estat descrit en un estudi previ pel sèrum d'un altre pacient amb polineuropatia crònica desmielinitzant (Ilyas i cols., 1988a). La banda corresponent a GM1b-GalNAc no apareix en l'estudi de gangliòsids de cervell humà perquè aquest gangliòsid no es detecta en cervell humà.

Després de la purificació del gangliòsid GD1a-GalNAc, es va realitzar un assaig d'ELISA i el títol pels anticossos anti-GD1a-GalNAc del malalt va ser de 1:25000.

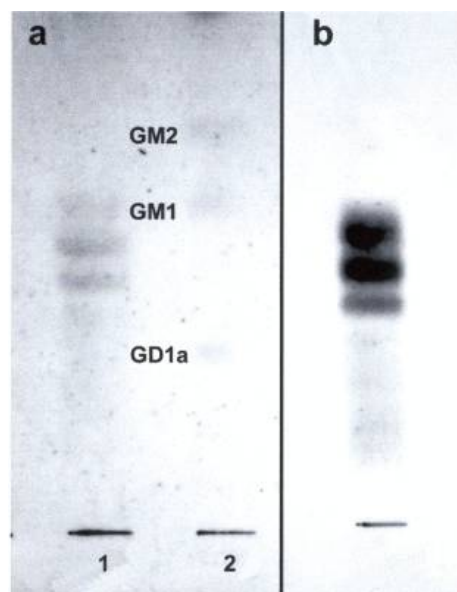
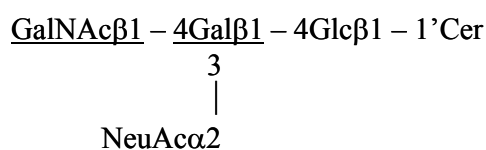


Figura 16. ImmunoHPTLC amb les cèl·lules YAC-1. (a) Cromatografia en capa fina d'alta precisió (HPTLC) d'estàndards revelats amb resorcinol. Línia 1, els gangliòsids de les cèl·lules YAC-1; i línia 2, gangliòsids d'estàndards bovins. (b) Immunotinció dels gangliòsids de les cèl·lules YAC-1 amb el sèrum del pacient.

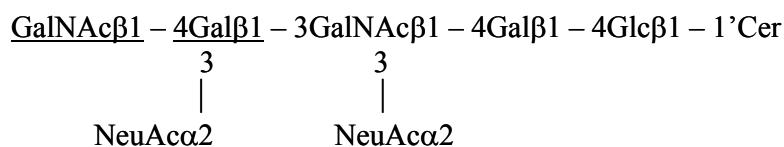
Donat que aquesta immunofixació es produïda per anticossos de la classe IgM i que les bandes tenien una intensitat força elevada, es va deduir que aquest patró d'immunoreactivitat corresponia al component monoclonal de la classe IgM que presentava el sèrum del pacient. Per tant, com les IgM que reconeixen el determinant antigènic dels gangliòsids són les del component monoclonal, ens referirem a aquestes al llarg de l'exposició com mIgM.

Com a resum d'aquest apartat podem dir que el terminal immunoreactiu comú als gangliòsids GM2, GD1a-GalNAc i GM1b-GalNAc, anti-[GalNAcβ1-4Gal(3-2αNeuAc)β1-], sembla ser l'epítoc que provoca la resposta immunitària. En la Figura 17 es pot veure esquematitzat el terminal comú d'aquests tres gangliòsids.

GM2



GD1a-GalNAc



GM1b-GalNAc

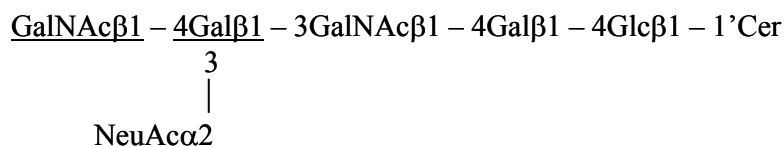


Figura 17. Dibuix esquemàtic de l'estructura dels gangliòsids. Estructura carbohidratada dels gangliòsids GM2, GD1a-GalNAc i GM1b-GalNAc. Les porcions subratllades mostren els residus comuns. La nomenclatura es basa en Svennerholm (1994).

4.2.- Localització dels gangliòsids amb el determinant antigènic [GalNAcβ1-4Gal(3-2αNeuAc)β1-] per immunohistoquímica

Un cop determinat l'antigen contra el que reacciona l'anticòs monoclonal de la classe IgM del sèrum del pacient, vam voler estudiar la seva localització exacta tant a nivell

d'unió neuromuscular com en nervi perifèric ja que hi havia diferents estudis que localitzaven als gangliòsids en aquestes zones (Santoro i cols., 1992; Plomp i cols., 1999).

4.2.1.- Localització en músculs LAL de ratolins adults sans

Donat que diferents estudis mostraven la presència de gangliòsids en la zona de la unió neuromuscular (Plomp i cols., 1999; O'Hanlon i cols., 2001) i que l'estudi electrofisiològic del pacient mostrava algunes dades, com és la disminució de l'amplitud dels CMAPs (potencials d'acció musculars compostos) sense dades electromiogràfiques de lesió axonal, que es podrien explicar per una alteració de la placa motora; vam voler estudiar la localització de l'antigen contra el que van dirigir els anticossos del nostre pacient en la sinapsi neuromuscular.

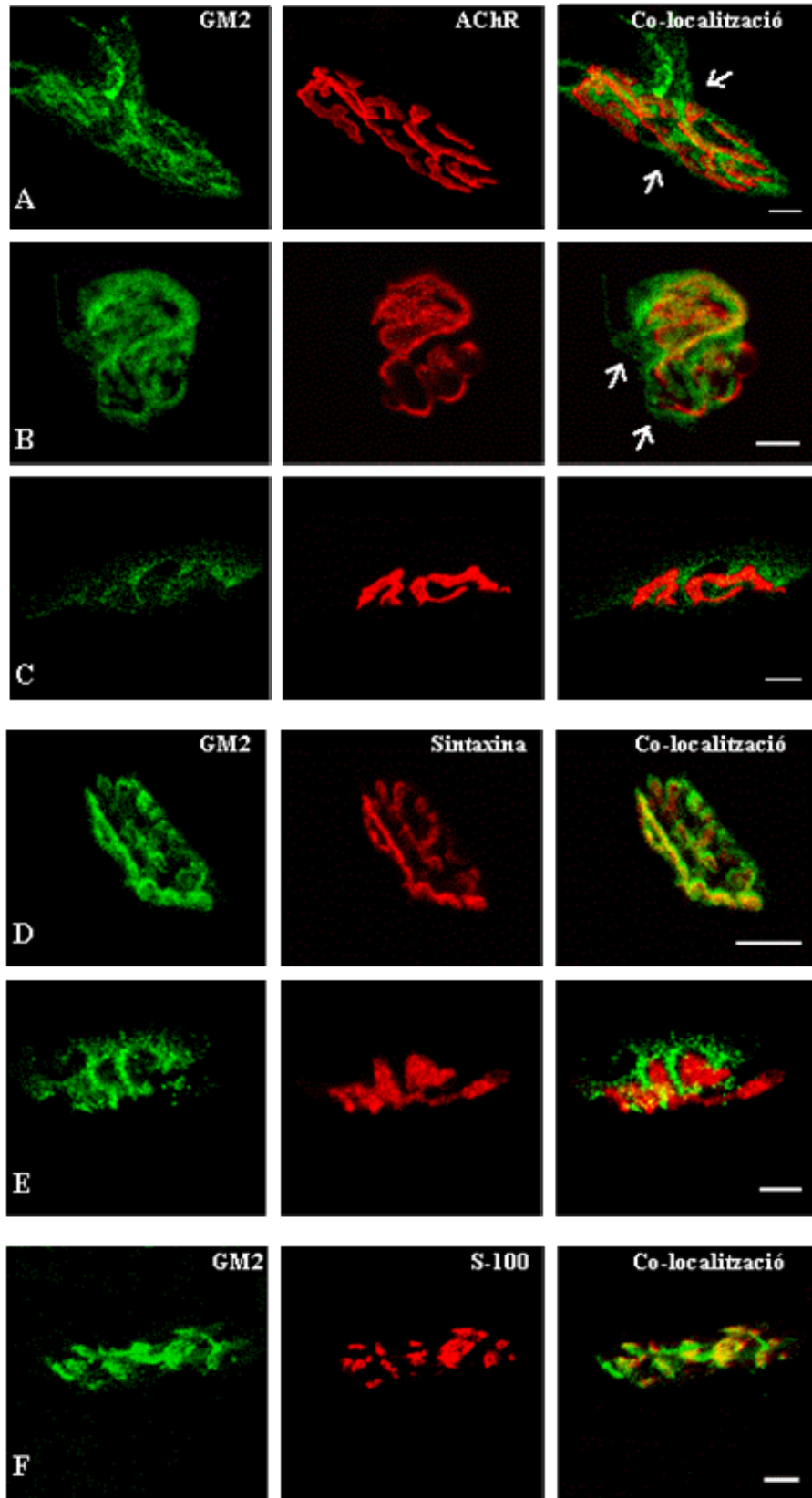
4.2.1.1.- En músculs controls (Control I)

Per a localitzar els gangliòsids amb el determinant antigènic comú a GM2 (anomenarem genèricament GM2 per fer més comprensible la lectura) en la sinapsi neuromuscular (NMJ), es van utilitzar les IgM aïllades del sèrum del malalt juntament amb marcadors moleculars dels tres elements cel·lulars que configuren les unions neuromuscular: la cèl·lula muscular (usant toxines pels receptors d'acetilcolina, AChR), el terminal nerviós (utilitzant anticossos per les proteïnes syntaxina i neurofilament 200 KDa) i la cèl·lula de Schwann (fent servir anticossos contra la proteïna S-100 que es localitza en les membranes d'aquestes cèl·lules) (Figura 18).

L'anàlisi immunofluorescent, que es va visualitzar amb microscopia confocal, va mostrar poc alineament entre les mIgM i els agrupaments d'AChR en les unions neuromusculars de músculs LAL de ratolí adult (Figura 18A i 18B per una visió frontal; les fletxes indiquen la marca fluorescent pel GM2 fora dels agrupaments d'AChR). Quan es va observar amb deteniment el doble marcatge per AChR (postsinàptic; utilitzant bungarotoxina) i GM2, es va veure que l'àrea de senyal pels AChR era, en molts casos, clarament més petita que la senyal de les mIgM (Figura 18C). En canvi, la senyal presinàptica fluorescent del terminal nerviós, marcada amb syntaxina (marcador axonal), i la senyal dels dipòsits de mIgM es van trobar, generalment, més sobreposades (Figura 18D); tot i que la coincidència no va ser del tot completa. Encara que les dues senyals estaven en la mateixa àrea sinàptica, una porció important de la marca fluorescent de les mIgM es va localitzar al voltant i per dins de les regions que mostraven fixació per a la syntaxina (Figura 18E). Amb experiments posteriors, es va veure que també hi havia una elevada coincidència entre la localització de la marca de les mIgM i la proteïna S-100 de la cèl·lula de Schwann (Figura 18F; també veure Figura 19).

Figura 18 (pàgina següent). Immunofluorescència confocal que mostra la distribució del GM2 en les NMJ normals. Fixació de les mIgM anti-GM2 a les plaques motores del múscul LAL (verd) i co-localització per immunofixació amb marcadors moleculars dels tres elements cel·lulars que configuren la NMJ (en vermell): AChR en les cèl·lules musculars (**A** i **B**, visió frontal; **C**, visió lateral), syntaxina en els terminals nerviosos (**D** i **E**) i la proteïna S-100 en la cèl·lula Schwann (**F**). La co-localització (marca groga) mostra la superposició de les dos imatges. La correspondència topològica del immunomarcatge de les mIgM amb el *cluster* d'AChR (marcat amb α -BgTx-Rho) no és completa (fletxes en **A** i **B**). En la visió frontal (**C**), la senyal pels AChR va ser, en molts casos, clarament més petita que la senyal per les mIgM. La senyal del terminal nerviós marcat amb syntaxina i la senyal dels dipòsits de mIgM estan en la mateixa àrea sinàptica (**D**), encara que la marca per mIgM excedeix a la marca positiva per syntaxina (**E**). La major coincidència (marca groga) s'observa entre la localització de la marca per mIgM i la marca per la proteïna S-100 de la cèl·lula de Schwann (**F**). Escala, 10 μ m.

Figura 18. Immunofluorescència confocal que mostra la distribució del GM2 en les NMJ normals (peu de figura en la pàgina anterior).



Aquestes observacions suggereixen que les IgM monoclonals del nostre pacient es fixen en el component presinàptic, en el terminal nerviós i/o a les cèl·lules de Schwann, i no en el component postsinàptic de les unions neuromusculars.

4.2.1.2.- En fibres aïllades

Per demostrar que els anticossos anti-GM2 de la classe IgM del sèrum del nostre pacient no es fixen en el component postsinàptic, es van fer experiments d'immunohistoquímica amb fibres musculars aïllades mitjançant un tractament amb col·lagenasa (Figura 19A). Amb la col·lagenasa s'elimina de la unió neuromuscular, a part de les cèl·lules satèl·lits, altres tipus cel·lulars com són les cèl·lules de Schwann i els axons motors.

Després d'aquest tractament i realitzant un triple immunomarcatge de les fibres musculars es van visualitzar les plaques motores amb el component postsinàptic aïllat. Així, tot i persistir el marcatge de la bungarotoxina (BgTX), que es fixa als AChR, no es va detectar la marca pel terminal nerviós (senyal per syntaxina, Figura 19A.1) ni per les cèl·lules d'Schwann (proteïna S-100, Figura 19A.2). En aquestes condicions les mIgM no es van fixar a les sinapsis neuromusculars; per tant, es va veure que el gangliòsid GM2 no té una localització postsinàptica. En les mateixes preparacions, també es va observar marcatge aïllat del component presinàptic lluny del component postsinàptic (p.e., marques de S-100 sense senyal pels AChRs) amb marcatge positiu per GM2 (no es mostren les dades), confirmant així que les mIgM es fixen al component presinàptic de la unió neuromuscular.

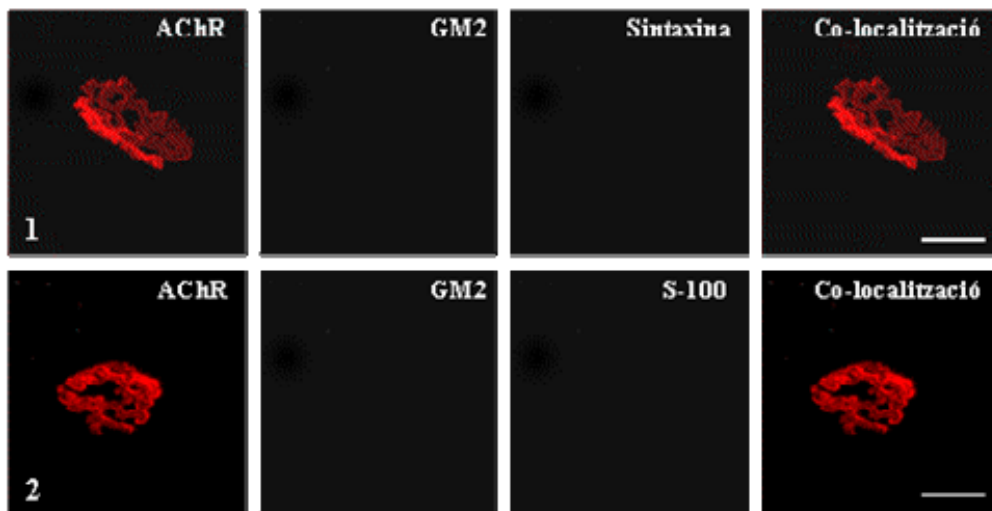
4.2.1.3.- En plaques motores dennervades

Per acabar de confirmar les nostres dades de localització, es van fer dennervacions del múscul LAL 12 dies abans de la seva extracció per a immunofluorescència. Durant aquest període es produeix la degeneració axonal dels terminals motors de les sinapsis neuromusculars sense que s'hagi produït cap grau de reinnervació (Lanuza i cols., 2003). En el procés de dennervació el nervi es retira de les unions mentre que la cèl·lula de Schwann es manté en la zona presinàptica. Es van fer experiments preliminars per immunohistoquímica amb anticossos anti-neurofilament i anti-sintaxina per comprovar que la dennervació era total.

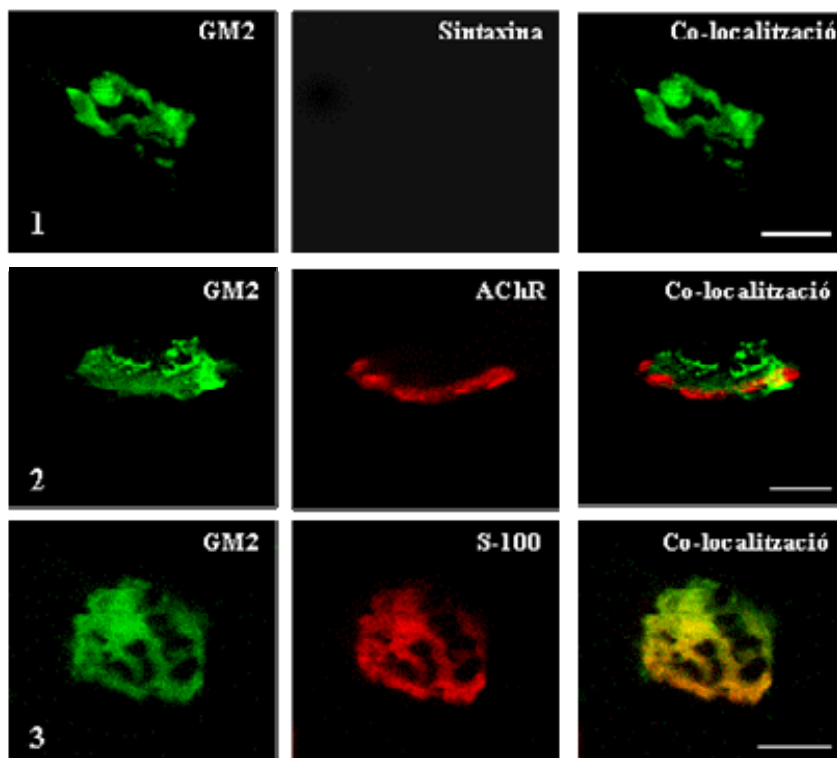
Sota aquestes condicions experimentals, es va trobar que totes les unions neuromusculars aneurals contenien GM2 perquè quedaven marcades amb l'anticòs anti-GM2 (Figura 19B). Aquesta marca per GM2 en les sinapsis aneurals estava clarament localitzada en la cèl·lula de Schwann (Figura 19B.3) i no, en el terminal nerviós (marca de GM2 i no de syntaxina, Figura 19B.1) o en la part postsinàptica de la unió (marca de GM2 sobre la marca pels AChR; Figura 19B.2). Això està en concordança amb el que s'observa en la Figura 18A i 18B, on es pot apreciar immunofixació dels anticossos anti-GM2 fora dels llocs postsinàptics i fora de branques axonals positives per la syntaxina. Tot i amb això, el GM2 també està localitzat en les branques del terminal nerviós perquè també es va observar marcatge positiu per GM2 fora de les marques de S-100 (per exemple, mirar la fletxa en la senyal de GM2 del triple marcatge de la Figura 19C).

Figura 19. Evidència de GM2 en axons i cèl·lula de Schwann (peu de figura en la pàgina següent).

A. Tractament amb col·lagenasa



B. Músculs denervats



C. Múscul control

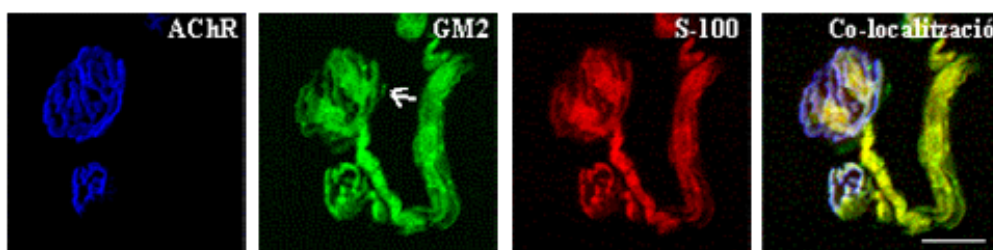


Figura 19 (pàgina anterior). Evidència de GM2 en axons i cèl·lula de Schwann. En **A**, es poden veure fibres aïllades musculars després d'un tractament amb col·lagenasa. Les fibres aïllades es detecten com a plaques motores sense terminal nerviós (1) ni cèl·lula Schwann (2), mentre que les molècules postsinàptiques, com els AChR, es mantenen. En aquestes condicions les plaques motores no fixen mIgM. En **B**, es pot observar el GM2 als llocs sinàptics dennervats. Els músculs, després d'estar dennervats durant 12 dies, van ser tenyits amb anticossos contra GM2, syntaxina (1), α -BgTx-Rho que marca els llocs postsinàptics (2) i amb S-100 (3). L'immunomarcatge per GM2 es manté concentrat als llocs sinàptics. La immunoreactivitat es localitza també en i al voltant de les regions riques en AChR (en 2), el que indica que la localització està en la cèl·lula de Schwann. En **C**, es mostra que GM2 també està localitzat en les branques terminals nervioses donat que, freqüentment s'observa marcatge positiu per GM2 fora de la marca positiva per S-100, com es pot veure (fletxa) en la marca per GM2 del triple marcatge d'aquesta figura. Escala, 10 μ m.

Per tant, podem dir que la senyal de l'anticòs anti-GM2 s'observa a nivell de la unió neuromuscular, més concretament la marca coincideix amb el marcatge per la cèl·lula de Schwann i/o pel terminal nerviós.

4.2.2.- Localització en els nervis de músculs LAL de ratolins adults sans

Donat que teníem unes immunoglobulines que provocaven una malaltia desmielinitzant en el nostre pacient i que diferents autors troben una relació directa entre els efectes desmielinitzants i la localització d'anticossos anti-gangliòsid en el nervi (Santoro i cols., 1992; Uncini i cols., 1993), vam investigar en quin lloc es localitzen les nostres immunoglobulines en el nervi que va a innervar el múscul LAL.

En la Figura 20A es pot apreciar marca dels anticossos anti-GM2 co-localitzada amb la senyal per la proteïna del neurofilament axonal 200 KDa en la immunohistoquímica realitzada en el nervi intramuscular del LAL de ratolí adult. En aquesta mateixa figura també es va veure una marca discreta i difusa al voltant dels axons que podia ser

compatible amb la marca per la cèl·lula de Schwann. Amb la Figura 20B es va comprovar que el gangliòsid GM2 es localitzava en la cèl·lula de Schwann (marca co-localitzada amb S-100) i també en la regió paranodal i/o nòduls de Ranvier d'aquests nervis.

Per tant, el gangliòsid amb el terminal comú a GM2 també es localitza a la regió del nervi perifèric tant en els axons motors com a nivell de beina de mielina.

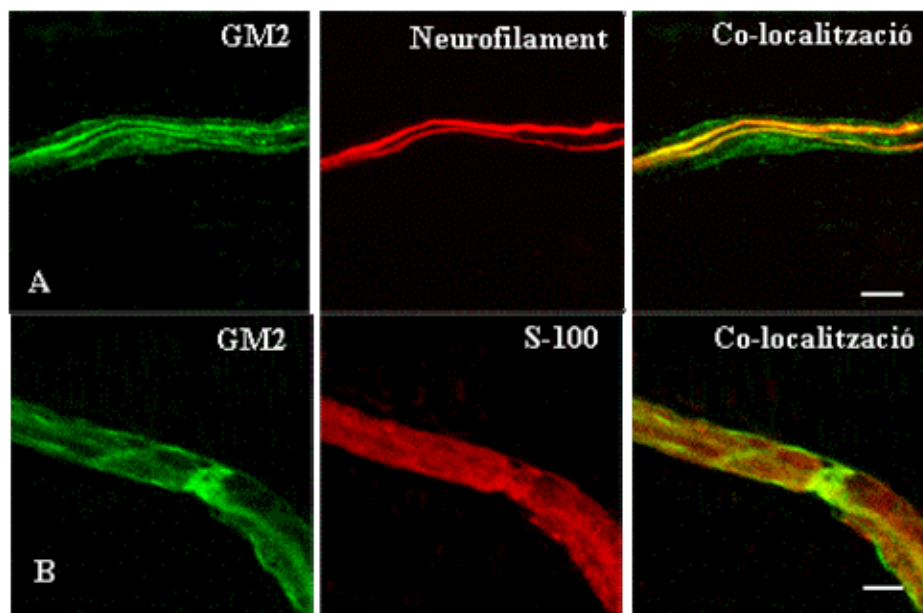


Figura 20. Immunofluorescència de nervi intramuscular que va ha innervar el múscul LAL. En **A**, podem veure la regió internodal del nervi i podem apreciar marca dels anti-GM2 co-localitzada amb la senyal pel neurofilament axonal 200 KDa. Si observem la marca de GM2 també podem veure una marca discreta i difusa al voltat dels axons. En **B**, veiem una zona nodal del nervi i podem comprovar que el gangliòsid GM2 es troba localitzat en la cèl·lula de Schwann (marca co-localitzada amb S-100) i en la regió paranodal o nòduls de Ranvier. Escala, 10 μ m.

4.3.- Efecte agut del sèrum i de les IgM monoclonals del pacient sobre l'alliberament del neurotransmissor

Degut a que el malalt presentava un quadre purament motor vam voler veure si els anticossos IgM anti-GM2 detectats en el seu sèrum podien interferir en la transmissió neuromuscular mitjançant experiments d'electrofisiologia.

4.3.1.- Neurotransmissió evocada en el diafragma de ratolí adult normal

Els primers experiments electrofisiològics que es van realitzar van ser afegint el sèrum del pacient a un bany amb el diafragma de ratolí per determinar quin efecte tenia aquest sobre la neurotransmissió evocada i més concretament sobre l'amplitud dels EPPs i el contingut quàntic.

En la Figura 21A-esquerra es mostra el curs temporal del contingut quàntic i l'amplitud dels EPPs en estudis de fibra única quan es va addicionar el sèrum del malalt directament al bany (sèrum diluït 1:9 en solució de Ringer; titulació final de les IgM en el bany 1:16000). Els estudis de fibra única van consistir en: inserir l'elèctrode de registre en una fibra muscular, fer un registre control, addicionar el sèrum i fer registres cada 15 minuts durant una hora. El principal efecte del sèrum va ser provocar un bloqueig del contingut quàntic i una baixada de l'amplada dels EPPs, que es va donar en els primers 30 minuts d'incubació i va arribar al seu màxim entre els 30 i 60 min. Per tant, l'efecte del sèrum sobre la neurotransmissió evocada va ser ràpid, el que ens va fer pensar en un efecte lligat a la membrana (com podria ser el bloqueig del GM2).

La Figura 21A-dreta mostra un exemple de registre electrofisiològic abans (a) i després d'1 h (b) d'incubació del sèrum en la mateixa fibra muscular, i com es pot apreciar, el sèrum va reproduir la baixada de l'amplitud dels EPPs. Com també es pot observar, la latència i el temps de pujada dels EPPs no es van veure afectats pel sèrum en cap dels experiments (percentatge de canvi: $1.41 \% \pm 0.91$ i $3.70 \% \pm 1.12$, respectivament, $n = 3$ músculs, mínim de 15 fibres per múscul). El potencial de membrana de les fibres musculars tampoc va variar amb l'addició del sèrum, amb un percentatge de canvi de $1.98 \% \pm 0.87$. Com el potencial de membrana no va variar amb la incubació del sèrum, no vam introduir cap modificació addicional a la fórmula de la variança utilitzada per calcular el contingut quàntic (veure apartat 3.8 de Material i Mètodes).

Quan es van fer estudis en tot el múscul (estudis poblacionals), es va veure que el percentatge de bloqueig del contingut quàntic per l'addició del sèrum va ser del $52.24 \% \pm 2.88$ ($p < 0.005$, $n = 3$ músculs, mínim de 15 fibres musculars per múscul; Figura 21B-esquerra). Amb un rentat amb Ringer normal (100 ml en 1 hora) l'acció de sèrum sobre el contingut quàntic es va poder revertir en un $92.39 \% \pm 5.13$ ($n = 3$ músculs, mínim de 15 fibres per múscul; Figura 21B-esquerra), el que ens permet assegurar que el bloqueig no era degut a problemes tècnics i per tant; poder pensar en una acció lligada a membrana. L'amplada dels EPPs també va decaure per l'acció del sèrum i es va recuperar després d'un rentat de forma similar als valors del contingut quàntic (percentatge d'inhibició poblacional: $51.95 \% \pm 1.97$, $p < 0.005$ comparant amb el control; percentatge de recuperació després del rentat: $100.55 \% \pm 7.03$, $n = 3$ músculs, mínim de 15 fibres per múscul, Figura 21B-dreta). El fet que les amplades decreïessin juntament amb el contingut quàntic ens permet excloure una acció del sèrum sobre el component postsinàptic.

Figura 21. Efecte del sèrum sobre els potencials de placa evocats (EPPs).

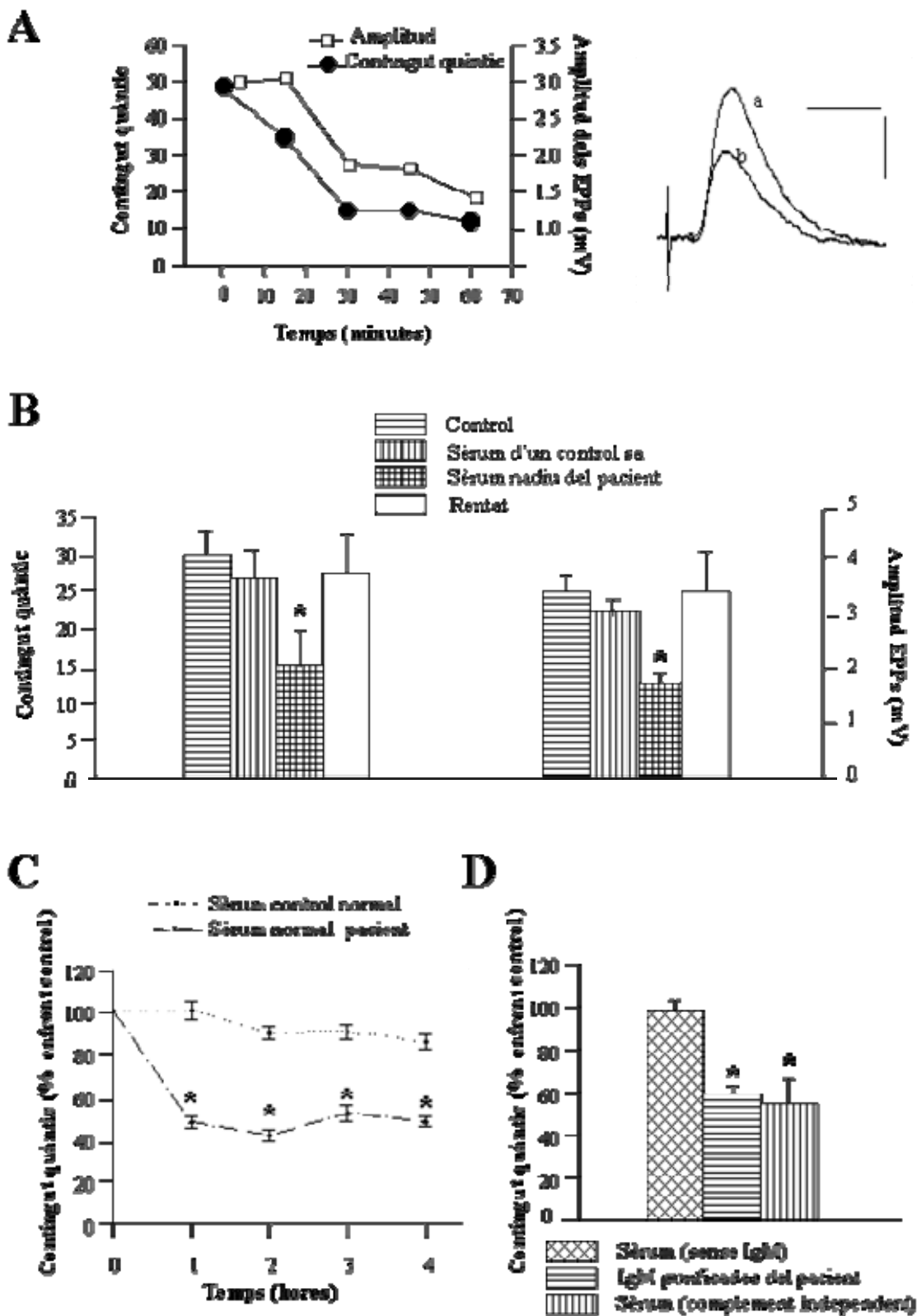


Figura 21. Efecte del sèrum sobre els potencials de placa evocats (EPPs). **A**, esquerra: seqüència temporal de l'efecte del sèrum sobre l'amplada dels EPPs (\square) i el contingut quàntic (\bullet) de la mateixa unió muscular (NMJ). El sèrum va ser addicionat al bany a temps 0. **A**, dreta: exemple de registres del bloqueig de la neurotransmissió evocada en la mateixa sinapsis. Cada traç representa un promig de 10 EPPs abans a) i 60 minuts després b) d'afegir el sèrum. La latència no varia amb l'addició del sèrum. L'artefacte d'estímul va ser reduït per millorar la claredat del registre. Escala, horitzontal: 4 ms, vertical: 1 mV. Els registres de les unions neuromusculars de l'esquerra i la dreta van ser diferents. **B**, efecte del sèrum en el contingut quàntic (esquerra) i en l'amplitud (dreta). Els dos paràmetres van ser inhibits després de 2 h d'incubació amb el sèrum i recuperats per rentats amb Ringer normal de 3.4 ml min⁻¹ durant 1 h (200 ml en total). Els músculs per cada tipus d'experiment van ser diferents. **C**, percentatge de la variació del contingut quàntic produït pel sèrum durant varies hores d'incubació. Cada punt representa el percentatge dels valors respecte al control. Els músculs dels sèrums control i del pacient van ser diferents. **D**, histograma del contingut quàntic en diferents situacions: sèrum del pacient sense IgM anti-GM2 (títol dels anticossos 1:80); anticossos IgM purificats del sèrum del pacient (títol 1:80.000) i sèrum nadiu del pacient on es va inactivar el complement (56 °C durant 30 min). Les barres de l'histograma representen el percentatge respecte als valors control. Els músculs per cada grup d'experiments van ser diferents. En tots els casos, n = 3 músculs per grup i un mínim de 15 fibres per múscul. * p < 0.05 respecte als controls.

Per descartar que els anticossos anti-gangliòsid haguessin lesionat les membranes dels terminals nerviosos i es perdessin vesícules sinàptiques i que això provoqués el bloqueig de la neurotransmissió (tal i com ha estat descrit prèviament; Bullens i cols., 2000), es va avaluar l'efecte del sèrum després de varies hores d'incubació. Es va enregistrar la resposta evocada per les unions neuromusculars a les 2, 3, i 4 hores d'incubació del sèrum i no es va detectar cap efecte significatiu depenent del temps després de la caiguda del contingut quàntic produïda durant la primera hora (percentatge de bloqueig: 58.64 % \pm 2.55 a les 2 h, 50.05 % \pm 4.03 a les 3 h i 48.05 % \pm 2.07 a les 4 h, p > 0.05 comparant els diferents temps d'incubació; p < 0.005 comparant amb el control en tots els casos, n = 3 músculs, mínim de 45 fibres en cada període; veure Figura 21C). Com a control negatiu es va utilitzar el sèrum de subjectes sans. El contingut quàntic no va decaure després d'hores d'incubació amb el sèrum de controls

sans (percentatge de canvi després de 4 h d'incubació: $10.12 \% \pm 2.95$, $p > 0.05$, $n = 3$ músculs, mínim de 45 fibres en cada període; Figura 21C). Amb aquest experiment es va veure que el sèrum del nostre pacient no provoca el bloqueig de la neurotransmissió per lesió del terminal nerviós i posterior depleció de vesícules, donat que el múscul seguia responent d'igual manera després de 4 h d'incubació amb aquest sèrum. No van ser estudiats períodes més llargs d'incubació amb el sèrum.

Per determinar si l'efecte del sèrum sobre la neurotransmissió evocada era efectivament degut al component IgM monoclonal del sèrum nadiu del pacient, es van realitzar experiments amb el sèrum del pacient sense IgM (titulació de IgM anti-GM2 1:80), on es va veure que no hi havia canvis significatius en el contingut quàntic (percentatge de canvi: $1.69 \% \pm 4.97$, $p > 0.05$, $n = 3$ músculs, mínim de 15 fibres per múscul; Figura 21D). Pel contrari, en experiments amb els anticossos IgM purificats del sèrum del pacient (titulació de les IgM anti-GM2 en el bany: 1:16000) es va produir la reducció de la neurotransmissió; amb un percentatge de bloqueig del contingut quàntic del $40.50 \% \pm 3.22$ ($p < 0.005$, $n = 3$ músculs, 15 fibres per múscul; Figura 21D). Per avaluar la participació del complement en els efectes produïts per les IgM del nostre pacient, i donat que a la literatura es troben estudis que el relacionen amb l'efecte produït per anticossos anti-GQ1b de malalts amb MFS (veure per exemple Plomp i cols., 1999); es van realitzar experiments amb el sèrum del nostre pacient exposat a calor ($56\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 30 min) per inactivar el complement. Els paràmetres de l'alliberament evocat utilitzant sèrum del pacient amb el complement inactiu van ser els mateixos que en els experiments amb el sèrum nadiu o amb les IgM purificades ($p > 0.05$, $n = 3$ músculs, mínim de 15 fibres per múscul; Figura 21D). Per tant, podem dir que el complement no col·labora en provocar el bloqueig de la neurotransmissió evocada en els nostres estudis.

Es pot concloure que l'addició del sèrum (i especialment, el component monoclonal IgM) del nostre pacient bloqueja la resposta evocada del nervi tant en el contingut quàntic com en l'amplitud dels EPPs d'una manera reversible. Aquest efecte no depèn del temps d'incubació amb el sèrum, i no modifica la latència ni el temps de pujada dels EPPs. Aquest bloqueig de l'activitat evocada tampoc depèn de la presència o absència de complement humà.

4.3.2.- Neurotransmissió espontània en el diafragma de ratolí adult normal

En un bloqueig de la neurotransmissió en que estan implicats anticossos es raonable sospitar que es donin lesions de la membrana axonal, que es produeixi un pèrdua de les vesícules sinàptiques i que aquest sigui el mecanisme que acabi provocant el bloqueig. Tot i que el mecanisme íntim de la neurotransmissió espontània és diferent al de la evocada, el seu estudi ens podia confirmar si teníem o no lesió de l'axolema en els nostres experiments.

Igual que amb la neurotransmissió evocada, en primer lloc es va estudiar l'efecte del sèrum sobre la neurotransmissió espontània en fibres úniques. En la Figura 22A-esquerra es mostra l'increment en la freqüència d'aparició dels potencials d'alliberament espontani del neurotransmissor (en forma de MEPPs), en una mateixa fibra muscular, produït per l'addició del sèrum (dilució 1:9 i titulació IgM 1:16000) en el bany. Aquest increment va ser progressiu durant els 60 minuts que va durar el registre.

En la Figura 22A-dreta es pot veure un exemple de registre abans (a) i després d'1 h (b) d'afegir el sèrum. En aquest exemple s'aprecia l'increment en la freqüència dels MEPPs

per l'addició del sèrum del pacient. En aquests mateixos experiments també es va veure que no es va produir una variació ni en el temps de pujada ni en el potencial de membrana de la fibra muscular (percentatge de variació: $7.25\% \pm 1.95$ i $1.01\% \pm 0.09$ respectivament) per l'addició del sèrum.

Figura 22. Efecte del sèrum sobre els potencials de placa en miniatura (MEPPs).

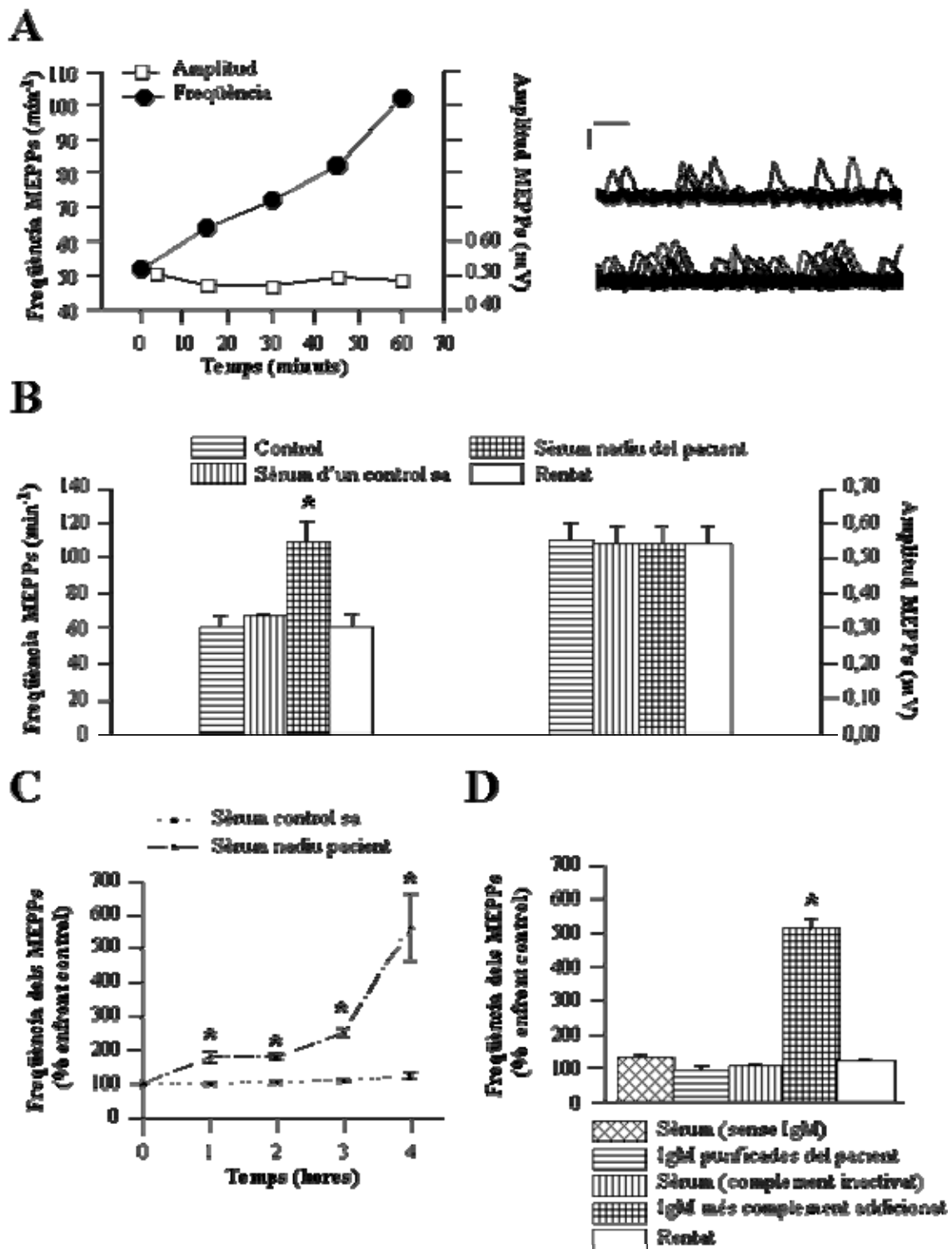


Figura 22. Efecte del sèrum sobre els potencials de placa en miniatura (MEPPs). **A**, esquerra: seqüència temporal de l'efecte del sèrum en l'amplitud (\square) i en la freqüència (\min^{-1}) (\bullet) dels MEPPs de la mateixa unió neuromuscular. El sèrum va ser addicionat al bany a temps 0. **A**, dreta: registres electrofisiològics representatius superposats dels MEPPs espontanis per la mateixa unió neuromuscular abans (dalt) i després (sota) de 60 minuts de l'addició del sèrum. Durant els registres, el potencial de repòs va caure 4 mV. Escala, vertical: 0.4 mV i horitzontal: 10 ms. Les unions neuromusculars representades a l'esquerra i a la dreta van ser diferents. **B**, efecte del sèrum en la freqüència dels MEPPs (esquerra) i en l'amplitud (dreta). Els MEPPs van incrementar a les 2 h d'incubació amb el sèrum i es van recuperar completament després d'un intens rentat amb Ringer normal (3.4 ml min^{-1} durant 1 h, 200 ml en total). L'amplitud dels MEPPs no va variar. Els músculs per cada grup d'experiments van ser diferents. **C**, la freqüència dels MEPPs va canviar induïda pel sèrum després de varies hores d'incubació. Cada punt representa el percentatge de variació respecte als valors control. En alguns punts, el marge SEM és dins dels símbols. Els músculs pels experiments controls i pels experiments amb el sèrum del pacient van ser diferents. **D**, histograma de la freqüència dels MEPPs en diferents situacions: sèrum del pacient sense IgM anti-GM2 (títol dels anticossos 1:80); anticossos IgM purificats del sèrum del pacient (títol 1:80000); sèrum nadiu del pacient on el complement va ser inactivat amb calor ($56 \text{ }^\circ\text{C}$ durant 30 min) i IgM purificades on es va addicionar 3 unitats de complement humà que hemolitzaven el 50 % (CH_{50} sèrum humà complert). L'acció del complement va ser revertida completament després d'un intens rentat amb Ringer normal (3.4 ml min^{-1} durant 1 h). Cada barra de l'histograma és el percentatge respecte als valors control. Els músculs per cada grup d'experiments van ser diferents. En cada cas, $n = 3$ músculs per grup i un mínim de 15 fibres per múscul. * $p < 0.05$ respecte als controls.

L'efecte agut del sèrum sobre la neurotransmissió espontània en les sinapsis neuromusculars del diafragma de ratolí va ser incrementar la freqüència dels MEPPs en un $80.54 \% \pm 15.67$ ($p < 0.005$, $n = 3$ músculs, mínim 15 fibres per múscul). Aquest fenomen va ser reversible en un $98.82 \% \pm 5.43$ després d'un rentat amb Ringer ($n = 3$ músculs, mínim 15 fibres per múscul; Figura 22B-esquerra). Amb aquesta reversibilitat dels efectes, es va descartar la possibilitat que l'increment fos causat per problemes tècnics i confirmava, en part, que la integritat de l'axolema no es veia afectada per la incubació del sèrum.

L'amplitud dels MEPPs no va variar en cap dels experiments (percentatge de variació:

12.44 % \pm 1.98; n = 6 músculs, mínim de 15 fibres per múscul; Figures 22A i 22B-dreta). Que l'amplitud dels MEPPs no es modifiqués ens va indicar que l'efecte del sèrum no tenia repercussions postsinàptiques, com ja s'havia vist amb les tècniques immunohistològiques on tampoc es va detectar al gangliòsid GM2 en aquest compartiment de la unió neuromuscular.

Pel mateix motiu que amb la neurotransmissió evocada, es va fer un seguiment de l'efecte del sèrum sobre la neurotransmissió espontània després d'hores d'incubació. A la Figura 22C es mostra que, després de diverses hores d'incubació amb el sèrum, la freqüència dels MEPPs espontanis va anar augmentant a mesura que anava passant el temps. Per tant, l'efecte del sèrum del nostre pacient sobre la freqüència dels MEPPs depèn del temps d'incubació transcorregut (percentatge d'increment: 81.45 % \pm 9.54 a les 2 h, 152.69 % \pm 10.67 a les 3 h i 460.22 % \pm 96.87 a les 4 h; p < 0.05 en tots els casos comparant amb els valors control; n = 3 músculs, mínim de 45 fibres en cada període). En aquests experiments també es va utilitzar el sèrum de subjectes sans com a control, i com es pot apreciar aquest sèrum normal no va incrementar la freqüència dels MEPPs després de 4 h d'incubació (24.21 % \pm 10.32, p > 0.05; n = 3 músculs, mínim de 45 fibres en cada període; Figura 22C). Amb aquest estudi es va descartar que els anticossos anti-gangliòsids poguessin buidar el terminal nerviós de vesícules sinàptiques com s'ha descrit en altres treballs (Bullens i cols., 2000; O'Hanlon i cols., 2001), donat que la freqüència en l'alliberament del neurotransmissor espontani en els nostres experiments va anar augmentant progressivament amb la incubació del sèrum del nostre pacient.

Amb la intenció de saber si l'efecte del sèrum sobre la neurotransmissió espontània depenia efectivament del seu component monoclonal, es van dur a terme estudis similars als fets amb la neurotransmissió evocada amb el sèrum sense IgM i les IgM purificades. Es va trobar que, com era d'esperar, el sèrum sense IgM no va variar significativament la freqüència dels MEPPs (percentatge de canvi: $27.20 \% \pm 6.12$, $p > 0.05$, $n = 3$ músculs, mínim de 15 fibres per múscul; Figura 22D) i, contràriament al que va succeir amb l'alliberament evocat del neurotransmissor, les IgM purificades no van incrementar per si mateixes la freqüència dels MEPPs ($10.23 \% \pm 3.89$, $p > 0.05$, $n = 3$ músculs, mínim de 15 fibres per múscul; Figura 22D). Es va comprovar que el complement humà era necessari per produir alguna alteració donat que, el sèrum on s'havia inactivat el complement va ser ineficaç per alterar la neurotransmissió espontània ($2.78 \% \pm 2.33$, $n = 3$, mínim de 15 fibres per múscul; Figura 22D). Quan es va afegir complement humà a les preparacions neuromusculars (sèrum humà amb el complement complet de Sigma, 3 unitats per una hemòlisi del 50 % o CH_{50}) després d'una incubació prèvia amb IgM purificades (1 h, sense alteració dels MEPPs), la freqüència dels MEPPs va incrementar dràsticament ($510.38 \% \pm 31.89$, 1 h després de l'addició del complement, $n = 3$ músculs, mínim de 15 fibres per múscul; Figura 22D). Malgrat l'espectacularitat, aquest efecte va ser revertit en un $91.49 \% \pm 6.13$ (després d'1 h de rentat amb 100 ml Ringer, $n = 3$ múscul, mínim de 15 fibres per múscul; Figura 22D); descartant, igual que amb els experiments anteriors, la possibilitat de tenir problemes tècnics o que el terminal nerviós estigués danyat (almenys en el temps d'incubació que nosaltres analitzem).

En resum, el sèrum (dilució 1:9) del nostre pacient va incrementar la freqüència espontània dels MEPPs però no va tenir cap efecte en l'amplitud d'aquests. Aquest

fenomen va ser reversible i dependent del temps d'incubació. No obstant, contràriament a l'efecte de les IgM en l'alliberament evocat del neurotransmissor, l'increment en la freqüència dels MEPPs provocat per les IgM aïllades va necessitar complement humà per reproduir els mateixos efectes que el sèrum.

4.3.3.- Relació entre els gangliòsids i els canals de calci

Donat que un dels primers passos en la neurotransmissió és l'entrada de calci a l'axó, vam testar la hipòtesi de si l'acció fisiològica dels gangliòsids pot involucrar aquests canals. A més, a la literatura es troben treballs que relacionen els gangliòsids amb els canals de calci (Carlson i cols., 1994; Tanaka i cols., 1997; Quattrini i cols., 2001). Per tant, es van fer experiments amb el blocador específic pel canal de calci depenent de voltatge (VDCC) tipus P/Q, perquè és el canal de calci implicat en la neurotransmissió de les unions neuromusculars de mamífers adults (Uchitel i cols., 1992).

Es va trobar que, si el múscul era preincubat amb el blocador específic del canal de calci tipus P/Q, ω -Agatoxina-IVA (1 h; 100 nM), l'efecte del sèrum del nostre pacient sobre la neurotransmissió evocada era inhibit completament (percentatge de canvi: $4.25 \% \pm 2.40$, $p > 0.05$, $n = 3$ músculs, mínim de 15 fibres per múscul; Figura 23).

D'igual manera que amb la neurotransmissió evocada, es va voler veure si l'efecte del sèrum sobre la neurotransmissió espontània era inhibit per la incubació prèvia amb el blocador específic del canal de calci tipus P/Q. Així, una preincubació de la mostra amb ω -Agatoxina-IVA (1 h; 100 nM) va eliminar l'increment en la freqüència dels MEPPs produït per la incubació de sèrum nadiu del pacient (percentatge de canvi: $19.40 \% \pm 3.47$, $p > 0.05$, $n = 3$ músculs, mínim de 15 fibres per múscul; Figura 23). En

experiments controls, la ω -Agatoxina-IVA (1 h; 100 nM) no va induir cap canvi per ella mateixa en cap dels paràmetres de la neurotransmissió espontània com ja ha estat descrit àmpliament a la literatura (veure per exemple Losavio i Muchnik, 1997), eliminant la possibilitat de fallides tècniques o alteració del mecanisme postsinàptic provocats per la pròpia droga.

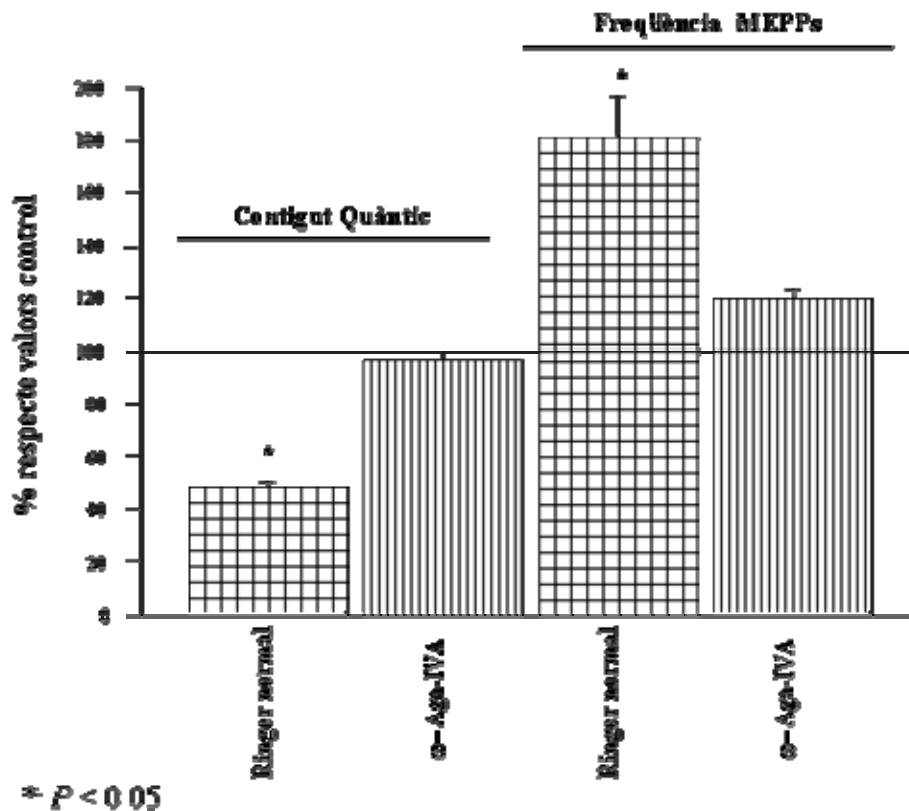


Figura 23. Efecte produït per la preincubació amb el blocador específic de canal de calci tipus P, ω -Agatoxina-IVA (1 h; 100 nM), sobre les unions neuromusculars de ratolí adult tant a nivell d'EPPs com de MEPPs. Les incubacions prèvies amb el blocador del canal tipus P van inhibir els efectes del sèrum tant a nivell de neurotransmissió evocada com de neurotransmissió espontània. Les barres de l'histograma representen el percentatge respecte als valors control. Els músculs per cada grup d'experiments van ser diferents. En tots els casos, n = 3 músculs per grup i un mínim de 15 fibres per múscul. * p < 0.05 respecte als controls.

En resum, incubacions prèvies amb el blocador específic pel canal de calci tipus P/Q, ω -Agatoxina-IVA, van inhibir els efectes del sèrum tant a nivell de la neurotransmissió evocada com de la neurotransmissió espontània. Per tant, podem dir que en condicions normals els gangliòsids estan involucrats en la neurotransmissió a través del canal de calci tipus P.

Com a conclusió dels estudis aguts podríem afirmar que, el sèrum del nostre pacient conté un factor monoclonal IgM anti-[GalNAc β 1-4Gal(3-2 α NeuAc) β 1-] reactiu que, en un període experimental curt, causa dos efectes clars en les unions neuromusculars *in vitro*: el primer, redueix directament la neurotransmissió evocada i, el segon, indueix un increment de la neurotransmissió espontània que depèn del complement. A més a més, aquests efectes involucren clarament el canal de calci depenent de voltatge tipus P/Q.

4.4.- Efecte de l'aplicació crònica de les IgM monoclonals sobre el múscul LAL de ratolins adults

Un cop comprovats els efectes aguts que ocasionava el sèrum i les IgM del pacient sobre les unions neuromusculars (NMJs) de ratolí adult, i donat que el quadre clínic associat al component mIgM que presentava el pacient era de curs crònic, ens vam plantejar estudiar els efectes estructurals i electrofisiològics d'un contacte prolongat dels anticossos anti-GM2 sobre les sinapsis neuromusculars d'un múscul esquelètic i veure si aquests efectes podien ser semblants als que havia desenvolupat el malalt.

Previ a fer el model animal i havent triat com a múscul d'estudi el múscul LAL donat les seves característiques ja explicades (Material i Mètodes, apartat 7.2.2), es van realitzar experiments electrofisiològics per veure la correspondència entre la dilució de les IgM en el diafragma i la seva equivalent en el LAL. En la Figura 24 es pot veure que la dilució 1/9 de les IgM (titulació 1:16000) en el diafragma equival a una dilució 1/18 en el LAL (titulació de IgM > 1:8000), donat que provocaven el mateix efecte sobre el contingut quàntic en preparacions *in vitro*. Per tant, en els experiments crònics es van injectar les mIgM en el múscul LAL de ratolins adults amb una titulació de 1/10000 per prudència.

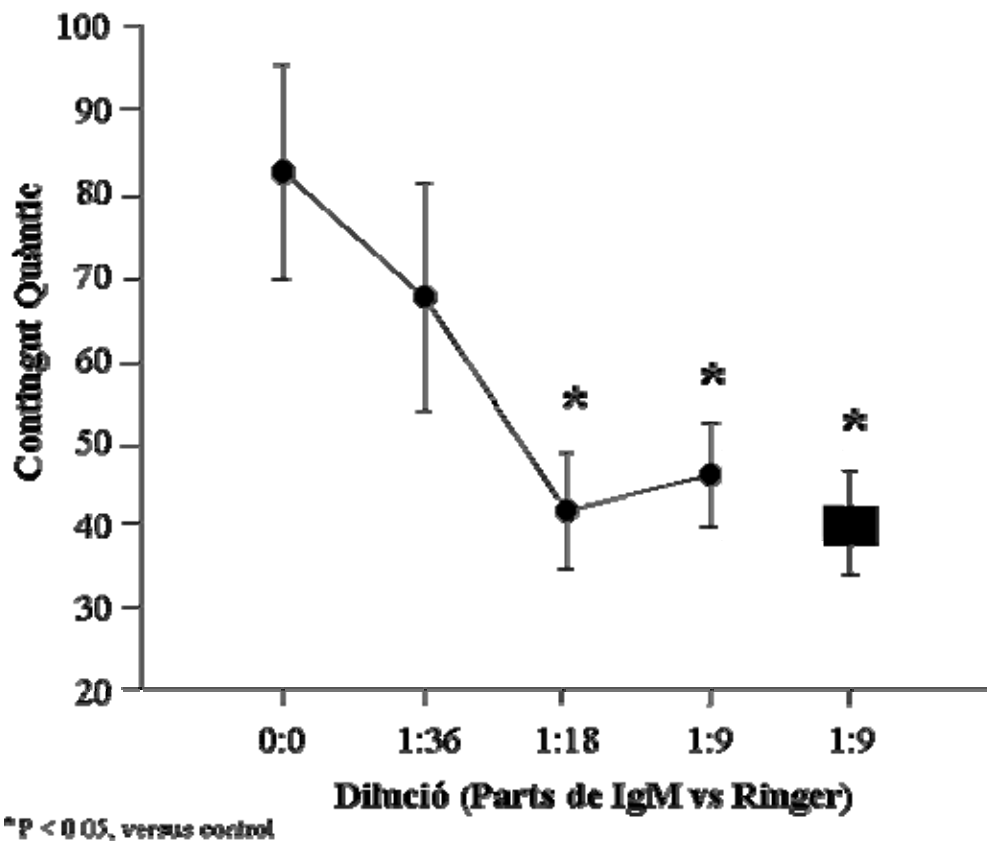


Figura 24: Gràfica que mostra la correspondència entre la dilució de les mIgM en el diafragma i en el LAL. Les IgM en els estudis aguts eren utilitzades amb una dilució de 1/9 (titulació de 1/16000) en el diafragma (■), aquesta dilució correspon a 1/18 en el LAL (●) i una titulació de 1/8000.

4.4.1.- Estudis preliminars

Com ja em comentat, es van realitzar una sèrie de controls juntament amb els animals tractats amb les mIgM actives per comparar els resultats (veure Taula 2). Els animals que van rebre 7 injeccions s.c. de solució Ringer (50 µl), una cada 48 hores durant 15 dies (Controls II), no van mostrar canvis en l'alliberament del neurotransmissor (veure més endavant) ni cap lesió histopatològica (canvis inflamatoris com infiltració leucocitària, cèl·lules necròtiques, hiperhemia o proliferació de fibroblasts) en el múscul LAL. Tampoc es va veure cap diferència entre els músculs dels animals utilitzats com a Control II i els músculs d'animals no tractats (o Control I).

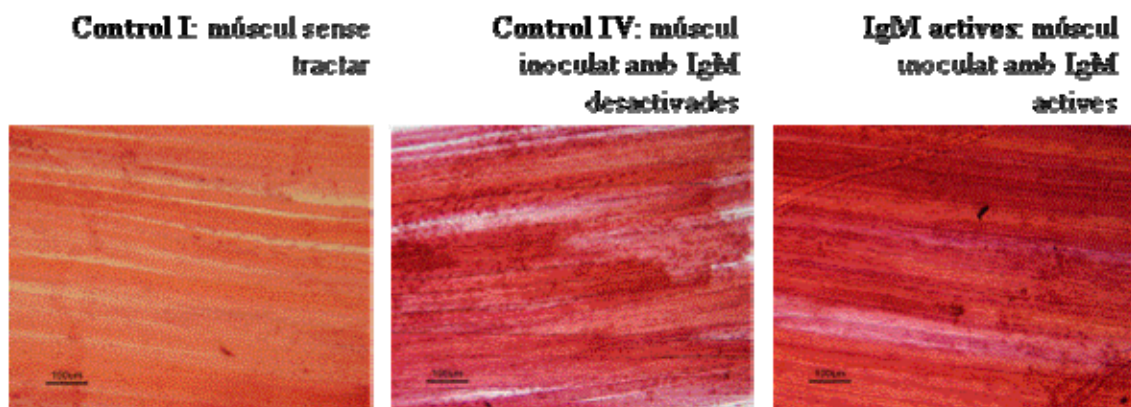


Figura 25. Tinció d'hematoxilina-eosina en diferents músculs LAL. No s'observa cap canvi histològic entre els músculs Control I, Control IV o músculs que han estat injectats amb mIgM actives. Únicament s'aprecia una petita reacció inflamatòria en el perimisi dels músculs que han estat inoculats amb mIgM tant actives com inactives. Escala 100 µm.

En experiments preliminars es va trobar que les injeccions repetitives s.c. de Ringer que contenia les IgM monoclonals (títol 1/10000, ja siguin inactives o no), produïen reaccions inflamatòries en el perimisi del LAL (veure Figura 25). En conseqüència, en tots els experiments on s'injectaven les mIgM (tant els animals Control IV com els tractats amb IgM actives) es va intentar suprimir o reduir aquesta inflamació moderada (infiltració leucocitària) amb un tractament simultani amb un glucocorticoid (6-metilprednisolona; 2 mg/ml). Els animals tractats rebien una injecció i.p. del corticoid un dia abans i durant els tres primers dies del període d'aplicació de les injeccions s.c. de mIgM. Com a control per tots els músculs tractats amb les mIgM es va fer un control on els animals es tractaven únicament amb l'antiinflamatori (Control III) per veure l'efecte que aquest provocava sobre les unions neuromusculars. En aquesta sèrie d'experiments controls no es va observar cap canvi ni histològic ni electrofisiològic (veure més endavant i la Taula 4 per les dades electrofisiològiques) entre els músculs dels animals Control I i els dels Control III.

4.4.2.- Canvis morfològics per l'aplicació crònica de les mIgM

4.4.2.1.- En les unions neuromusculars

Diferents estudis mostren que el bloqueig de la neurotransmissió provoca canvis plàstics en les unions neuromusculars (NMJs) (per exemple (Santafe i cols., 2000) i tenint en compte que les IgM del pacient provocaven bloqueigs de la neurotransmissió *in vitro*, es van realitzar estudis morfològics en les sinapsis neuromusculars dels diferents músculs que entren en el nostre estudi per veure si les IgM provocaven alguna alteració estructural. Com a precedent, en estudis anteriors de la nostra unitat es van observar que en músculs normals d'animals adults hi havia un 3 % de les sinapsis neuromusculars

amb creixements de noves branques axonals o rebrots terminals (*sprouts*), indicant l'existència de plasticitat sinàptica o remodelament en l'adult (Tomas i cols., 1989 i 2000).

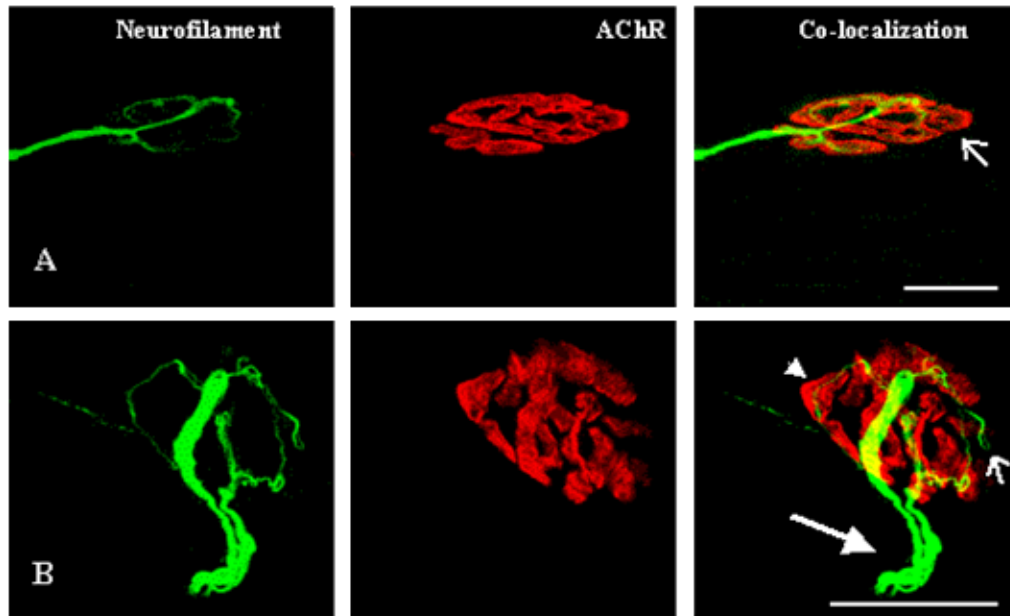


Figura 26. Alteracions en les estructures neuromusculars en músculs crònicament tractats amb mIgM actives. Les mIgM anti-GM2 indueixen retraccions i creixement dels terminals nerviosos. Els axons terminals van ser tenyits amb anticossos anti-neurofilament 200 KDa i els *clusters* d'AChRs amb α -BgTx-Rho. En **A**, s'observen retraccions del terminal nerviós com soles postsinàptics marcats amb α -BgTx-Rho no ocupats per axó (fletxa). En **B**, els rebrots axonals (o *sprouts*) estan morfològicament definits com a projeccions fines d'axons terminals, amb o sense con de creixement en la seva punta, immunomarcats per la proteïna del neurofilament 200 KDa i sense una marca homòloga postsinàptica pels AChR (fletxa petita). Els *sprouts* es localitzen principalment en o al voltant de les plaques motores originals. Únicament es van veure un petit nombre de *sprouts* ultraterminals que es projecten cap les cèl·lules musculars veïnes (el *sprout* a mà esquerra de la imatge). Terminals axonals filiformes semblats a *sprouts* poden ocupar parcialment un lloc ric en AChR amb una mida diferent a la del *sprout* (cap de fletxa). Amb certa freqüència s'observen *sprouts* col·laterals en troncs nerviosos intramusculars que resulta una poliinervació aparent d'una NMJ (fletxa més gran). S'han estudiat un mínim de 300 NMJs per cada grup d'experiments. Escala, 10 μ m.

Per l'aplicació crònica de les mIgM actives apareixen signes importants de remodelament de les NMJs com rebrots i/o retraccions axonals (Figura 26A i B). Els rebrots o *sprouts* terminals els identifiquem com a marques immunofluorescents pel neurofilament 200 KDa molt primes, amb o sense un con de creixement en el seu extrem, sense una marca postsinàptica pels AChR al seu voltant (Figura 26B, fletxa). En els nostres estudis es va trobar que un 28 % de les sinapsis dels músculs tractats amb mIgM actives mostraven *sprouts* ($p < 0.05$ respecte al Control IV on només es va trobar un 4 %). En general, els *sprouts* es localitzaven ben a prop de la placa motora original, únicament es va trobar un petit nombre de rebrots o *sprouts* ultraterminals projectats cap a les cèl·lules musculars veïnes (*sprout* a l'esquerra de la Figura 26B). Per altra banda, es van observar retraccions del terminal nerviós com *clusters* o agrupaments d'AChR postsinàptiques tenyides amb bugarotoxina rodaminada no ocupades per axons (no es detectava marca del neurofilament 200 KDa; Figura 26A, fletxa). Es va comptabilitzar que un 43 % de les unions dels músculs tractats amb mIgM actives tenien retraccions ($p < 0.05$ respecte al Control IV, 4 %). A més a més, es va veure que un 25 % de les NMJs d'aquests músculs mostraven canvis de creixement i retracció simultàniament. En la Taula 3 es mostren els valors d'aquests experiments.

No es van trobar diferències en el percentatge d'unions neuromusculars que mostraven canvis de remodelament i/o creixement axonal entre tots els controls (I, II, III i IV; més o menys un 3 % de creixement d'axons terminals en els animals adults normals, com ja hem mencionat anteriorment).

	<i>sprouts</i>	retraccions	Ambdós
músculs amb IgM actives	27.89 % \pm 5.4	43.03 % \pm 4.4	25.38 % \pm 3.2
músculs amb IgM inactives	4.4 % \pm 1.7	4.2 % \pm 1.3	-----

Taula 3. Canvis morfològics en les unions neuromusculars. Percentatge de sinapsis amb *sprouts*, retraccions i canvis de creixement i retraccions simultàniament, tant en músculs tractats amb mIgM actives com amb mIgM inactives.

Amb certa freqüència, en les sinapsis dels músculs tractats amb mIgM actives també es van observar que terminals axonals filiformes semblats a *sprouts* podien ocupar parcialment un lloc ric en AChR amb una mida diferent a la dels *sprouts* (Figura 26B, cap de fletxa). Això podria indicar la reocupació d'un lloc postsinàptic prèviament vacant. Un altre fet freqüent va ser que es veien *sprouts* col·laterals de troncs nerviosos intramusculars (rebrotos que neixen de l'últim node de Ranvier o heminode i que van a parar a la mateixa sinapsi) que es podien confondre amb multiinervació de la mateixa sinapsi, com en la mateixa Figura 26B (fletxa més gran); però amb els estudis electrofisiològics es va descartar la poliinnervació (veure la secció d'electrofisiologia més endavant).

En les NMJs de ratolins tractats amb les IgM actives del nostre estudi no es van trobar dipòsits del component terminal del complement (C5b-9 o MAC: *Membrane Attack Complex*) (Figura 27A). Aquesta dada indica que, en el nostre estudi, els canvis morfològics comentats no van estar provocats per la destrucció de la membrana axonal per l'activació del complement de ratolí. Pel contrari, quan es va aplicar les IgM actives del nostre pacient i complement humà (Sigma) al LAL si que es va trobar marca pel component terminal del complement (C5b-9 o MAC), en la mateixa zona que havíem trobat per les mIgM; marca presinàptica en la unió neuromuscular (Figura 27B).

A diferència del present estudi, l'activació del complement és el mecanisme responsable dels efectes morfològics i electrofisiològics trobats en altres estudis (Bullens i cols., 2000; O'Hanlon i cols., 2001 i 2003; Halstead i cols., 2004; Bullens i cols., 2005; Halstead i cols., 2005a; Willison, 2005 i 2006). En la Figura 27A podem veure que no es va detectar marca immunohistoquímica de la fracció C5b-9 de ratolí en les sinapsis neuromusculars de ratolins tractats amb les IgM actives.

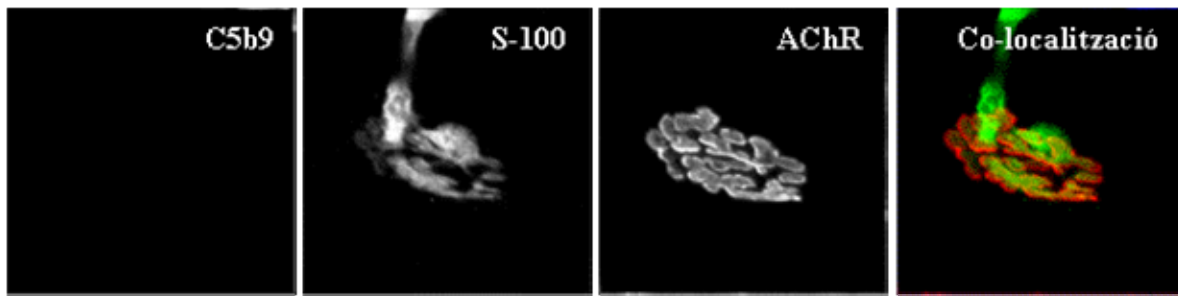


Figura 27A. Immunofluorescència confocal negativa per l'anticòs anti-C5b-9 en NMJ de ratolins tractats. Manca de localització de dipòsits del component C5b-9 del complement en les sinapsis neuromuscular de ratolins punxats amb mIgM, i marcades amb anti-S-100 (marca la cèl·lula de Schwann i BgTX (marca els AChR). Escala 10 µm.

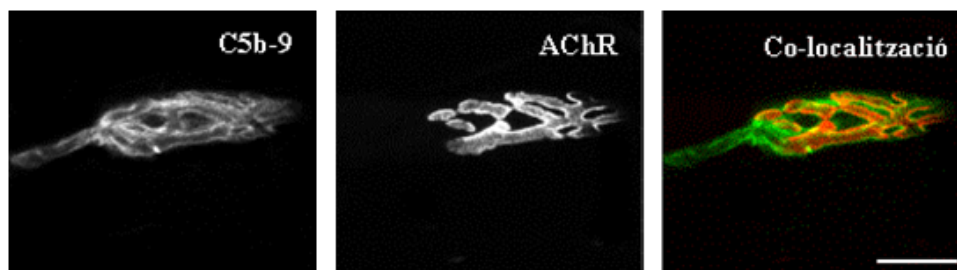


Figura 27B. Immunofluorescència confocal per l'anticòs anti-C5b-9 en NMJ de ratolins tractats amb IgM i complement humà. Localització del component C5b-9 del complement i BgTX (marca pels AChR), en les sinapsis neuromuscular de ratolins punxats amb mIgM actives i complement humà. Escala 10 µm.

4.4.2.2.- En els nervis intramusculars

Donat el precedent de malaltia desmielinitzant del pacient vam voler estudiar la ultraestructura dels nervis que innervaven els músculs tractats amb les mIgM.

A nivell de microscopi electrònic, es va trobar algunes alteracions en la mielina dels nervis intramusculars. En la Figura 28 es mostra una imatge típica de la mielina normal dels animals Control IV (esquerra) i una altra imatge de la mielina dels músculs exposats a les mIgM actives (dreta) mostrant, aquesta última, signes clars de

desorganització mielínica. En els nervis dels músculs tractats amb IgM actives moltes àrees mostren pèrdues del embolcall axonal de les cèl·lules de Schwann, aquest procés va ser observats en un $91.27 \% \pm 3.39$ dels axons mielinitzats d'aquests músculs. Pel contrari, en els nervis del Control IV (animals tractats amb les IgM desnaturalitzades) es va observar una pèrdua ocasional dels embolcalls de les cèl·lules glials únicament en un $28.53 \% \pm 2.56$ ($p < 0.05$) dels axons mielinitzats. A més, el nombre d'embolcalls de la cèl·lula de Schwann al voltant de l'axó (contades com la mitja del nombre periòdic de les línies de densitat major) és significativament inferior en els nervis dels músculs tractats amb mIgM actives (35.18 ± 0.56) que en els nervis del Control IV (40.23 ± 0.82 ; $p < 0.05$).

Tot i amb això, aquests canvis no van anar acompanyats per una alteració significativa de la velocitat de conducció (veure apartat següent).

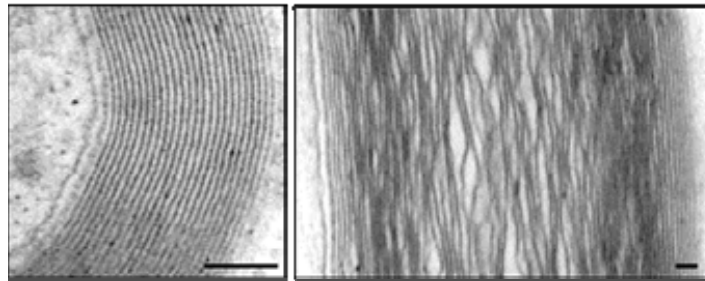


Figura 28. Microscopia electrònica dels nervis intramusculars que van a innervar al múscul LAL. La microscopia electrònica mostra una imatge normal de la beina de mielina en els animals Control IV (esquerra; magnificació inicial:10.000X) i en els animals exposats a les mIgM actives (dreta; magnificació inicial: 8.000X). La barra indica 100 nm.

Amb els estudis morfològics es va trobar que en les músculs tractats amb les mIgM actives hi havia retraccions i/o creixement axonals en moltes unions neuromusculars, a més de clars signes de desorganització de les beines de mielina. Aquest canvis no van

involucrar l'activació del complement, pel que hem de suposar que no són deguts a la lesió del terminal motor.

4.4.3.- Neurografies motores

Es van realitzar estudis de conducció nerviosa en els músculs LAL d'animals control i d'animals tractats amb les mIgM actives, per veure si els anticossos anti-GM2 del nostre pacient provocaven algun tipus d'alteració funcional de la porció més distal del nervi. Es va pensar que podríem trobar alteracions en la conducció nerviosa degut a que: 1) les neuropaties relacionades amb anticossos anti-gangliòsid IgM mostren en molts casos dades de desmielinització, 2) el nostre pacient també mostrava trets desmielinitzants en els estudis electrofisiològics clínics, 3) determinats estudis han demostrat l'aparició de bloqueigs de conducció provocats per la transferència passiva d'anticossos anti-gangliòsid de diferents pacients a nervis de rata (Santoro i cols., 1992; Uncini i cols., 1993), i 4) en els nostres estudis d'immunofluorescència de nervi es va trobar marca per GM2 en les cèl·lules de Schwann i en l'axó.

Amb els nostres estudis convencionals de neurografies motores (Figura 29) es va observar que l'amplitud del potencial d'acció muscular compost (CMAP) va ser significativament inferior en els músculs tractats amb mIgM actives ($1.48 \text{ mV} \pm 0.22$) que en els músculs dels Controls IV ($3.1 \text{ mV} \pm 0.35$; $p < 0.05$). No es va observar cap canvi ni en la latència dels CMAPs (sobre 4-5 mm) ni en la velocitat de conducció entre els diferents músculs tractats que poguéssim atribuir a problemes de desmielinització. A més a més, donat que en cap cas es va trobar una destrucció important de fibres musculars (Figura 25), la neurografia ens va indicar una moderada neuropatia axonal o

una malaltia de la unió neuromuscular. Les neurografies motores del pacient, al realitzar estímuls distals, van mostrar les mateixes característiques (Figura 4 de Material i Mètodes).

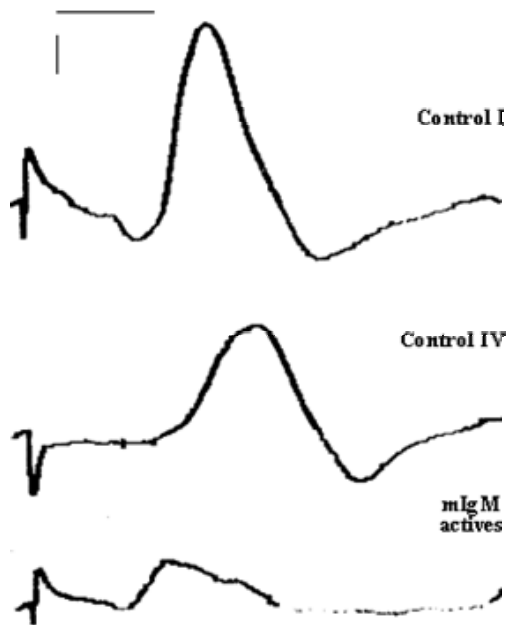


Figura 29. Neurografies motores dels músculs LALs. Les Neurografies motores convencionals mostren que l'amplitud del potencial d'acció muscular compost va ser significativament inferior ($p < 0.05$) en els músculs tractats amb mIgM actives ($1.48 \text{ mV} \pm 0.22$) que en els músculs dels Controls IV ($3.1 \text{ mV} \pm 0.35$). El Control I ($4.6 \text{ mV} \pm 0.7$) i IV no van ser diferents ($p > 0.05$). En canvi, no es van trobar canvis en la latència donat el curt trajecte del nervi d'aquest múscul (4-5 mm). Es van considerar cinc animals per cada grup d'experiments. Escala, horitzontal: 1 ms, vertical: 1.5 mV.

Per tant, la injecció crònica de les mIgM del pacient sobre el múscul LAL van provocar el mateix efecte que en el malalt: bloqueig de la conducció axonal que pot conduir a la debilitat muscular diagnosticada en el pacient.

4.4.4.- Registres intracel·lulars dels potencials sinàptics en unions neuromusculars de músculs LALs adults tractats amb les mIgM del pacient

Com ja em vist en els apartats anteriors, l'aplicació crònica de les mIgM del nostre pacient sobre la superfície del múscul LAL de ratolins adults provocava canvis en les unions neuromusculars d'aquests animals. Per comprovar si els canvis morfològics o de conducció afectaven a l'alliberament del neurotransmissor, es van realitzar experiments

d'electrofisiologia intracel·lular convencional tant en músculs tractats amb mIgM del pacient com en músculs control.

Analitzant els diferents músculs del nostre estudi es va trobar que el llindar de generació (els nervis eren estimulats amb un estímul d'intensitat creixent, de zero fins que s'observava un EPP) i la latència dels EPPs (lapsus de temps entre l'artefacte d'estímul i la base de l'EPP) no canviaven ni en els músculs control (I, II, III i IV) ni en els músculs dels animals tractats amb mIgM actives (la latència en els Controls IV va ser $1.83 \text{ ms} \pm 0.06$ i la latència en els músculs tractats amb mIgM actives va ser $1.85 \text{ ms} \pm 0.04$; $p > 0.05$). Aquest fet ens va indicar que no hi havia canvis en la conducció nerviosa provocats per les mIgM del nostre pacient (igual que havíem vist amb els estudis aguts d'incubació del sèrum).

En la Taula 4 es mostra la mitja dels valors de les freqüències i les amplituds dels MEPPs espontanis i del contingut quàntic de l'alliberament evocat del neurotransmissor en els diferents controls i en els músculs LAL tractats amb les mIgM actives. Quan es van comparar els valors dels controls no es van trobar diferències en cap dels paràmetres estudiats ($p > 0.05$). Una dada interessant es que no hi havia diferències significatives entre els Controls III, 16 dies després de l'inici del tractament amb corticoids (el mateix temps que s'estudia els efectes crònics de les mIgM), i els músculs controls que van rebre únicament injeccions s.c. de solució Ringer (Control II). Per tant, podem dir que l'antiinflamatori que es va afegir per reduir la reacció inflamatòria produïda per l'aplicació de les mIgM, no va provocar canvis en l'eficàcia sinàptica *in vivo* en les nostres preparacions neuromusculars dotze dies després de la cessió del tractament amb corticoids (el corticoid s'injectava i.p. al ratolí un dia abans i tres

després de l'inici del tractament amb els diferents controls o les mIgM actives, per tant; dotze dies després de la cessió del tractament amb corticoids). A més a més, es van realitzar experiments *in vitro* per avaluar un possible efecte agut dels corticoids en la transmissió sinàptica del LAL. L'aplicació directa de la 6-metilprednisolona en la camareta de registre electrofisiològic, a la mateixa concentració que les injeccions i.p. (2 mg/ml; 5.3 mM) durant un mínim d'1 h, no va provocar cap canvi ni en els potencials sinàptics espontanis ni en els evocats d'una preparació neuromuscular no tractada. El percentatge mig de canvi dels músculs tractats amb 6-metilprednisolona respecte a músculs tractats amb Ringer va ser: contingut quàntic, $4.25 \% \pm 1.12$; freqüència dels MEPPs, $7.85 \% \pm 1.46$; amplitud dels MEPPs, $5.88 \% \pm 1.91$; en tots els casos $p > 0.05$; $n = 3$ músculs.

	MEPP		EPP
	FREQÜÈNCIA	AMPLITUT	M
CONTROL-I	50.6 ± 4.15	0.96 ± 0.12	22.77 ± 0.33
COMTROL-II	48.60 ± 3.45	1.01 ± 0.18	20.93 ± 1.96
CONTROL-III	48.07 ± 3.27	1.15 ± 0.11	20.83 ± 1.18
CONTROL-IV	53.67 ± 3.65	1.01 ± 0.08	17.97 ± 0.87
IgM ACTIVES	58.86 ± 6.64	1.15 ± 0.14	$6.45 \pm 1.17^*$

Taula 4. Valors de MEPPs i EPPs en els diferents experiments controls i en els músculs LAL tractats amb mIgM. El contingut quàntic (M) es va obtenir amb experiments d'electrofisiologia d'alliberament evocat duts a terme en alt Mg^{2+} (4.5 mM). La mitja de la freqüència dels MEPPs es va avaluar considerant períodes de 1 minut i la seva amplitud mitja (mV) va ser calculada per fibra i corregida assumint un potencial de membrana de -80 mV. No hi havia diferències entre el Control II i els músculs d'animals no tractats ($p > 0.05$). En els animals tractats amb mIgM actives, els valors del contingut quàntic (M) (marcat amb un asterisc) va ser significativament diferent ($p < 0.05$) respecte als M en tots els controls. $N = 3$ músculs pels estudis dels MEPPs i 5 músculs pels estudis de contingut quàntic. Mínim de 15 fibres per múscul en tots els casos.

En la Taula 4 també es pot observar que les mIgM inactives (tractades amb calor) no van poder modificar la neurotransmissió, donat que no hi havia diferències entre els músculs dels Control IV i els dels altres controls. En canvi, com es pot apreciar en la mateixa taula, únicament en els animals tractats amb mIgM actives va haver canvis en l'alliberament evocat del neurotransmissor respecte a tots els controls. Respecte al Control IV, el contingut quàntic dels músculs tractats amb les mIgM actives estava significativament reduït (més d'un 50 %; $p < 0.05$).

Pel que fa a la neurotransmissió espontània, no es va trobar cap modificació significativa ni en la freqüència ni en l'amplitud dels MEPPs ($p > 0.05$) entre aquests dos grups de músculs (Control IV i músculs tractats amb mIgM actives). El fet que l'amplitud dels MEPPs no varies anava en concordança amb els estudis d'electrofisiologia aguts i d'immunohistoquímica previs, on es va veure que no hi havia una interacció de les mIgM anti-GM2 amb el component postsinàptic de la unió neuromuscular. Que la freqüència dels MEPPs tampoc es modifiqués té relació amb els estudis d'electrofisiologia aguts on les IgM aïllades van necessitar el complement humà per donar un augment de la neurotransmissió espontània (en els experiments crònics únicament inoculem les IgM aïllades sense afegir complement humà i aquestes IgM no són capaces d'activar el complement del propi ratolí; Figura 27).

Una altra dada a destacar va ser que, quan es buscaven les sinapsis poliinnervades que suggerien les observacions morfològiques (veure Figura 26B, fletxa grossa), únicament es van observar més d'un EPP en menys del 1 % de les sinapsis. Quan una fibra muscular era inserida per l'elèctrode de registre, el nervi era estimulat amb una intensitat creixent de zero fins a que un EPP era observat. Si la mida i latència de l'EPP no variaven a mesura que s'augmentava l'estímul de dispar, es conclouia que la placa

motora estava monoinnervada. En les sinapsis amb innervació polineural, l'augment de la intensitat de l'estímul de dispar causa el reclutament d'un o més axons, el que produeix un increment progressiu en l'EPP i el reclutament de nous EPPs (Redfern, 1970; Santafe i cols., 2001; 2002 i 2004). En tots els músculs (controls i tractats amb mIgM actives) la poliinnervació de les plaques motores va ser inferior al 1 %. Per tant, la mutiinnervació aparent d'algunes sinapsis, vista en els estudis morfològics, pot ser interpretada com a creixements col·laterals en el tronc nerviós intramusculars amb el mateix llindar de dispar i latència que l'axó pare.

En resum, l'alteració persistent de les funcions del gangliòsid GM2 per l'aplicació d'anticossos mIgM específics provoca canvis significatius en l'alliberament evocat del neurotransmissor en la sinapsi neuromuscular del múscul LAL de ratolins adults, sense provocar canvis en la neurotransmissió espontània, en la latència o en el nivell de poliinnervació de les sinapsis neuromusculars.

4.4.5.- Canals de calci en les unions neuromusculars tractades

4.4.5.1.- Estudis funcionals

En els músculs LAL d'un animal adult normal, únicament el blocador específic pel canal de calci dependent de voltatge (VDCC) tipus P/Q, ω -Agatoxina-IVA o ω -Aga-IVA, pot reduir l'alliberament del neurotransmissor. Els blocadors pels canals tipus N ω -Conotoxina-GVIA (ω -CgTX-GVIA) i tipus L (nitrendipina) no provoquen cap canvi sobre la neurotransmissió. Això ens indica que únicament el VDCC tipus P/Q està implicat en l'alliberament del neurotransmissor en aquestes sinapsis madures (Uchitel i cols., 1992). Com ja em comentat en la introducció (apartat 1.2.2), en unions

neuromusculars de baixa neurotransmissió com ara de nadons, dennervats i unions bloquejades per alguna toxina (toxina botulínica) estan implicats més d'un canal de calci, a més del canal P/Q, en l'alliberament del neurotransmissor. En el cas dels nadons s'ha descrit la participació dels canals de calci tipus N i tipus L, donat que els seus blocadors estan involucrats en la neurotransmissió (Rosato Siri i Uchitel, 1999; Santafe i cols., 2001). Pel que fa als reinnervats el canal adicional és el canal L (Katz i cols., 1996) i en el cas d'unions que han estat bloquejades per l'addició de toxina botulínica els canals adicionales són el L i el N (Santafe i cols., 2000). Per tant, donat l'antecedent de bloqueig de la neurotransmissió per part de les mIgM del pacient, es van dur a terme diferents estudis per veure si estava implicat algun altre VDCC, a part del P/Q, en l'alliberament del neurotransmissor en els músculs tractats amb mIgM actives anti-GM2.

Figura 30. Experiments intracel·lulars d'alliberament evocat amb blocadors específics de VDCC en músculs crònicament tractats amb mIgM actives (peu de figura pàgina següent).

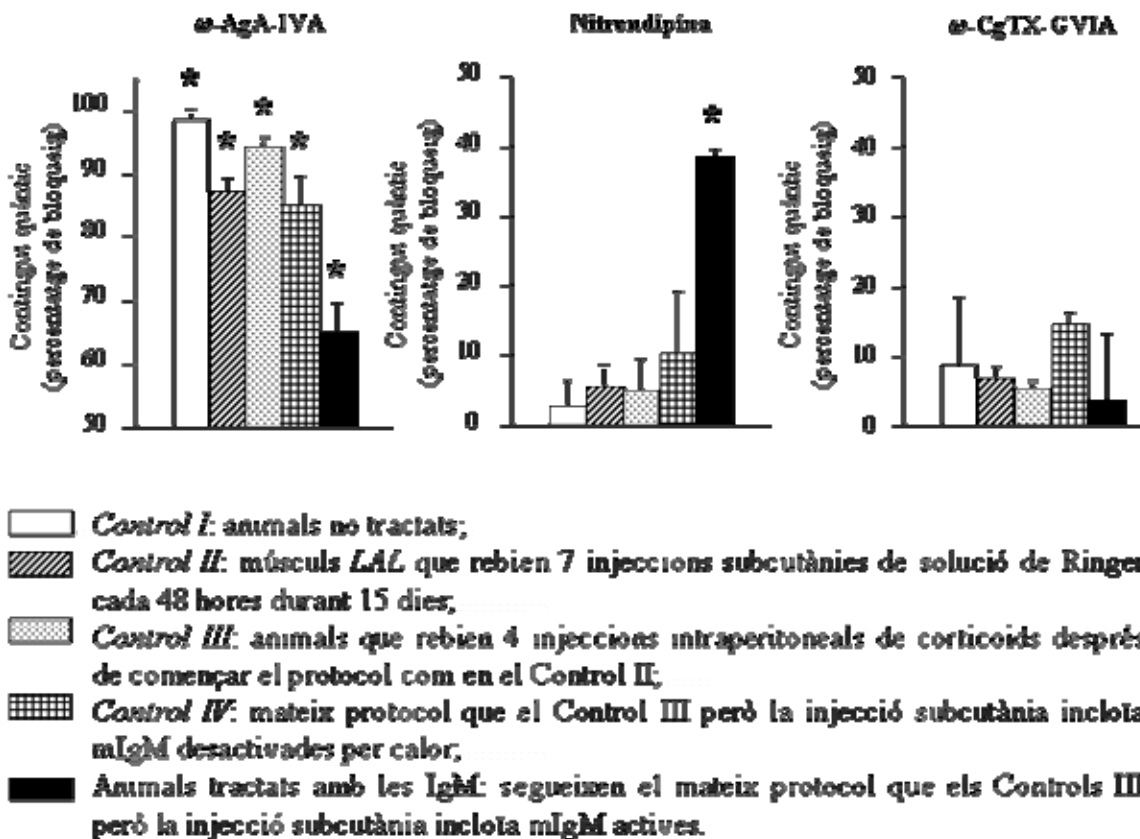


Figura 30 (pàgina anterior). Experiments intracel·lulars d'alliberament evocat amb blocadors específics de VDCC en músculs crònicament tractats amb mIgM actives. En els músculs LAL d'un animal adult normal, únicament el blocador específic per VDCC tipus P/Q, ω -Aga-IVA (100 nM), pot reduir l'alliberament del neurotransmissor, mentre que els blocadors pels canals tipus N (ω -CgTX-GVIA) i tipus L (Nitrendipina) no alteren aquesta neurotransmissió. Això ens indica que únicament el VDCC tipus P/Q està acoblat a la neurotransmissió en aquestes sinapsis madures (animals Control I i Control II). Aquesta situació també pot ser observada en experiments control utilitzant animals tractats amb 6-metilprednisolona (Controls III). Per tant, el tractament amb corticoides *per se* no modifica la sensibilitat normal dels terminals nerviosos motors a l'acció dels moduladors i toxines que afecten el funcionament dels VDCC en la neurotransmissió. Això també és cert pel Control IV (músculs tractats amb mIgM inactives). En canvi, en els músculs LAL tractats crònicament amb exposicions tòpiques de mIgM actives es va observar una reducció significativa de l'amplitud dels EPPs provocat per la Nitrendipina (aproximadament del 40 %), el que indica l'expressió del VDCC tipus L en les sinapsis tractades amb mIgM actives. En els músculs tractats amb mIgM actives no hi havia expressió dels VDCC tipus N (ω -CgTX-GVIA). Les columnes indiquen el percentatge (mitja \pm SEM) del contingut quàntic respecte a l'inicial. Cada columna, n = 5 músculs, mínim de 15 fibres per múscul. * p < 0.05 respecte als controls.

En la Figura 30 es mostren els resultats d'electrofisiologia dels diferents controls i músculs tractats amb mIgM amb els diferents blocadors pels canals de calci. Com es pot observar, únicament el blocador específic pel canal P/Q, ω -Aga-IVA, va ser capaç de modificar la neurotransmissió en totes les situacions estudiades (del Control I al IV i en els músculs tractats amb les IgM actives; Figura 30). Això ens permet dir que el tractament amb la 6-metilprednisolona no va modificar l'expressió funcional dels VDCC per si mateixa (Control III). En canvi, si s'observa la gràfica per la nitrendipina es pot veure que únicament en els músculs LAL tractats amb mIgM actives va haver una reducció significativa del contingut quàntic provocada per aquesta droga (aproximadament un 40 %, p < 0.05; Figura 30), indicant clarament l'expressió del VDCC tipus L en les sinapsis d'aquests músculs. Aquest bloqueig va ser revertit després d'un rentat de la preparació amb 100 ml de Ringer sense nitrendipina durant 60

minuts (% de recuperació després del rentat: $89.66\% \pm 5.3$, $n = 3$ músculs, mínim de 15 fibres per múscul), fet que va descartar possibles anomalies en els aparells de registre. En aquests mateixos músculs es va veure que no hi havia expressió funcional dels VDCC tipus N ja que la neurotransmissió no estava afectada per l' ω -CgTX-GVIA. En els músculs tractats amb mIgM actives, com ja em comentat, el blocador ω -Aga-IVA també bloqueja la neurotransmissió encara que la reducció del contingut quàntic va ser menor que en els controls, presumiblement perquè els pot entrar calci pel canal L.

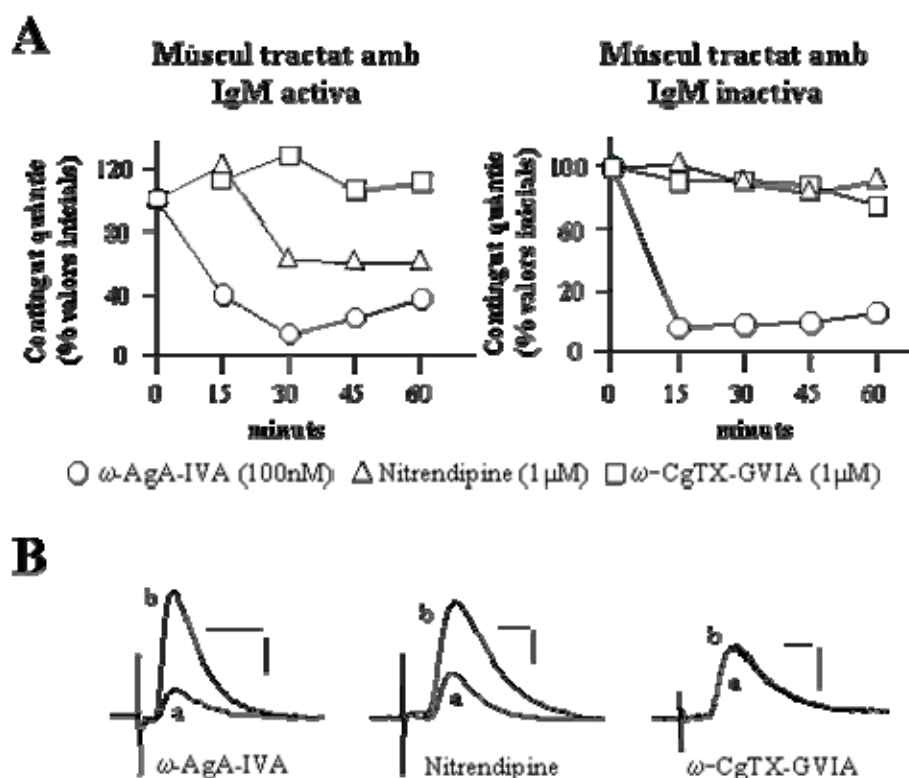


Figura 31. Exemples de l'efecte dels blocadors específics pels VDCC en els EPPs de músculs tractats crònicament amb mIgM actives. Aquesta figura mostra experiments en fibres úniques (seqüència temporal de l'efecte de les toxines en els EPPs d'una mateixa fibra permanentment punxada; les drogues o toxines s'addicionen a la solució del bany i els EPPs són enregistrats cada 15 minuts durant 60 minuts). En **A**, es mostren exemples del curs temporal dels efectes dels blocadors específics pels VDCC en el contingut quàntic de músculs crònicament tractats amb mIgM actives (esquerra) i de músculs tractats amb mIgM inactivades per calor (dreta). En **B**, es mostren exemples dels EPPs enregistrats d'experiments de fibra única. Cada traç representa un promig de 20 EPPs enregistrats abans (b) i després de 60 minuts (a) de l'aplicació de la toxina. Els artefactes d'estímul es van modificar per clarificar la imatge. Escala, horitzontal: 10 ms, vertical: 2 mV, respectivament.

En la Figura 31A es mostra el curs temporal del contingut quàntic en estudis de fibra única (l'efecte en el contingut quàntic d'una mateixa fibra permanent punxada al llarg d'una hora d'incubació) amb el blocador específic pel VDCC tipus P/Q, ω -Aga-IVA (cercles), el blocador específic pel VDCC tipus N, ω -CgTX-GVIA (quadrats), i el blocador específic pel VDCC tipus L, nitrendipina (triangles), en músculs tractats amb mIgM actives (Figura 31A-esquerra) i en els seus controls corresponents (Control IV, músculs tractats amb mIgM inactivades per calor; Figura 31A-dreta). Tant l'acció blocadora de la nitrendipina com la de l' ω -Aga-IVA es produeix dintre dels primers 30 minuts d'incubació, com és d'esperar per a accions lligades a l'axolema i habitual per aquests blocadors.

En la Figura 31B s'observen exemples dels EPPs enregistrats abans (b) i després de 60 minuts (a) de l'aplicació de la toxina corresponent en la mateixa unió neuromuscular de músculs tractats amb les mIgM actives. Com es pot apreciar va haver una reducció de la mida dels EPPs quan els músculs eren incubats amb nitrendipina i ω -Aga-IVA.

Amb posterioritat, es van estudiar els efectes de l'addició seqüencial dels dos blocadors de VDCC, tipus P/Q i tipus L, implicats en els canvis de la neurotransmissió en les sinapsis tractades amb mIgM actives per poder descartar una acció inespecífica dels blocadors, o fins i tot, una expressió anòmala d'alguna subunitat del canal L.

Després d'una incubació prèvia amb ω -Aga-IVA (1 h, 100 nM; fet que va reduir el contingut quàntic prop del 65 %), una segona incubació amb nitrendipina va produir un bloqueig de la neurotransmissió evocada que es va sumar al que anteriorment havia provocat el blocador del canal tipus P/Q. Aquest percentatge de reducció del contingut quàntic addicional induït per la nitrendipina va ser el mateix que el produït per la nitrendipina sola ($36.76 \% \pm 1.26$, $p > 0.05$ respecte a la incubació de la nitrendipina

sola, n = 3 músculs). Aquest resultat va indicar clarament que el nou VDCC tipus L té una identitat separada del VDCC tipus P/Q i que pot contribuir directament a la modulació de la neurotransmissió en aquests terminals nerviosos.

4.4.5.1.- Estudis morfològics

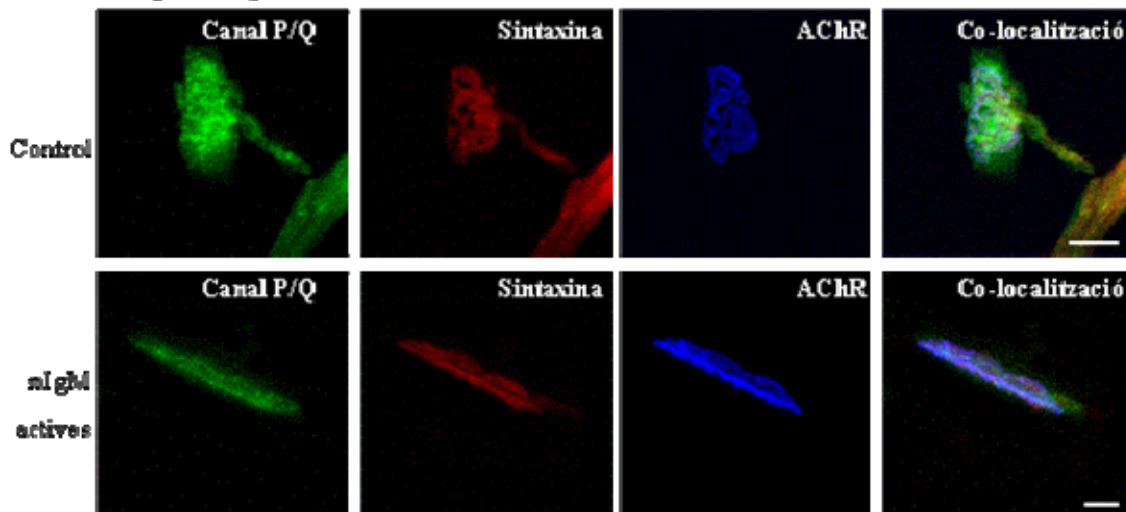
Per confirmar els resultats electrofisiològics es van fer estudis d'immunohistoquímica amb anticossos contra les subunitats α_1 dels diferents canals de calci. Es va observar que hi havia co-localització entre les mIgM anti-GM2, la syntaxina i el canal tipus P/Q en sinapsis adultes de LAL normal (Control I) (no es mostren les dades).

En els mateixos experiments, es va veure la presència del immunomarcatge pels VDCC tipus L i tipus P/Q en les sinapsis neuromusculars de músculs LAL tractats amb mIgM actives; però el marcatge pel canal tipus L no estava present en els músculs tractats amb mIgM inactivades per calor (Control IV) encara que el marcatge pels canal tipus P/Q si (Figura 32). La presència del canal de calci tipus L únicament en músculs tractats amb mIgM actives ens confirma l'existència d'un nou canal en aquest tipus de sinapsis.

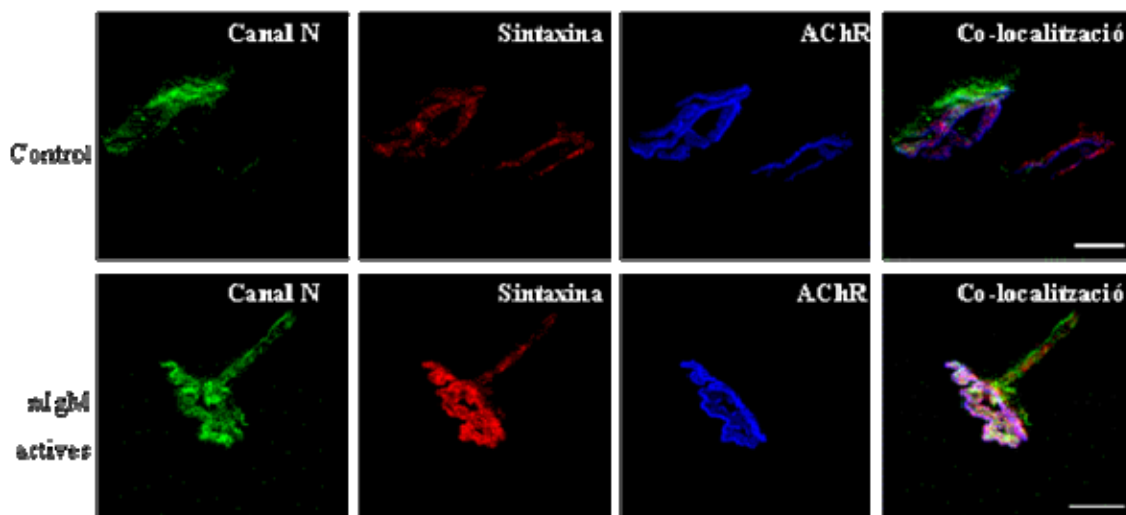
En la Figura 32 també es pot observar que el canal de tipus N estava present tant en els músculs controls com en els músculs tractats amb mIgM actives encara que funcionalment no l'haguéssim trobat. Aquest fet ja ha estat descrit prèviament, Day i col·laboradors (1997) i Westernbroek i col·laboradors (1998) també van mostrar immunolocalització del canal N en les unions neuromusculars de mamífers.

Figura 32. Localització per immunofluorescència confocal dels VDCC tipus L, N i P/Q a les NMJ de músculs tractats crònicament amb mIgM actives.

A. Canal tipus P/Q



B. Canal tipus N



C. Canal tipus L

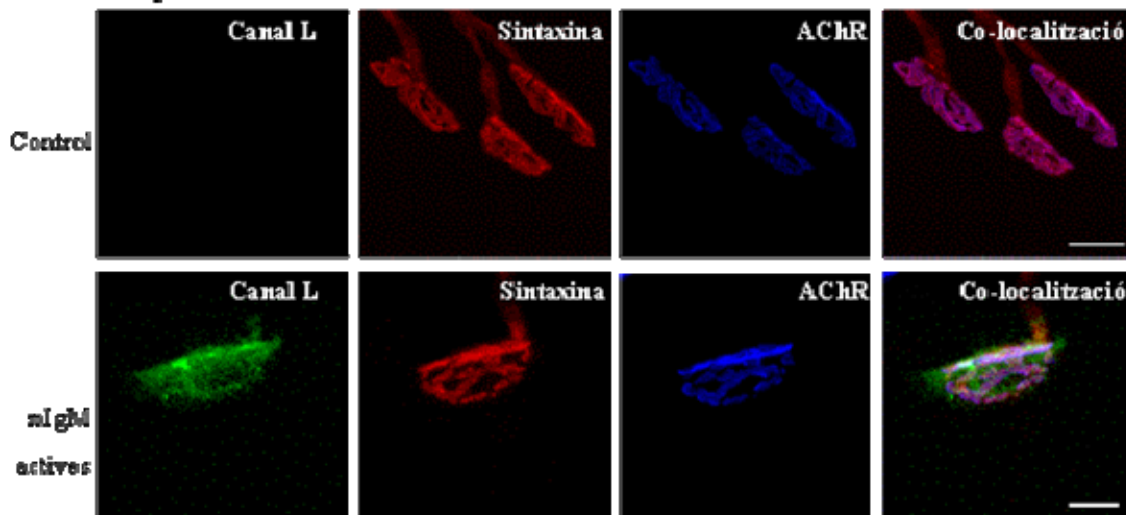


Figura 32. Localització per immunofluorescència confocal dels VDCC tipus L, N i P/Q a les NMJ de músculs tractats crònicament amb mIgM actives. La figura mostra la presència dels VDCC tipus P/Q (A), tipus N (B) i tipus L (C) (verd) a les unions musculars (marcades amb anti-sintaxina en vermell i α -BgTX-Alexa647 en blau) de músculs LAL tractats crònicament amb mIgM actives. El VDCC tipus L no es va trobar en músculs tractats amb mIgM inactives (Control IV) ni en els altres controls. En els controls, únicament s'observa marcatge pels canals tipus N (en la cèl·lula de Schwann; (Day i cols., 1997) i tipus P/Q. Escala, 10 μ m.

Com a resum de l'estudi crònic podem dir que l'aplicació contínua d'unes IgM anti-GM2 aïllades del sèrum d'un pacient amb polineuropatia crònica desmielinitzant provoquen tant alteracions morfològiques, trobem sinapsis amb creixements i/o retraccions axonals, com alteracions funcionals, tenim una baixada del contingut quàntic i l'aparició d'un nou canal de calci, en les unions neuromusculars de mamífer adult.

5.-DISCUSSIÓ

El propòsit d'aquest treball va ser estudiar els efectes provocats per uns anticossos monoclonals anti-gangliòsids del sèrum d'un pacient diagnosticat de polineuropatia crònica desmielinitant motora sobre la transmissió neuromuscular. Per aquest motiu, es va fer una aproximació metodològica tant de forma aguda *in vitro* (per definir quins efectes poden tenir aquests anticossos) com crònica *in vivo* (ja que aquesta malaltia evoluciona de forma crònica).

Amb els nostres estudis hem descobert que els gangliòsids tenen un paper important en l'alliberament del neurotransmissor mitjançant la interacció amb els canals de calci dependents de voltatge (VDCC). Hem trobat que aquests anticossos afecten la neurotransmissió del múscul esquelètic en incubacions *in vitro* i quan aquestes immunoglobulines són injectades directament en un múscul d'un animal d'experimentació *in vivo*. A més, en aquests estudis *in vivo* hem descobert que hi ha modificacions tant funcionals com morfològiques en les unions neuromusculars que suggereixen un bloqueig neuromuscular crònic. Aquests gangliòsids contra els que van dirigits les immunoglobulines del pacient es localitzen en la sinapsi neuromuscular, tant en el terminal nerviós com en la cèl·lula de Schwann.

El paper dels gangliòsids en la fisiologia neural no està encara ben definida i diferents tipus de gangliòsid poden jugar diferents papers específics, però les dades que aquí s'exposen ens suggereixen un paper important dels gangliòsids en les interaccions entre axó i glia, i com la seva pertorbació per mig d'anticossos pot alterar la neurotransmissió i desencadenar l'aparició de símptomes motors.

5.1.- Especificitat dels anticossos

El nostre pacient havia estat diagnosticat de neuropatia motora crònica i mostrava trets de desmielinització en els estudis electrofisiològics. En el seu sèrum es va demostrar la presència d'un component monoclonal IgM (mIgM).

Mitjançant la tècnica d'ELISA utilitzant gangliòsids comercials, el sèrum del nostre pacient va reaccionar únicament amb el gangliòsid GM2. Amb estudis d'immunoHPTLC aquest sèrum va reconèixer les bandes corresponents a GM2 i uns altres dos gangliòsids (Figura 14). Aquestes dues bandes es va veure que corresponien als gangliòsids GD1a-GalNAc i GM1b-GalNAc (Figures 15 i 16). Amb els estudis d'ELISA i de fixació d'anticossos sobre placa de sílice (immunoHPTLC) hem demostrat que el component monoclonal IgM del sèrum del pacient té reactivitat contra el terminal anti-[GalNAc β 1-4Gal(3-2 α NeuAc) β 1-] (apartat 4.1 de Resultats i Figura 17).

Aquest mateix patró de reactivitat també s'ha trobat en altres estudis previs. Està descrit un cas d'un pacient amb una polineuropatia crònica, que també presentava una alta titulació de IgM monoclonals i tenia la mateixa reactivitat trobada en el nostre pacient contra els gangliòsids GM2, GD1a-GalNAc i GM1b-GalNAc (Ilyas i cols., 1988a). Nakao i col·laboradors (1993) també van descriure una malaltia dels nervis perifèrics de forma motora pura, com l'anterior, que tenia la mateixa especificitat d'anticossos. En un estudi més recent O'Hanlon i col·laboradors (2000) descriuen dos pacients amb neuropaties motores i anticossos IgM anti-GM2.

Sembla lògic pensar que en moltes malalties motores cròniques estarien implicades, entre altres coses, immunoglobulines contra l'epítop comú al gangliòsid GM2, com ja ha estat descrit prèviament (Willison i Yuki, 2002). Aquests anticossos poden induir una neuropatia purament motora que pot ser indistingible clínicament de malalties de la neurona motora que també han estat relacionades amb aquests anticossos (Nakao i cols., 1993; Mizutani i cols., 2003). Als pacients amb polineuropaties motores cròniques l'assaig de l'especificitat d'aquest tipus d'anticossos podria ser de gran valor de cara a realitzar una prova terapèutica amb immunoglobulines intravenoses, ja que aquests pacients responen bé a aquest tractament.

5.2.- Localització per immunohistoquímica de l'antigen pels anticossos anti-GM2

Es va intentar localitzar el gangliòsid diana dels anticossos del malalt tant en les sinapsis neuromusculars com en el nervi perifèric, donat que el nostre pacient presentava una neuropatia desmielinitzant motora. A la bibliografia es poden trobar abundants estudis que situen la diana per l'atac d'anticossos anti-gangliòsids de diferents malalties neuromusculars en aquestes dues estructures (per exemple (Santoro i cols., 1992; Plomp i cols., 1999; Willison i O'Hanlon, 1999; O'Hanlon i cols., 2001).

5.2.1.- En les unions neuromusculars de ratolí

Donat que part de les dades electrofisiològiques del pacient es podien explicar per una disfunció de la placa motora es va estudiar la localització dels gangliòsids amb l'epítop comú a GM2 en la sinapsi neuromuscular de ratolí adult.

Amb els estudis d'immunolocalització utilitzant el component monoclonal IgM (mIgM) del sèrum del nostre pacient amb afinitat pels gangliòsids GM2, GD1a-GalNAc i GM1b-GalNAc, vam trobar que l'antigen comú a aquests es localitzava en la regió de la sinapsi neuromuscular (NMJ) (apartat 4.2.1 de Resultats). La marca coincideia amb la part presinàptica de la unió i no amb la part postsinàptica. En estudis posteriors on s'eliminava cada una de les dues estructures que componen la regió presinàptica, vam demostrar que les IgM es fixaven tant a la regió del terminal motor com a la cèl·lula de Schwann.

La presència en la unió neuromuscular de gangliòsids diana per anticossos de sèrums de pacients amb neuropaties motores ha estat àmpliament descrita per altres autors. Illa i col·laboradors (1995) utilitzant IgG anti-GM1 purificades del sèrum de pacients amb síndrome de Guillain-Barré (GBS), i Willison i col·laboradors (1996), Plomp i col·laboradors (1999) i Goodyear i col·laboradors (1999) fent servir IgM o IgG anti-GQ1b purificats del sèrum de malalts amb síndrome de Miller-Fisher (MFS), troben dipòsits d'anticossos anti-gangliòsids en la zona de la sinapsi neuromuscular tant en humans com en animals d'experimentació, respectivament. Segons les seves deduccions estarien localitzats en la part presinàptica de la unió neuromuscular. En aquests estudis la discriminació entre la cèl·lula de Schwann, el terminal nerviós i el component postsinàptic de la unió no quedava clara. Estudis més recents d'immunolocalització i de microscopia electrònica, troben dipòsits d'anticossos monoclonals anti-GQ1b en el terminal nerviós i en la cèl·lula de Schwann de la sinapsi neuromuscular de ratolins adults (O'Hanlon i cols., 2001; 2002 i 2003; Halstead i cols., 2004 i 2005b), com és el nostre cas. Taguchi i col·laboradors (2004a) utilitzant IgG anti-GD1a-GalNAc del sèrum d'un malalt amb GBS i també d'un conill immunitzat amb anti-GD1a-GalNAc,

descriuen marcatge fluorescent corresponent a l'anticòs en la zona de la sinapsi neuromuscular. A diferència de les nostres troballes, aquests darrers autors, troben marca pels anticossos anti-GD1a-GalNAc únicament localitzada en el terminal nerviós i no en la cèl·lula de Schwann. Goodfellow i col·laboradors (2005) també han descrit marcatge presinàptic per anticossos anti-GD1a, en el terminal nerviós i no en la cèl·lula de Schwann presinàptica, lògic si pensem que les immunoglobulines contra GD1a provoquen neuropaties axonals.

Podem concloure que els gangliòsids podrien estar localitzats en la cèl·lula de Schwann i en l'axó, i que la pertorbació experimental o patològica de la funció d'aquests gangliòsids podria desencadenar una malaltia. Raonament que també comparteixen altres autors com Willison i Yuki (2002).

5.2.2.- En el nervi dels LAL de ratolins adults sans

Degut al fet que la polineuropatia del nostre pacient mostrava trets de desmielinització es van fer estudis d'immunohistoquímica en els nervis perifèrics intramusculars que van a innervar al múscul LAL.

Amb aquest estudis, es va confirmar que el determinant antigènic pels anticossos anti-GM2 en nervis intramusculars es troba localitzat tant en l'axó com en la cèl·lula de Schwann que l'envolta.

La immunolocalització d'anticossos anti-gangliòsids de sèrum de pacients amb neuropaties motores desmielinitzants en aquestes estructures també ha estat descrita per

altres autors com Santoro i col·laboradors (1992) i Uncini i col·laboradors (1993). Aquests autors treballant amb sèrum de malalts amb neuropatia motora multifocal (MMN) troben dipòsits de IgM anti-GM1 en els nòduls de Ranvier de nervis ciàtics de rata després d'una injecció intranerviosa. Aquests estudis també mostren desmielinització de la regió paranodal i bloqueigs de la conducció nerviosa, com en els nostres estudis (veure més endavant i revisar apartat 4.4.3 de Resultats). Altres autors com Hafer-Macko i col·laboradors (1996), han descrit l'existència d'anticossos IgG, amb l'epítoc comú a GM1, units a l'axolema dels nervis perifèrics d'autòpsies de pacients amb neuropatia axonal motora aguda (AMAN, una variant axonal de la síndrome de Guillain-Barré). A diferència del nostre treball, ells no troben localització dels anticossos en la cèl·lula de Schwann o beina de mielina donat que l'AMAN és una malaltia purament axonal.

En uns altres estudis, Willison i O'Hanlon (1999) descriuen l'existència de gangliòsids en nervis perifèrics quan utilitzen anticossos anti-GQ1b de malalts amb la síndrome de Miller-Fisher. Per altra banda, Taguchi i col·laboradors (2004a) amb IgG purificades anti-GD1a-GalNAc del sèrum d'un pacient amb la síndrome de Guillain-Barré i també de conill immunitzat, detecten marca tant en el soma de les neurones de la medul·la espinal anterior com en els axons motors de l'arrel ventral de rata adulta, però no en la beina de mielina. En un altre estudi, aquests mateixos autors (Taguchi i cols., 2004b), descriuen la localització de l'antigen per anticossos anti-asialoGM1 en els axons motors i en les membranes de les cèl·lules de Schwann.

Encara que es creu que els gangliòsids poden tenir una funció fisiològica diferent en nervi que en la unió neuromuscular (Willison i Yuki, 2002), la localització dels antígens pels anticossos causants de malalties motores en els nòduls de Ranvier, les cèl·lula

Schwann i/o el terminal nerviós podria donar una idea de la via d'actuació d'aquests anticossos. Amb les nostres troballes podem postular que alguna alteració de la fisiologia d'aquests gangliòsids o d'algunes proteïnes relacionades amb ells, degut als anticossos, pot pertorbar la interacció normal entre el terminal axònic i la glia, i contribuir a desencadenar els efectes o símptomes que es mostren en les malalties que s'han relacionat amb els anticossos anti-gangliòsids. Encara que, com es discutirà més endavant (apartat 5.3.1 de discussió), moltes d'aquestes malalties han estat relacionades més aviat amb la destrucció de membranes per l'activació del complement (Plomp i cols., 1999; Bullens i cols., 2000; O'Hanlon i cols., 2001; 2002 i 2003; Halstead i cols., 2004; Bullens i cols., 2005; Goodfellow i cols., 2005; Willison, 2005 i 2006).

5.3.- Efecte agut de les IgM anti-gangliòsids sobre el diafragma de ratolins adults

La disminució de l'amplitud del potencial motor trobat en el nostre pacient podria ser explicat més per un bloqueig neuromuscular que per una lesió de tipus desmielinitzant. Aquest fet ens va portar a avaluar l'efecte dels anticossos mIgM anti-GM2 del nostre pacient sobre la neurotransmissió i quin era el seu possible mecanisme d'acció fisiopatològic.

5.3.1.- Canvis en la neurotransmissió de diafragma de ratolí

En els últims anys ha estat estudiat l'efecte *in vitro* del sèrum de pacients amb la síndrome de Guillen-Barré (GBS; Buchwald i cols., 1998; Taguchi i cols., 2004a; Goodfellow i cols., 2005) i la síndrome de Miller-Fisher (MFS; Plomp i cols., 1999;

Bullens i cols., 2000; O'Hanlon i cols., 2001 i 2003; Halstead i cols., 2004 i 2005b) en l'alliberament del neurotransmissor. Tots els treballs coincideixen en un bloqueig de la neurotransmissió que en part podria justificar la paràlisi que pateixen aquests malalts. No queda clar si aquest bloqueig està provocat per l'alteració d'alguna funció fisiològica dels propis gangliòsids o de proteïnes relacionades amb ells sobre la neurotransmissió, per ruptures de les membranes axonals secundàries a un atac immunitari amb l'activació del complement per la via clàssica, o bé si els dos mecanismes hi podrien estar implicats.

El complement són una sèrie de proteïnes del sèrum que interaccionen entre si, de manera regulada, formant una cascada enzimàtica que permet l'amplificació de la resposta humoral (dels anticossos). L'activació i fixació del complement és un important mecanisme efector del sistema immune. El complement es pot activar per tres vies: la via clàssica, que suposa la fixació de l'anticòs a l'antigen; la via alternativa, que interactua directament amb l'antigen; i la via de les lectines, que s'activa per la interacció de les proteïnes del complement amb unes glicoproteïnes específiques. Les tres vies d'activació del complement finalitza amb la formació del porus de membrana (MAC; *Membrane Attack Complex*).

En els nostres estudis, la incubació aguda del sèrum del nostre pacient en la preparació de diafragma i nervi frènic va provocar una baixada de l'amplitud dels potencials de placa evocats o EPPs i una caiguda del contingut quàntic, tots dos reversibles (Figures 21A i B); per tant, hi havia un bloqueig de la neurotransmissió evocada provocada pel sèrum. Una dada a destacar és que l'acció del sèrum sobre la neurotransmissió evocada era ràpida (l'acció del sèrum sobre els EPPs és màxima als 30 minuts; Figura 21A), el

que ens indica que els efectes van ser més aviat de disfunció i no de destrucció del terminal. Per altra banda, que el bloqueig fos reversible reforça la idea que l'axolema no estava lesionat o si ho estés, només d'una forma lleu.

Pel que fa a la neurotransmissió espontània (Figures 22A i B), el sèrum del pacient va provocar un augment també reversible de la freqüència dels potencials de placa en miniatura (MEPPs) sense que l'amplada d'aquests es vegés afectada. Aquesta última dada ens informa que la incubació amb el sèrum no afectava als receptors d'ACh postsinàptics. Una acció postsinàptica del sèrum sembla poc probable per diferents factors. En primer lloc, hem vist que no hi havia cap variació en l'amplitud o el temps de pujada dels MEPPs, o en el temps de pujada dels EPPs, ni tampoc canvis en el potencial de repòs de les fibres musculars provocats per la incubació del sèrum (veure Figures 21A i 22A). En segon lloc, el fet que tant l'amplada dels EPPs com el contingut quàntic tinguessin una baixada en el mateix sentit, confirmava que el sèrum no tenia una acció postsinàptica. Aquestes dades estaven recolzades pels estudis d'immunohistoquímica. Com hem comentat no es va localitzar els gangliòsids diana pels anticossos del malalt en la part postsinàptica de la unió neuromuscular.

És important destacar que l'efecte sobre la neurotransmissió evocada es mantenia constant al llarg d'hores d'incubació. Aquesta dada ens revela que el bloqueig no es produïa per la pèrdua contínua de vesícules sinàptiques vinculada a una lesió de la membrana per activació de complement. De fet, es va comprovar que el bloqueig en la neurotransmissió evocada provocat per la incubació amb les IgM del malalt no precisava de la presència de complement (Figura 21C i D).

Respecte de la neurotransmissió espontània vam veure que, a diferència de l'alliberament evocat, el seu efecte sobre les unions neuromusculars depenia del temps

d'incubació amb el sèrum (a més temps més alliberament d'ACh espontani; Figura 22C) sense detectar esgotament de la neurotransmissió. A més a més, les IgM aïllades per si soles no provocaven la mateixa acció que el sèrum, es necessitava complement humà per augmentar la freqüència dels MEPPs (Figura 22D). Encara que les mIgM requerien complement humà per provocar els efectes trobats amb el sèrum del pacient sobre la neurotransmissió espontània, aquest efecte de les IgM més el complement era reversible i no s'esgotava; per tant, no sembla que l'activació del complement sigui determinant en aquests experiments. Tot i així, aquesta darrera opció no es descarta de moment (veure més endavant).

En estudis d'electrofisiologia intracel·lular realitzats pel grup del Dr. Willison (Plomp i cols., 1999; Bullens i cols., 2000) en preparacions de diafragma i nervi frènic i utilitzant sèrum de pacients amb síndrome de Miller-Fisher o MFS i anticossos anti-GQ1b, es descriu un increment dràstic en la freqüència dels MEPPs, sense trobar una reducció en l'amplitud d'aquests, i una reducció en l'amplitud dels EPPs. Quan les preparacions s'incubaven amb immunoglobulines purificades dels sèrums es requeria la presència de complement humà fresc (afegint sèrum de controls sans com a font de complement) per reproduir els mateixos efectes descrits amb els sèrums. Aquests efectes dels anticossos anti-GQ1b sobre la transmissió neuromuscular són irreversibles i dependents del temps d'incubació del sèrum (a més temps d'incubació més alliberament espontani). Aquests autors troben que un augment perllongat de la freqüència dels MEPPs els porta a una baixada en l'amplitud dels EPPs (que es dona amb posterioritat o concomitantment), provocant un bloqueig de la neurotransmissió. Com a conclusió dels seus resultats, proposen que la reducció en l'alliberament evocat del neurotransmissor és una conseqüència de l'alliberament massiu d'ACh espontani i que aquesta reducció dràstica

del neurotransmissor es deu a la ruptura de l'axolema per la participació del complement. Per tant, el bloqueig de la neurotransmissió en les unions neuromusculars provocada pels anticossos anti-GQ1b no és un efecte primari dels anticossos sobre les funcions específiques dels gangliòsids, sinó que depèn de l'activació del complement per aquests anticossos (Goodyear i cols., 1999; Plomp i cols., 1999; Bullens i cols., 2000).

En experiments posteriors d'aquest mateix grup (O'Hanlon i cols., 2001 i 2003), es descriu una destrucció dels neurofilaments axònics per mig de proteases activades per l'augment de calci que entra en el terminal degut a l'activació del complement i que és això, el que provoca els danys en el terminal i sobre la neurotransmissió. En aquest sentit, investigacions més actuals del mateix grup han demostrat la formació del component final del complement, el complex d'atac a membrana del complement (C5b-9 o MAC), tant a nivell de cèl·lula de Schwann com de terminal nerviós (Halstead i cols., 2004). Més recentment, s'ha vist que depenent del tipus d'antigen al que van dirigits els anticossos, pot haver fixació de complement en la cèl·lula de Schwann, en el terminal nerviós o en els dos llocs (Halstead i cols., 2005b).

En el passat any, autors com Bullens i col·laboradors (2005) o Halstead i col·laboradors (2005a) utilitzant diferents substàncies, han revelat que l'efecte dels anticossos anti-GQ1b sobre la transmissió neuromuscular es dona per l'activació del complement directament en les membranes presinàptiques per la via clàssica. La utilització de diferents molècules, unes que preveuen la unió de l'anticòs a la membrana (Bullens i cols., 2005) o altres que inhibeixen la formació del complex final del complement (Halstead i cols., 2005a), poden impedir els efectes dels anticossos anti-GQ1b sobre la unió neuromuscular.

Altres membres del grup del Dr. Willison (Goodfellow i cols., 2005) utilitzant registres intracel·lulars han estudiat els efectes provocats per anticossos anti-GD1a de ratolins immunitzants i de sèrum de pacients amb AMAN (la variant axonal de la GBS). Aquests autors han descrit un augment dràstic en la freqüència dels MEPPs i un bloqueig de la neurotransmissió, després d'afegir sèrum control com a font de complement, en preparacions de diafragma i nervi frènic de ratolins que sobreexpressen GD1a i que prèviament havien estat incubades amb les IgG anti-GD1a o sèrum de malalts amb AMAN. D'igual manera que amb els anticossos anti-GQ1b, Goodfellow i col·laboradors (2005) també troben dipòsits de complement (MAC) i de IgG anti-GD1a i pèrdua de neurofilament en els diafragmes de ratolins que sobreexpressen GD1a després dels estudis d'electrofisiologia. La marca per les IgG anti-GD1a està localitzada en la zona presinàptica de la unió, en el terminal nerviós però no en la cèl·lula de Schwann presinàptica. Aquesta última dada concorda amb l'AMAN donat que és una malaltia axonal que es relaciona amb la presència en el sèrum dels malalts d'anticossos anti-GD1a.

Els diferents estudis realitzats pel grup del doctor Willison ens indiquen que els efectes sobre la neurotransmissió, pel que fa a pacients amb MFS i probablement a pacients amb AMAN, podria ser explicada per l'activació de la via clàssica del complement pels anticossos anti-gangliòsids que es troben en el sèrum dels pacients. El que succeiria és que els anticossos es fixarien al seu gangliòsid diana i activarien la cascada del complement donant com a resultat, la perforació de la membrana presinàptica del terminal nerviós per la formació del complex formador de porus o MAC. Aquest fet faria augmentar el Ca^{2+} intracel·lular i provocaria l'alliberament massiu d'ACh, i per tant, l'augment de la freqüència del MEPPs. Posteriorment, o a la vegada, es donaria un

bloqueig de la neurotransmissió (per esgotament de les vesícules sinàptiques pel trencament de la membrana axonal). A més aquest augment de calci intracel·lular activaria la destrucció del neurofilament del terminal nerviós i la transformació de la cèl·lula de Schwann presinàptica (Goodyear i cols., 1999; Plomp i cols., 1999; Bullens i cols., 2000; O'Hanlon i cols., 2001; 2002 i 2003; Halstead i cols., 2004; Bullens i cols., 2005; Goodfellow i cols., 2005; Halstead i cols., 2005b; Willison, 2005 i 2006).

En un estudi de *macro-patch clamp*, Buchwald i col·laboradors (1998) troben un bloqueig reversible de la neurotransmissió provocat pel sèrum de pacients amb síndrome de Guillain-Barré o GBS (amb anticossos contra els gangliòsids GM1, GQ1b i GD1b), tant a nivell presinàptic com postsinàptic. Aquests autors també descriuen que el contingut quàntic es va reduir únicament amb la fracció IgG purificada del sèrum, mentre que la fracció IgM no va modificar la neurotransmissió; és a dir, les IgG són les immunoglobulines involucrades en una malaltia aguda com la GBS (Willison i Yuki, 2002). A més a més, l'efecte del sèrum dels pacients de Buchwald i col·laboradors (1998) sobre l'alliberament del neurotransmissor és independent del complement, com en el nostre cas. En un estudi posterior, aquests autors també observen un bloqueig reversible de la neurotransmissió, tant en la seva vessant presinàptica com postsinàptica, quan utilitzen sèrum de pacients amb síndrome de Miller-Fisher o MFS (Buchwald i cols., 2001). Aquestes dades coincideixen amb les del nostre estudi, suggerint que hi ha un alteració complexa i reversible de les funcions específiques dels propis gangliòsids o de certes molècules que es troben implicades en la neurotransmissió (possiblement canals iònics; veure més endavant). Tot i aquestes similituds hi ha alguna diferència entre el nostre estudi i els de Buchwald i col·laboradors (1998 i 2001). En els nostres estudis no observem una acció postsinàptica del sèrum donat que no hem vist una

variació en l'amplitud dels MEPPs que ens ho indiqui (Figura 22A) o marcatge fluorescent pels nostres anticossos en la zona postinàptica (Figura 19).

En un estudi recent utilitzant sèrum d'un pacient amb GBS i anticossos anti-GD1a-GalNAc o sèrum de conill immunitzat amb anti-GD1a-GalNAc, Taguchi i col·laboradors (2004a) troben bloqueig de la neurotransmissió en co-cultius cel·lulars de múscul i medul·la espinal. Aquests autors descriuen un bloqueig presinàptic independent de complement i reversible, igual que en el nostre cas. En un altre estudi del mateix any, aquests autors troben un bloqueig de la transmissió neuromuscular en co-cultius de medul·la i múscul després d'afegir sèrum amb anticossos anti-asiloGM1. Aquest bloqueig també és reversible i independent de complement i a més a més, dependent dels canals de calci dependents de voltatge del terminal nerviós (Taguchi i cols., 2004b).

Buchwald i col·laboradors (2002) utilitzant anticossos IgM anti-GQ1b monoclonals de ratolí (proporcionats per Goodyear i col·laboradors, 1999), van realitzar estudis de *macro-patch clamp* en diafragma de ratolí i van descriure una baixada del contingut quàntic dosis dependent, sense afectació de la freqüència o amplitud de les corrents postsinàptiques, en absència de complement. Aquest autors troben un bloqueig presinàptic independent de complement. En un article anterior, C. Slater (2001) ja apuntava el fet que els anticossos anti-gangliòsids podrien tenir dos mecanismes d'actuació, un que suposaria l'acció directa dels anticossos sobre els gangliòsids o molècules relacionades amb ells i un segon mecanisme que seria el provocat per l'activació del complement per part d'aquests anticossos. Buchwald i col·laboradors (2002) també proposen un procés dual pels anticossos anti-gangliòsids: un efecte directe

dels anticossos sobre la transmissió neuromuscular i una destrucció del terminal nerviós provocada per l'activació del complement.

Igual que en els treballs de Buchwald (1998; 2001 i 2002) i Taguchi (2004a i 2004b), els efectes sobre la neurotransmissió evocada trobats en els nostres estudis no necessitaven complement. Els nostres controls realitzats amb sèrum on s'havia inactivat el complement (Figura 21D), indiquen clarament que el bloqueig de l'activitat evocada era independent de complement. Per tant, queda demostrat que el component monoclonal IgM del nostre pacient pot per si mateix influir, d'una manera reversible, en el mecanisme presinàptic d'alliberament del neurotransmissor evocat de les sinapsis neuromusculars en incubacions relativament curtes. A més, únicament teniem formació del porus de membrana o MAC, i per tant l'activació del complement, quan s'injecta complement humà juntament amb les mIgM actives (Figura 27).

Pel que fa a l'augment dràstic de la freqüència del MEPPs per la formació del porus de membrana per l'activació del complement i bloqueig dels EPPs per esgotament de les vesícules sinàptiques, demostrat pels estudis del grup del Dr. Willison (Plomp i cols., 1999; Bullens i cols., 2000; O'Hanlon i cols., 2001; 2002 i 2003; Halstead i cols., 2004; Bullens i cols., 2005; Goodfellow i cols., 2005; Halstead i cols., 2005b; Willison, 2005), en el nostre treball s'observa un increment regular, reversible i depenent del temps en la freqüència dels MEPPs (Figura 22C i D) i l'efecte sobre la neurotransmissió evocada és màxim als 30 min i no decau després de 4 h d'incubació amb el sèrum (Figura 21C); descartant d'aquesta manera una possible activació del complement donat la reversibilitat dels efectes en la neurotransmissió espontània i la independència del temps en la evocada. Contràriament al bloqueig dels EPPs, en els nostres estudis es va trobar que el canvi en la freqüència dels MEPPs requeria complement, igual que van descriure

Plomp i col·laboradors (1999); però a diferència d'ells, els nostres efectes sembla que no eren deguts a la formació d'un porus per activació del complement donat que aquests efectes eren completament reversibles (Figura 22D). No podem descartar però un nivell de lesió axonal mínim que pogués permetre un suau increment dels MEPPs que a llarg termini (més de les 4 hores aquí testades) donés una depleció de vesícules sinàptiques.

Una altra possible explicació del mecanisme d'acció de les IgM anti-gangliòsids seria que provoquessin la despolarització de la membrana. La despolarització de la membrana axonal observada en estudis realitzats amb l'activador del canal de Na^+ aconitina van produir efectes similars als observats en els nostres experiments: augment dels potencials de placa espontanis i bloqueig dels potencials evocats (Onur i cols., 1995). En el nostre treball, com ja hem comentat, el potencial de membrana de les fibres musculars i l'amplitud dels MEPPs no va variar durant tota la incubació del sèrum (Figura 22A), el que ens indica que és poc probable una despolarització de la membrana. Encara que, amb els nostres estudis, una despolarització de la membrana axonal induïda pel sèrum no pot ser descartada completament.

El fet que en els nostres estudis tenim dues vies d'actuació de les IgM del sèrum del pacient, ens indica una acció fisiològica complexa dels gangliòsids diana que sembla inferir de manera diferent tant en els mecanismes d'alliberament d'acetilcolina espontanis com en els d'alliberament evocats; però sembla ser que cap dels dos mecanismes involucra el complement.

5.3.2.- Canvis en la conducció nerviosa de diafragma de ratolí

Ja que el pacient del nostre estudi presentava signes de desmielinització, en els estudis d'electrofisiologia intracel·lular es van analitzar els paràmetres relacionats amb la conducció nerviosa com és l'estudi de la latència i el llindà de generació dels EPPs.

En l'estudi realitzat en el nostre laboratori, no es van observar evidències de modificació en la velocitat de conducció donat que no hi havia canvis ni en la latència ni en el llindà de generació dels EPPs degut a l'addició del sèrum després de 4 h d'incubació en la preparació de múscul (Figura 21A i C).

Els estudis electrofisiològics en nervi ciàtic de rata després d'una incubació amb sèrums de pacients que presenten anticossos anti-gangliòsids no són homogenis. Arasaki i col·laboradors (1993), van observar reduccions de l'amplitud dels potencials d'acció muscular (CMAPs) després de diverses hores en presència de sèrum humà i de conill amb anticossos anti-gangliòsid GM1. Segons aquest estudi el bloqueig de la conducció únicament es donava en les fibres nervioses motores. Pel contrari Hirota i col·laboradors (1997), no van trobar aquest tipus d'alteracions quan incubaven els ciàtics amb sèrums que mostraven les mateixes especificitats antigèniques que els anteriors. Pappas i col·laboradors (1999), tampoc van detectar canvis en els paràmetres de conducció de ciàtics de rata després incuba'ls amb sèrum de pacients amb la síndrome de Miller-Fisher (MFS) i anticossos anti-GQ1b.

En el present estudi d'incubació *in vitro* d'una preparació de diafragma i nervi frènic amb anticossos anti-gangliòsids no s'observen canvis en la conducció axonal a nivell de placa motora o sinapsi neuromuscular. Per veure canvis en la conducció nerviosa es van

realitzar estudis posteriors de neurografia motora on es va estudiar els potencials d'acció compostos i la velocitat de conducció del nervi que va ha innervar el múscul LAL.

5.3.3.- Relació entre gangliòsids i canals de calci

Avui en dia no s'ha trobat un paper fisiològic simple pels gangliòsids en les cèl·lules nervioses; encara que s'ha vist que els gangliòsids estan implicats en el creixement i diferenciació cel·lular del sistema nerviós i en la funció sinàptica, on han estat relacionats amb l'alliberament del neurotransmissor mitjançant la regulació del flux de calci (Nagai, 1995; Ledeen i cols., 1998; Buccoliero i cols., 2002). Alguns estudis apunten una relació entre els gangliòsids i els canals de calci dependents de voltatge (VDCC) relacionats amb la neurotransmissió. Ha estat descrit una interacció entre els canals de calci tipus L de cultius cel·lulars de neuroblastoma N18 i el gangliòsid GM1 (Carlson i cols., 1994) i els canals tipus N de sinaptosomes de cervell de ratolí i els gangliòsids GM1 i GQ1b (Tanaka i cols., 1997; Ando i cols., 1998). També trobem estudis que relacionen anticossos anti-GM1 de sèrum de malalts amb neuropaties motores amb l'activació de canals de calci en cèl·lules de neuroblastoma N18 (Quattrini i cols., 2001).

En els nostres estudis (apartat 4.3.3 de resultats i Figura 23) realitzant pre-incubacions de les preparacions de diafragma i nervi frènic amb el blocador del canal tipus P/Q, ω -Agatoxina-IVA, es van anul·lar completament els efectes de les IgM del nostre pacient sobre el contingut quàntic i sobre la freqüència dels MEPPs. Això significa que el gangliòsid GM2 està relacionat amb els canals de calci tipus P/Q (l'únic tipus de VDCC present en el terminal nerviós de mamífer adult; Uchitel i cols., 1992). Aquest fet ens

demostra que hi ha una relació entre els gangliòsids i els canals de calci implicats en la neurotransmissió i que aquesta seria una possible via d'actuació dels anticossos anti-gangliòsids en certes malalties neuromusculars, com la que presenta el pacient del nostre estudi. Els anticossos impedirien la interacció entre els gangliòsids i els VDCC i per tant, impossibilitarien la neurotransmissió per disfunció dels canals de calci.

Aquestes dades reafirmen el resultat que l'antigen pels anticossos IgM anti-GM2 sigui presinàptic, donat que interaccionen amb el canal de calci tipus P/Q que es troba en les membranes axonals presinàptiques; com ja havien descrit altres autors (Catterall, 1999; Taverna i cols., 2004) i confirmem nosaltres mateixos amb els nostres estudis d'immunohistoquímica amb anticossos anti-VDCC (apartat 4.4.5 de Resultats).

Un treball recent de Taguchi i col·laboradors (2004b) descriu la reducció de les corrents de calci d'un co-cultiu de cèl·lules musculars i de medul·la espinal quan s'afegeix al medi els anticossos anti-asialoGM1 de sèrum de conills immunitzats amb asialoGM1 i les IgG anti-gangliòsid purificades d'aquests. Aquests resultats suggereixen que els anticossos anti-asialoGM1 bloquegen la transmissió neuromuscular per supressió dels canals de calci en els terminals axònics dels nervis motors. Conclusió a la que també hem arribat nosaltres en els nostres estudis amb els anticossos anti-GM2.

Certes síndromes neuromusculars podrien ser explicades, almenys en part, per anomalies en la funcionalitat dels canals de calci (VDCCs). D'aquestes síndromes són destacables l'esclerosi lateral amiotròfica (ALS; *Amyotrophic Lateral Sclerosis*) i la síndrome miastènica *Lambert-Eaton* (LEMS), les quals tenen algunes similituds clíniques i electrofisiològiques amb el nostre pacient.

L'esclerosi lateral amiotròfica (ALS) és una malaltia neuromuscular caracteritzada per la degeneració selectiva i mort de les motoneurons. La seva etiopatologia és desconeguda, però en els últims vint anys han sorgit evidències que donen suport a un mecanisme autoimmune (Appel i cols., 1986) entre altres possibilitats. El perfil clínic i electrofisiològic inicial del nostre pacient (una síndrome purament motora amb canvis en l'amplitud dels potencials d'acció motors o CMAPs) té alguns punts en comú amb els pacients amb ALS. La falta d'atròfia muscular, la disminució de l'amplitud i la dispersió dels potencials compostos del nostre pacient, ens van fer descartar l'esclerosi lateral amiotròfica. Un augment del calci citosòlic sembla ser la causa de la degeneració neuronal descrita en pacients amb ALS (Pullen i Humphreys, 2000). Per altra banda, diferents estudis han descrit la presència d'anticossos contra canals de calci en pacients amb ALS, suggerint que aquesta activació podria causar l'entrada de calci anormal en els terminals nerviosos i provocar la mort neuronal (Smith i cols., 1994). Experiments realitzats sobre la transmissió neuromuscular mostren que l'aplicació de IgG de sèrum de pacients amb ALS incrementa l'alliberament espontani d'acetilcolina (MEPPs) dels terminals nerviosos *in vitro* (Uchitel i cols., 1988), igual que en els nostres experiments. En experiments *in vivo* aquestes immunoglobulines també augmenten la freqüència del MEPPs (Appel i cols., 1991) i estan relacionades amb bloqueigs dels canals de calci (Fratantoni i cols., 2000). Pel que fa a la neurotransmissió evocada, en incubacions curtes del sèrum de pacients ALS sobre les unions neuromusculars el contingut quàntic augmenta poc (O'Shaughnessy i cols., 1998) i en aplicacions *in vivo* no es modifica (Fratantoni i cols., 2000). Estudis d'immunolocalització mostren acumulació de les IgG del sèrum de malalts amb ALS en el soma de les motoneurons del nervi facial, que és el nervi que va a innervar el múscul LAL, quan aquest múscul és immunitzat amb IgG de malalts ALS (Fratantoni i cols., 1996); mostrant així una possible via d'actuació

d'aquests anticossos en aquesta malaltia, via un transport axonal retrògrad fins al cos neural on desencadenarien diferents efectes que portarien a la malaltia.

La síndrome de Lambert-Eaton és una malaltia autoimmune provocada per anticossos contra VDCCs presinàptics, sobretot contra el canal tipus P/Q (Satoh i cols., 1998; Flink i Atchison, 2003). El perfil clínic és predominantment motor, i com en el nostre pacient, l'amplitud del potencial d'acció muscular compost és molt baix en absència d'atròfia muscular. En canvi, a diferència del nostre cas, en pacients amb LEMS no s'ha descrit desmielinització. Experiments on es va utilitzar sèrum de pacients amb LEMS per veure el funcionament de la sinapsi neuromuscular van mostrar que hi havia un bloqueig del contingut quàntic relacionat amb una alteració dels VDCCs (Roberts i cols., 1985; Peers i cols., 1993). Aquestes dades han estat confirmades recentment per un estudi de Flink i Atchison (2002) on, en incubacions agudes amb el plasma de malalts amb LEMS sobre diafragma i nervi frènic de ratolí, han trobat que hi ha una reducció del contingut quàntic. Aquests mateixos autors han observat que hi ha una facilitació del segon EPP quan fan estimulació a alta freqüència (característica dels pacients amb LEMS). Uns altres estudis amb anticossos de malalts amb LEMS van mostrar que els potencials espontanis eren normals (Molenaar i cols., 1982), donant a entendre que les vesícules sinàptiques tenen un nombre normal d'ACh i que el funcionament i el nombre d'AChR són normals. L'alteració es trobaria en la maquinària d'alliberament del neurotransmissor i no en la maquinària de recepció; com podria ser el cas del nostre malalt si ens centrem en la neurotransmissió evocada.

El nostre estudi *in vitro* proporciona la primera evidència que el sèrum d'un pacient amb neuropatia crònica purament motora amb desmielinització i amb immunoglobulines IgM anti-[GalNAc β 1-4Gal(3-2 α NeuAc) β 1-] pot inhibir la neurotransmissió evocada en

les unions neuromusculars i provocar un augment de la neurotransmissió espontània, sense activar el complement. A més, els nostres canvis presinàptics són reversibles i mostren una dependència amb el canal de calci tipus P/Q, el que demostra una relació funcional directa entre els gangliòsids amb el terminal comú a GM2 i la maquinària d'alliberament de l'ACh.

La reducció en la neurotransmissió evocada independent del complement per un costat i l'increment en la neurotransmissió espontània dependent de complement per l'altra, que trobem en els nostres experiments, pot estar relacionada amb una interacció complexa de les immunoglobulines del nostre pacient amb diferents mecanismes d'enllaç dels gangliòsids al canal de calci tipus P/Q. Aquest fet dona suport a la idea que els anticossos anti-gangliòsids puguin tenir una doble via d'actuació (Slater, 2001; Buchwald i cols., 2002).

5.4.- Efecte de l'aplicació crònica de les IgM monoclonals sobre el múscul LAL de ratolins adults

Veient els efectes sobre la neurotransmissió, que provocaven les IgM monoclonals anti-gangliòsids del nostre malalt en incubacions curtes i sabent que la malaltia del pacient era crònica, vam estudiar els efectes provocats sobre les sinapsis neuromusculars d'un ratolí adult quan aquestes eren exposades crònicament a les mIgM. Això ens ha permès analitzar les accions fisiològiques dels gangliòsids en la unió neuromuscular i la possible fisiopatologia subjacent a aquesta malaltia.

En aquest estudi *in vivo* no es va reproduir un model de la malaltia del pacient donat que únicament es van incubar les mIgM aïllades del pacient en el múscul LAL de ratolí i no

tot el sèrum. Vam triar d'estudiar l'efecte de les mIgM sobre les unions neuromusculars ja que en els estudis d'incubació aguda les immunoglobulines tenien efecte sobre la neurotransmissió per si soles.

Les principals troballes d'aquest estudi crònic van ser: 1) en la neurografia motora dels músculs LALs tractats amb les IgM actives, es mostra amplituds dels potencials disminuïdes, semblants als estudis electrofisiològics del pacient, que suggereixen neuropatia axonal moderada o bloqueig de la unió neuromuscular; 2) en els estudis morfològics d'aquests músculs, s'aprecien signes de remodelació plàstica del terminal nerviós i desestructuració de les beines de mielina en els nervis intramusculars; i 3) en l'electrofisiologia intracel·lular, es demostra un menor alliberament del neurotransmissor i una expressió immadura dels canals de calci similar a la que succeeix durant el desenvolupament i la regeneració de les sinapsis neuromusculars. Tots aquests canvis estan en concordança amb el diagnòstic del nostre pacient de neuropatia purament motora.

5.4.1.- Estudis preliminars

Per realitzar els estudis crònics, es van realitzar injeccions subcutànies en el múscul LAL de ratolins adults de les diferents solucions que entren en el nostre estudi (veure Taula 2) cada 48 h durant 15 dies.

Es va triar el múscul LAL per les seves característiques morfològiques i per la seva fàcil accessibilitat per introduir drogues o solucions *in vivo* (veure apartat 3.7.2.2 de Material i Mètodes). Un altre punt a destacar és el protocol escollit per realitzar els experiments

in vivo. A diferència de les injeccions intraperitoneals (i.p.) que fan altres autors (Willison i cols., 1996; Goodyear i cols., 1999; Flink i Atchison, 2002), les injeccions subcutànies (s.c.) ens permet l'estudi més acurat de les sinapsis neuromusculars ja que els anticossos han estat aplicats directament sobre el múscul i no han arribat per difusió, on els efectes podrien ser menors o estar atenuats. Aquest model d'estudi amb injeccions subcutànies és molt utilitzat en la nostra unitat (Santafe i cols., 2000; Lanuza i cols., 2002 i 2003) i per altres autors (Fratantoni i cols., 2000) per veure l'efecte d'una droga o d'uns anticossos (en el nostre cas) sobre les unions neuromusculars. Què les punxades fossin repetitives es degut al fet que en els estudis aguts es va veure que els efectes de les IgM sobre la neurotransmissió eren reversibles després d'un rentat (apartat 4.3 de Resultats). La repetició es va produir cada 48 hores per l'experiència prèvia de la nostra unitat en la injecció repetitiva de llarga durada en aquest múscul amb substàncies reversibles (Tomas i cols., 2000).

Amb experiments d'electrofisiologia intracel·lular sobre músculs LALs (Figura 24), es va fer la correspondència entre la dilució de les IgM utilitzada en el diafragma (1/9; títol 1/18000) i la dilució usada en el LAL (1/18; títol 1/10000). La diferència en el títol és degut segurament a les característiques morfològiques del LAL comentades anteriorment (múscul pla i prim, amb poques capes cel·lulars).

En experiments preliminars en el nostre laboratori (estudis d'impregnació argèntica i hematoxilina/eosina; Figura 25), es va observar una moderada reacció inflamatòria quan els músculs LALs eren exposats crònicament a les mIgM. Amb aquest experiments també vam determinar que aquesta reacció inflamatòria ens dificultava, des del punt de vista tècnic, tan els estudis morfològics com electrofisiològics (no oblidem que el LAL

és un múscul extremadament pla i prim de difícil manipulació). Per tant, per realitzar l'estudi d'incubació *in vivo* de les mIgM, es va disminuir aquesta reacció inflamatòria amb corticoides. Vam triar un protocol força usual en pacients humans: administrar Urbason^R i.p. un dia abans i durant els tres primers dies del protocol d'injeccions s.c. (Material i Mètodes apartat 3.7.2.2 i Taula 2). En els mateixos experiments preliminars es va veure que l'efecte de les IgM administrades crònicament sobre la neurotransmissió era màxim a les 2 setmanes i que posteriorment es feia constant (no es mostren les dades). Per tant, els nostres protocols d'injeccions van durar 15 dies.

Ha estat descrit prèviament que tractaments llargs amb glucocorticoides, i els seus efectes anti-inflamatoris, influeixen en la resposta dels sistema nerviós dels mamífers enfront del dany. Per exemple, s'ha descrit que els corticoids podrien suprimir la lesió induïda per adrenalina en el sistema nerviós central de rata (Scheff i Dekosky, 1989) i que també poden promoure el creixement i la regeneració de les neurites després d'una dennervació de les cèl·lules de l'arrel dorsal (Tsai i cols., 2002). A més, sembla ser que exposicions durant períodes curts a corticoides tenen una acció facilitadora directa en la transmissió neuromuscular (Dalkara i Onur, 1987). En el nostre cas, després de realitzar els diferents controls (Taula 2), no vam trobar cap modificació, ni aguda ni crònica, de la transmissió neuromuscular o canvis morfològics en les unions neuromusculars sota les nostres condicions de treball que es pogués atribuir als corticoides (apartat 4.4.2 i 4.4.4 de Resultat). En canvi, els efectes produïts per les mIgM actives del nostre pacient en la sinapsi neuromuscular poden ser superiors als que es descriuen en aquest treball degut al tractament anti-inflamatori de quatre dies utilitzat. En aquest mateix sentit, Flink i Atchison (2002) utilitzant un tractament previ amb l'anti-inflamatori ciclofosfamida per suprimir la resposta immune provocada per la injecció i.p. diària de

plasma de pacients amb síndrome de Lambert-Eaton (LEMS) en ratolins adults durant un mes, tampoc van detectar canvis en les seves observacions electrofisiològiques.

Amb aquests precedents, podem dir que les nostres dades podrien estar infra-valorades.

No es pot descartar que bona part del que es descriu en aquest treball hagués pogut ser més marcat si no fos pel tractament anti-inflamatori.

La falta d'anomalies patològiques majors comprovada en el microscopi òptic després de la transferència passiva dels anticossos (apartat 4.4.1 de Resultats; Figura 25), suggereixen que les anomalies electrofisiològiques i morfològiques que s'han trobat en els músculs tractats amb IgM actives no són el resultat de grans agressions i poden representar un efecte fisiològic més que un efecte proinflamatori dels anticossos anti-GM2.

5.4.2.- Canvis estructurals en les unions neuromusculars induïts pels anticossos

Vam estudiar la morfologia dels terminals nerviosos motors dels músculs LALs tractats amb les diferents solucions per descartar l'existència d'alteracions compatibles amb la ruptura de membranes o simplement secundaries a una disminució perllongada de l'activitat muscular, com ha estat descrit prèviament (Santafe i cols., 2000; O'Hanlon i cols., 2001 i 2003; Halstead i cols., 2004).

Com ja hem comentat en l'apartat de Resultats 4.4.2, en estudis anteriors de la nostra unitat es va observar un 3 % de les unions neuromusculars (NMJs) amb signes de plasticitat sinàptica en músculs LALs d'animals adults normals (Tomas i cols., 1989 i 2000), indicant que hi ha un mínim remodelament en l'adult normal. Els nostres

resultats (Taula 3) indiquen que les unions neuromusculars de ratolí adult sofreixen canvis plàstics per l'aplicació repetitiva d'unes mIgM anti-gangliòsids que són superiors al 3 %. Els efectes de les mIgM sobre les NMJs mostren que hi havia sinapsis que patien retraccions del terminal nerviós (Figura 26A) i en d'altres s'observava la presència de creixements o rebrots axonal (*sprouts*; Figura 26B), signes tots dos de remodelament del terminal nerviós provocat per inactivitat (veure apartat 5.4.4 on es veuen els canvis funcionals). L'aparició de rebrots axonals ja va ser descrit en un estudi anterior de la nostra unitat, on també es provocava el bloqueig de la neurotransmissió aquest cop per injecció subcutània de toxina botulínica en els músculs LALs de ratolins adults (Santafe i cols., 2000).

En els estudis morfològics inclús vam observar imatges compatibles amb multiinervació (Figura 26B). Dada que vam descartar posteriorment amb els experiments d'electrofisiologia intracel·lular, donat que no van apareixer signes funcionals compatibles amb la multiinervació (veure explicació més endavant). Aquesta branca addicional en les sinapsis seria un *sprout* troncal, un rebrot de la mateixa branca axonal (per més detalls sobre els *sprouts* en músculs de mamífers veure Tomas i cols., 1989).

En els experiments de microscopia electrònica de transmissió (Figura 28) s'aprecia una separació de les diferents capes de la beina de mielina en els nervis que van a innervar el múscul LAL de ratolins que han rebut les mIgM actives, a diferència de l'estructura normal de les beines dels nervis intramusculars dels Control IV. Aquesta desestructuració podria explicar la desmielinització que sofreix el nostre pacient.

Els canvis morfològics en el terminal nerviós de retracció-creixement axonal induïts pels anticossos anti-GM2 descrits en el nostre estudi, són similars als trobats en el

sistema nerviós perifèric (SNP) de ratolins *knockout* en gangliòsids complexes i de ratolins que són deficients en la glicoproteïna associada a mielina (*Myelin-Associated Glycoprotein: MAG*) (Yin i cols., 1998; Sheikh i cols., 1999b). En els nervis perifèrics d'aquests animals *knockout* s'aprecien signes de desmielinització-remielinització, creixement o *sprouting* axonal i degeneració axonal. En els nostres estudis no apreciem degeneració axonal i amb els experiments de microscopia electrònica s'observa una separació de les beines de mielina que ha de ser estudiada amb nous experiments.

La proteïna MAG s'expressa en la mielina i s'ha demostrat que fa de mediador en certes interaccions cel·lulars entre l'axó i la glia (Schnaar i cols., 1998). Diferents estudis mostren que els gangliòsids són lligands per aquesta glicoproteïna (Vinson i cols., 2001; Vyas i cols., 2002). Grados-Munro i Fournier (2003) descriuen que els gangliòsids GD1a i GT1b, situats en les membranes axonals, són receptors funcionals i actuen en la inhibició del creixement axonal relacionat amb aquesta glicoproteïna. Per una altra banda, diferents estudis han trobat que anticossos anti-MAG estan relacionats amb neuropaties cròniques desmielinitzants amb component monoclonal IgM (Latov, 1990). A diferència del nostre pacient, els malalts amb aquests anticossos donen neuropaties amb afectació tant sensitiva com motora. En biòpsies de nervis surals, pacients amb anticossos anti-MAG presenten desmielinització crònica acompanyada de degeneració axonal i dipòsits de IgM en la mielina (Willison i Yuki, 2002). Aquest dipòsits de IgM anti-MAG s'ha vist, per microscopia electrònica, que provoquen separació de les beines de mielina de nervis perifèrics de pacients amb neuropatia (Ritz i cols., 1999), molt semblant a la que nosaltres descrivim en les nostres observacions de microscopia electrònica. L'alteració de la proteïna MAG per anticossos també provoca una neuropatia crònica desmielinitzant i per altra part, el dèficit d'aquesta proteïna indueix

canvis morfològics en el sistema perifèric (Yin i cols., 1998), similars als trobats en els nostres experiment.

Ratolins *knockout* deficients en gangliòsids complexes, com GM2, mostren signes de desmielinització-mielinització en nervis perifèrics i canvis de creixement-atrofia axonal (Sheikh i cols., 1999b). Aquestes observacions suggereixen que en el SNP, els gangliòsids complexes són necessaris per mantenir la integritat de la beina de mielina. La degeneració axonal Walleriana mostrada per aquests ratolins tant en nervis perifèrics com en nervis centrals, indiquen que els gangliòsids complexes també són importats pel manteniment de la integritat dels axons. Aquest mateixos autors diuen que els ratolins *knockout* en gangliòsids complexes tenen la proteïna MAG reduïda. En un estudi més recent, Sugiura i col·laboradors (2005) reafirmen que els gangliòsids complexes són essencials pel manteniment de la integritat i funció del sistema nerviós. Contràriament a aquests treballs, altres autors no han trobat defectes en la funció sinàptica de les unions neuromusculars en ratolins que els hi falten els gangliòsids complexes (Bullens i cols., 2002), suggerint que aquests gangliòsids serien redundants per la neurotransmissió.

En un altre estudi recent Pan i col·laboradors (2005) han trobat un grau de degeneració axonal similar tant en *knockout* per MAG com per gangliòsids complexes, el que ens confirma que aquestes molècules estan molt relacionades entre si i amb la integritat de l'axó i la mielina.

Una altra possible explicació per produir els efectes morfològics trobats en els nostres estudis seria l'activació del complement per la unió de les IgM anti-gangliòsids al seu antigen, mecanisme d'acció que postulen diferents autors perquè els anticossos anti-gangliòsids provoquin malalties neuromusculars (O'Hanlon i cols., 2001; 2002 i 2003; Halstead i cols., 2004; Bullens i cols., 2005; Goodfellow i cols., 2005; Halstead i cols.,

2005b; Willison, 2005 i 2006). Els canvis que es produïrien per l'activació del complement serien del tipus dennervació (donant imatges compatibles amb retraccions de tot el terminal) i reinnervació posterior (donant imatges llunyanament compatibles amb *sprouts*). En els nostres estudis d'immunohistoquímica amb l'anticòs anti-C5b-9 (Figura 27A) es demostra que no hi havia fixació d'aquest anticòs en les sinapsis neuromusculars de ratolins tractats solament amb les mIgM anti-GM2, indicant que no es produïa l'activació del complement de ratolí (únicament es troba marca de C5b-9 en les sinapsis on s'injectava complement humà juntament amb les mIgM; Figura 27B). Per tant, en els nostres estudis els canvis morfològics no eren provocats per l'activació del complement, sinó que les pròpies immunoglobulines eren les que alteraven el funcionament de la neurotransmissió quan interactuaven amb els gangliòsids. Les dades morfològiques trobades en aquest estudi no indiquen dennervació donat que no es troben en cap moment components postsinàptics sense el seu corresponent axó ni retracció de tot el terminal nerviós, només d'algunes de les seves branques (Figura 26). Tampoc s'apreciem dades indicatives de reinnervació ja que els *sprouts* sortien de terminals consolidats preexistents i orientats cap a la mateixa fibra muscular que innervaven. A més l'existència d'un important percentatge de sinapsi on coexistien les retraccions i els *sprouts* no pot ser explicada per la via de la dennervació-reinnervació. L'activació del complement per part de les mIgM anti-GM2 també hagués comportat l'activació de diferents cèl·lules del sistema immunitari i, en els nostres estudis preliminars no es va trobar cap signe que ens indiqui aquest fet (no s'observa l'aparició d'infiltrats amb macròfags; Figura 25).

Els nostres resultats morfològics indiquen l'important paper jugat pels diferents gangliòsids en la interacció entre axó i glia i que, els gangliòsids complexos com el

GM2, són crucials per la funció sinàptica donat que un mal funcionament d'aquests provoca canvis estructurals i funcionals (veure més endavant) en la unió neuromuscular de mamífer adult.

5.4.3.- Neurografies motores

Degut a que el nostre pacient presentava un quadre clínic de desmielinització, a que en els nostres estudis vam immunolocalitzar el GM2 en la beina de mielina i en l'axó i a que diferents estudis demostren que hi ha un bloqueig de la conducció provocat per anticossos anti-gangliòsids (Santoro i cols., 1992; Uncini i cols., 1993), vam estudiar l'efecte de les immunoglobulines del nostre pacient sobre la conducció nerviosa.

Els estudis de conducció realitzats en el nostre treball, mostren una baixada dels potencials d'acció compostos (CMAPs) en els músculs LALs tractats amb les mIgM actives. En canvi, tant en els músculs tractats amb IgM desactivades com en els músculs d'animals no tractats (Control I) es veu una baixada de l'amplada dels CMAPs no significativa (veure Figura 29).

Tot i la limitació que comporta el curt trajecte de nervi estimulat, no es va apreciar cap canvi en la latència d'aparició del potencial i per tant, en la velocitat de conducció. Amb la incubació de les IgM aïllades, sense complement, no s'observaven dades electrofisiològiques que suggereixin desmielinització. Per tot això, les neurografies motores dels músculs LALs tractats amb mIgM actives del pacient mostren dades compatibles amb una neuropatia axonal o amb un bloqueig de la unió neuromuscular, igual que es va veure en l'estudi electrofisiològic del pacient.

Els bloqueigs de conducció *in vivo* ja han estat estudiats prèviament per altres autors en nervis de rata. Injeccions intraneurals de sèrums humans amb anticossos anti-GM1 produeixen un bloqueig agut de la conducció en nervis ciàtics de rata (Santoro i cols., 1992; Uncini i cols., 1993). Aquests mateixos autors van demostrar que el bloqueig de conducció es podia explicar per processos de desmielinització dels axons motors i de la regió nodal. A més a més, per tècniques d'immunohistoquímica, també van trobar dipòsits de complement i immunoglobulines en els nòduls de Ranvier. Contràriament a aquests estudis, Harvey i col·laboradors (1995) no van trobar canvis, ni histològics ni electrofisiològic, després de 8 dies d'haver injectat sèrum humà amb anticossos anti-gangliòsid contra GQ1b en el nervi tibial de rates. Únicament van poder apreciar fixació d'immunoglobulines en la regió dels nòduls de Ranvier, sense veure signes de desmielinització.

Els estudis previs de neurografia motora amb anticossos anti-gangliòsids mostren troballes divergents, però la baixada d'amplitud del potencial d'acció muscular compost trobada en els nostres experiments demostra que hi ha un bloqueig de la conducció (com en els estudis de Santoro i col·laboradors (1992) i Uncini i col·laboradors (1993)) provocat per la fixació de les immunoglobulines tant a la unió neuromuscular com en el nervi intramuscular, com hem vist en els experiments d'immunohistoquímica (Figures 18, 19 i 20). Per provocar la desmielinització vista en el pacient, pot ser hauria de ser necessari l'activació del complement donat que la fixació de les mIgM en els nervis intramusculars únicament provoca una mínima desestructuració de les beines que no dona canvis significatius en els paràmetres, latència i velocitat de conducció, relacionats amb la desmielinització. Per avaluar aquesta última dada s'estan portant a terme nous experiments.

5.4.4.- Canvis funcionals en les unions neuromusculars induïts pels anticossos anti-gangliòsids

Estudis electrofisiològics publicats per altres autors mostren canvis, tant en els paràmetres de la neurotransmissió espontànies com evocats, per incubacions curtes del sèrum de pacients amb neuropaties autoimmunes que contenen anticossos anti-gangliòsids (síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Miller-Fisher i el nostre cas de polineuropatia crònica desmielinitzant purament motora) (Buchwald i cols., 1998; Plomp i cols., 1999; Bullens i cols., 2000; Ortiz i cols., 2001). En tots els casos, tant els paràmetres de la neurotransmissió espontània com evocada estan alterats, encara que cada grup ha formulat diferents interpretacions del mecanisme de patogenicitat d'aquests anticossos. Aquestes interpretacions estan basades en l'activació del complement i en la reversibilitat dels efectes.

Amb els nostres estudis d'electrofisiologia intracel·lular realitzats en els músculs tractats durant 15 dies, es demostra que no hi havia un augment de la latència ni tampoc del llindar d'estímul dels potencials de placa evocats o EPPs entre els músculs control i els tractats amb les mIgM actives anti-GM2 del pacient, que indiquessin canvis en la conducció nerviosa provocats pels anticossos. Aquesta dada també s'apreciava en els estudis aguts on tampoc la incubació del sèrum feia variar la latència del EPPs. La baixada dels potencials compostos trobats en els estudis de neurografia motora ens indiquen que els canvis en la conducció són significatius a nivell de nervi, no de sinapsis individuals.

Si s'observen els paràmetres relacionats amb la neurotransmissió evocada (apartat 4.4.4 de Resultats i Taula 4) es troba que únicament hi havia una baixada del contingut quàntic en els músculs de ratolí adult inoculat amb les mIgM anti-gangliòsids actives del pacient, mentre que en els controls no s'apreciava cap diferència significativa; confirmant d'aquesta manera que no hi havia cap variació de la neurotransmissió introduïda per la utilització dels corticoides. La caiguda del contingut quàntic en els músculs tractats amb les mIgM actives ens indica que en aquests músculs hi ha un bloqueig de la neurotransmissió evocada.

Pel que fa a la neurotransmissió espontània, vèiem que en cap del músculs s'observava un increment en la freqüència de l'alliberament d'ACh espontani (Taula 4), com succeïa en els estudis aguts quan s'utilitzava el sèrum del pacient. Aquest fet es degut possiblement a que les mIgM del nostre pacient si que necessiten la presència de complement humà per donar un augment en la freqüència dels MEPPs, com s'ha apuntat en els estudis aguts de neurotransmissió espontània amb les mIgM aïllades (revisar apartat 4.3.2 dels Resultats). Per tant, aquest estudis crònics confirmen que per provocar algun efecte sobre la neurotransmissió espontània, els anticossos del nostre pacient necessiten de la presència de complement humà. Aquest resultat també ens reafirma en la idea de la doble via d'actuació dels anticossos anti-gangliòsids per provocar neuropaties perifèriques com van apuntar Slater (2001) i Buchwald i col·laboradors (2002) en els seus treballs.

Podríem pensar que els efectes provocats pels anticossos anti-GM2 sobre la neurotransmissió evocada es deu a l'activació endògena del complement. En canvi, la possible activació del complement de ratolí en els nostres experiments crònics queda descartada pels estudis d'immunohistoquímica realitzats en els músculs tractats amb

mIgM actives, on no es detecta marca pel anticòs anti-C5b-9 que mostra afinitat pel complement activat de ratolí (Figura 27A).

En els nostres registres electrofisiològics no es va apreciar variació en el temps de pujada o en l'amplitud dels MEPPs, ni en el temps de pujada dels EPPs i tampoc canvis en el potencial de repòs de les fibres musculars entre els músculs control i els músculs tractats amb mIgM actives (no es mostren les dades), demostrant que no hi havia una despolarització de la membrana muscular per acció de les immunoglobulines anti-gangliòsids (fet que tampoc s'aprecia en els estudis aguts). Per tant, podem descartar una possible activació dels canals de Na^+ com a mecanisme d'actuació d'aquests anticossos.

Com hem dit, no es va detectar una baixada de l'amplitud dels MEPPs, igual que en els estudis d'electrofisiologia aguts, reafirmant així que no tenim una acció postsinàptica de les mIgM anti-gangliòsids del pacient. No tenim una interacció de les mIgM amb el component postsinàptic de la sinapsi neuromuscular donat que, no es va localitzar el gangliòsid diana d'aquest anticossos en la fibra muscular (veure apartat 4.2.1 de Resultats) i tampoc, es va detectar una variació de l'amplitud dels MEPPs ni en els estudis aguts ni crònics (apartats 4.3 i 4.4 de Resultats).

L'acció de les nostres mIgM anti-GM2 sobre múscul esquelètic durant un període d'inoculació relativament llarg és provocar un bloqueig de la neurotransmissió evocada (tenim una baixada del contingut quàntic calculat mitjançant l'amplitud dels EPPs), sense modificar la freqüència ni l'amplitud dels MEPPs. Com en els estudis d'electrofisiologia intracel·lular aguts, les immunoglobulines anti-GM2 injectades crònicament en músculs de ratolí adult tenen efectes diferents sobre la transmissió

neuromuscular. Per tant, la diferent manera d'actuar de les mIgM anti-gangliòsids sobre la neurotransmissió en els estudis crònics podria ser deguda a la diferent interacció d'aquests anticossos amb els gangliòsids i a l'activació o no del complement (Slater, 2001; Buchwald i cols., 2002).

En experiments l'electrofisiologia intracel·lular i utilitzant preparacions de diafragma i nervi frènic de ratolins que prèviament havien rebut injeccions i.p. d'anticossos anti-gangliòsids (en aquest cas anticossos anti-GQ1b, GD3 i GT1a), Goodyear i col·laboradors (1999) van trobar que aquestes immunoglobulines provocaven un augment massiu de la freqüència dels MEPPs seguit d'un bloqueig dels EPPs. Aquests efectes es donaven després afegir en el bany sèrum humà com a font de complement. Els efectes sobre la neurotransmissió d'aquests ratolins immunitzats són els mateixos que havien descrit els propis autors i altres del mateix grup (Plomp i cols., 1999) en incubacions agudes de preparacions de ratolins sans amb anticossos anti-GQ1b i complement. En els nostres estudis *in vivo* aquesta activació del complement humà no es dona perquè únicament vam inocular el múscul amb IgM aïllades i l'activació endògena del complement (del propi ratolí) no es va produir (apartat 4.4.2 de Resultats). Per tant, el bloqueig de la neurotransmissió observat en les nostres preparacions es deu a que les nostres immunoglobulines afectaven la fisiologia de la neurotransmissió per l'acció sobre els gangliòsids. Si injectéssim complement humà en els músculs tractats amb les mIgM del nostre pacient, no es descartable un augment de freqüència dels MEPPs descrita en els estudis aguts. La fixació del complement humà per part de les immunoglobulines anti-GM2 del nostre pacient s'ha observat en els estudis d'immunofluorescència (Figura 27B).

Willison i col·laboradors (1996), amb el mateix protocol d'immunització que Goodyear i col·laboradors (1999) però utilitzant IgM anti-disialogangliòsid, observen una caiguda del contingut quàntic i una reducció en la freqüència del MEPPs. Com a conclusió suggereixen un possible efecte dels anticossos en la maquinària d'alliberament del neurotransmissor. Aquest autors també descriuen un augment del llindà de generació dels EPPs donant a entendre que hi ha una reducció de l'excitabilitat del nervi provocada per aquests anticossos. Com ja hem comentat anteriorment, en els nostres estudis no es donava un augment del llindà de generació dels EPPs ni en els estudis aguts ni en els crònics; per tant, les mIgM del nostre pacient no provocaven una reducció de l'excitabilitat del nervi intramuscular. En els nostres experiments tampoc s'ha trobat una reducció de la freqüència dels MEPPs, però sí una disminució del contingut quàntic per acció de les immunoglobulines IgM del nostre pacient; el que ens indica que la maquinària d'alliberament de l'ACh no està destruïda, però sí alterada.

En la bibliografia també apareixen estudis electrofisiològics en preparacions de músculs de ratolins prèviament immunitzats amb immunoglobulines purificades o plasma de pacients amb malalties autoimmunes de la unió neuromuscular. Amb aquest procediment, Flink i Atchinson (2002) descriuen una baixada del contingut quàntic en diafragma i nervi frènic de ratolí després del tractament de 30 dies amb plasma de pacients amb síndrome de Lambert-Eaton (LEMS). Sembla ser que la pertorbació dels canals de calci pels anticossos que es troben en plasma de pacients amb LEMS bloqueja la neurotransmissió, d'una manera molt semblant a la que nosaltres descrivim en els nostres estudis. Pel contrari, Frantantoni i col·laboradors (2000) no troben cap canvi en el contingut quàntic de músculs LAL de ratolins després d'un mes de tractament amb IgG de pacients amb esclerosi lateral amiotròfica (ALS).

En els nostres estudis morfològics, com he comentat abans (apartat 5.4.2), es descriuen imatges compatibles amb el que serien unions neuromusculars multiinnervades (veure per exemple la Figura 26B). S'observava una placa muscular (marcada amb BgTX) on van a parar més d'un axó (marcat amb neurofilament). Amb els estudis d'electrofisiologia intracel·lular es van descartar l'existència de sinapsis multiinervades. Això es així donat que quan s'augmentava el llinar d'estímul perquè aparegués un EPP, no reclutàvem noves sinapsis com seria per la multiinnervació (veure Santafe i cols., 2001 i 2002). Podem concloure que l'aplicació crònica de les mIgM anti-gangliòsids no provoca l'aparició de sinapsis multiinnervades com seria el cas de la reinnervació; sinó que provoca l'aparició de *sprouts* axonals que es podrien explicar per inactivitat (a més inactivitat, més *sprouts*; Santafe i cols., 2000; Tomas i cols., 2000). Les sinapsis poliinervades són visibles en l'eliminació sinàptica que té lloc durant els primers dies postnatsals i després d'una lesió axonal (Katz i cols., 1996; Lanuza i cols., 2001).

Els nostres estudis indiquen que els anticossos anti-gangliòsids del nostre pacient no desencadenen una destrucció axonal per activació del complement, que provoqués dennervació i reinnervació amb l'aparició de sinapsis multiinervades. Tot i que per a la majoria d'autors la participació del complement és el principal mecanisme fisiopatològic pels anticossos anti-gangliòsid (Plomp i cols., 1999; Bullens i cols., 2000; O'Hanlon i cols., 2001; 2002 i 2003; Halstead i cols., 2004; Bullens i cols., 2005; Goodfellow i cols., 2005; Willison, 2006), en el present estudi veiem que les mIgM anti-gangliòsids pertorben la fisiologia dels gangliòsid provocant un bloqueig de la neurotransmissió que fa augmentar els rebrots axonals.

Amb el conjunt d'aquestes dades podem concloure que el bloqueig de la neurotransmissió evocada observat en les sinapsis neuromusculars de ratolí adult, després de l'aplicació de mIgM anti-GM2 durant 15 dies, respon a una alteració funcional dels gangliòsids a nivell de placa motora sense que es doni una activació del complement de l'animal ni dennervació, com seria el cas d'una malaltia immunològica típica (Plomp i cols., 1999) o de reinnervació del terminal (Katz i cols., 1996). En el cas del nostre pacient no podem assegurar que aquest bloqueig de la unió neuromuscular independent de complement sigui la causa de la debilitat que presenta, ja que en aquest cas l'activació del complement humà, present en el sèrum, pot ser determinant.

5.4.5.- Inducció d'un nou tipus de canal de calci pel bloqueig de GM2

En els estudis aguts es va observar una relació entre els gangliòsids i els canals de calci tipus P/Q (revisar apartat 4.3.3 de Resultats) i donat que també es va observar un bloqueig de la neurotransmissió en els estudis crònics, es va estudiar si l'aplicació crònica de les mIgM provocava alguna alteració a nivell de canals de calci.

Amb els estudis d'electrofisiologia intracel·lular es va demostrar la presència d'un nou canal de calci dependent de voltatge tipus L (VDCC-L) implicat en l'alliberament del neurotransmissor de les unions neuromusculars (NMJs) de músculs tractats amb les mIgM actives. Quan s'incubaven els diferents grups de músculs que entraven en el nostre estudi amb els diferents blocadors específics pels canals de calci dependents de voltatge (VDCC; Figures 30 i 31), únicament els músculs tractats amb les mIgM actives es bloquejaven tant amb la ω -Agatoxina-IVA (blocador del canal P/Q) com amb la nitrendipina (blocador del canal L). Per tant, en els músculs tractats amb les

immunoglobulines anti-GM2 actives apareixia o s'expressava un nou canal de calci dependent de voltatge tipus L involucrat en la neurotransmissió d'aquests músculs. La resta dels músculs eren bloquejats pel inhibidor específic del canal P/Q (esperable si recordem que és l'únic canal que trobem implicat en la neurotransmissió muscular de mamífer adult; Uchitel i cols., 1992). El canal de calci tipus N no intervé en l'alliberament del neurotransmissor donat que cap múscul es va veure bloquejat amb la incubació del blocador específic, ω -Conotoxina-GVIA.

Els experiments electrofisiològics van ser confirmats per estudis d'immunohistoquímica (Figura 32), en ells es pot veure com efectivament el canal L apareixia de nou en els músculs després d'un tractament crònic amb mIgM anti-GM2 del pacient amb polineuropatia desmielinitzant. En aquest mateixos estudis, també s'observava l'expressió del canal de calci tipus N tant en músculs control com en músculs tractats amb les mIgM del pacient, encara que en els estudis electrofisiològics van demostrar que no eren funcionals. L'expressió dels canals N en la zona de les sinapsis neuromusculars ja ha estat descrita prèviament per altres autors. Day i col·laboradors (1997) i Westenbroek i col·laboradors (1998) van descriure marcatge pel canal de calci tipus N en la zona de la cèl·lula de Schwann presinàptica, encara que molts estudis electrofisiològics no l'involucrin amb la neurotransmissió (Uchitel i cols., 1992; Santafé i cols., 2001; 2002 i 2003).

L'aparició del VDCC tipus L després d'una exposició perllongada amb mIgM anti-GM2 ens indica una relació entre els gangliòsids GM2 i la regulació del VDCC tipus L.

Altres autors també han trobat l'expressió del canal tipus L en l'adult. Aquest canal apareix en situacions d'immaduresa del terminal nerviós motor, tant per reinnervació (Katz i cols., 1996) com per un bloqueig de la neurotransmissió per l'aplicació de toxina

botulínica (Santafe i cols., 2000). Sembla ser que l'expressió del canal tipus L augmenta amb tractaments que redueixen o bloquegen l'alliberament del neurotransmissor presinàptic induint remodelament o canvis en el terminal nerviós (com passa en el present treball). A diferència de les nostres troballes, el tractament amb toxina botulínica induïx l'expressió d'un canal N funcional.

Altres treballs descriuen l'aparició de canal L funcional canviant les condicions del medi (per exemple Urbano i cols., 2001). Aquest autors proposen que en el terminal nerviós el canal de calci tipus L estaria emmascarat. El període de temps necessari perquè els VDCC-L estiguin involucrats en l'alliberament del neurotransmissor després de la injecció dels mIgM anti-GM2 (15 dies) i donat que, en els estudis d'immunohistoquímica i electrofisiologia amb els anticossos i blocadors específics pels VDCC no es trobava presència latent del canal de calci tipus L en els controls, fa que els nostres estudis no donin suport a la idea que aquests canals estiguin en el terminal d'una forma emmascarada o silent. Podem suggerir que l'aparició d'un canal tipus L funcional es conseqüència de la desregulació, per part dels gangliòsids, dels canals de calci VDCC.

Una altra possibilitat que venim apuntant per provocar bloqueig de la transmissió neuromuscular seria mitjançant una lesió en el terminal nerviós i/o de les cèl·lules de Schwann terminals per l'activació del complement (O'Hanlon i cols., 2001 i 2003; Halstead i cols., 2004; Bullens i cols., 2005; Goodfellow i cols., 2005; Halstead i cols., 2005b; Willison i cols., 2005 i 2006). La consegüent regeneració del terminal nerviós podria conduir a la nova formació de unions neuromusculars amb baix contingut quàntic i a l'expressió del nou canal de calci tipus L, per compensar el dèficit en l'entrada de Ca^{2+} . En els nostres estudis aquesta possibilitat està descartada donat que

no s'observen dipòsits del producte de complement C5b-9 en les unions tractades amb mIgM (Figura 27A), per tant no trobem activació del complement de ratolí. A més de no tenir evidència física de l'activació del complement, no es va trobar cap dada que ens faci considerar la dennervació-reinnervació com una opció sòlida per explicar els nostres resultats.

Creiem que l'exposició continuada de les unions neuromusculars als anticossos anti-gangliòsids produeix un bloqueig de la transmissió per inactivació dels VDCC-P/Q, donat que amb els nostres estudis aguts hem trobat una relació directa entre aquests canals de calci i els gangliòsids GM2; per tant, es produeix una baixada del Ca^{2+} intracel·lular necessari per produir l'exocitosi de l'ACh. Aquesta situació provoca l'aparició d'un nou canal de calci, en aquest cas el canal tipus L, que aportaria el calci necessari per la neurotransmissió durant la recuperació funcional del canal de calci tipus P/Q. De tota manera, una acció més específica entre els gangliòsids de membrana i l'aparició d'un nou canal L no pot ser descartada.

Com ja hem comentat anteriorment, anomalies de la funcionalitat dels canals de calci han estat relacionades amb l'esclerosi lateral amiotròfica (ALS) i amb la síndrome de Lambert-Eaton (LEMS), que tindrien certs punts en comú amb els estudis electrofisiològics del nostre pacient (certes anomalies en els potencials musculars composts).

Diferents estudis *in vivo* amb plasma o IgG de malalts amb aquestes síndromes troben l'expressió funcional d'un nou canal de calci tipus L. Després de l'aplicació de IgG de malalts ALS sobre músculs LALs de ratolí adult, Fratantoni i col·laboradors (2000) troben que la neurotransmissió en aquests músculs es veu afectada pels blocadors específics de canal P/Q i L, indicant l'expressió d'un nou canal L com en el nostre estudi. Flink i Atchison (2002) detecten l'aparició d'un nou canal de calci L en

diafragma dels ratolins adults on se'ls ha injectat intraperitoneal plasma de pacients amb LEMS. Aquests autors suggereixen que l'aparició d'aquest nou canal per un tractament crònic amb plasma de LEMS, no es deu a la degeneració o regeneració del terminal nerviós (Katz i cols., 1996) ni a la simple aparició del canal després d'un tractament amb quelants de Ca^{2+} (Urbano i cols., 2001); sinó que l'aparició d'aquest nou canal de calci es deuria a la baixada de calci produïda en el terminal a causa de la inactivació del canal de calci tipus P/Q provocada pels anticossos (Flink i Atchison, 2003). És possible que l'alteració provocada pels anticossos ALS o LEMS en les unions neuromusculars de mamífers adults sigui capaç d'induir un increment en la sensibilitat als blocadors específics pel canal L, fet que també seria aplicable a les nostres troballes. A més, Flink i Atchison (2003) descriuen que la LEMS és una síndrome que no depèn de l'activació del complement, com en el present estudi.

Donat les semblances que trobem entre l'estudi de Flink i Atchinson (2002 i 2003) sobre la síndrome de Lambert-Eaton i els nostres experiments, podem concloure que l'aparició del nou canal de calci tipus L (en els nostres estudis) es deu a la deficient entrada de calci en el terminal produïda per la inactivitat del canal de calci tipus P/Q per culpa dels anticossos anti-gangliòsids.

Per una altra part, la relació funcional trobada entre el gangliòsid GM2 i la maquinària d'alliberament del neurotransmissor pot ser directa o mitjançant una relació entre el GM2 i la cèl·lula Schwann terminal. La dependència de l'alliberament d'ACh amb anticossos anti-gangliòsids a través dels canals de calci, trobada tant en els experiments aguts com crònics, ens suggereix que en la membrana axonal presinàptica trobem gangliòsids importants per la modulació de la neurotransmissió. Aquests gangliòsids,

que estarien involucrats en la neurotransmissió, es troben tant al terminal nerviós com a la cèl·lula de Schwann. La hipòtesis que els gangliòsids es localitzin en la cèl·lula de Schwann i modulin d'alguna manera l'alliberament del neurotransmissor be reforçada pels estudis de Colomar i Robitaille (2004), on les cèl·lules de Schwann terminals intervenen en la neurotransmissió i en certes formes d'eficàcia sinàptica en cèl·lules d'amfibis. A part, també s'ha descrit que les cèl·lules glials de mamífer posseeixen habitualment VDCC tipus N (Day i cols., 1997).

Per assegurar la participació de les cèl·lules de Schwann terminals en els canvis aguts i crònics de la neurotransmissió sinàptica, descrits en aquest treball, es necessiten futures investigacions. Sobretot perquè no podem establir si hi ha un canvi primari en les cèl·lules de Schwann terminals, que podria suggerir que els canvis axonals són secundaris, o viceversa, deguts a l'aplicació crònica d'immunoglobulines anti-gangliòsids.

El present model de transferència passiva crònica d'anticossos anti-gangliòsids patogènics d'un pacient amb neuropatia autoimmune pot induir una alteració de les sinapsis neuromusculars de ratolí provocada pel sistema immune i podria ser vista, com altres models experimentals (consultar Willison i Yuki, 2002), com una eina per estudiar la funció dels gangliòsids i el seu paper patològic en la malaltia. Les dades que aquí s'exposen donen nous arguments per explicar el valor etiopatològic dels anticossos anti-gangliòsids. Si els gangliòsids estan involucrats en la transmissió neuronal, els anticossos anti-gangliòsids interferiran en la seva funció. La participació del sèrum (i el seu component monoclonal) del pacient en les anomalies de la neurotransmissió experimental (tant a nivell agut com crònic) dona suport a aquesta hipòtesis.

5.5.- Alteracions de la unió neuromuscular en polineuropaties autoimmunes

Les alteracions funcionals de la unió neuromuscular han estat àmpliament estudiades en malalties autoimmunes com la miastènia *gravis*, la síndrome de *Lambert-Eaton* i la neuromiotonia, on s'ha observat que els pacients tenen anticossos en el seu sèrum que reconeixen estructures localitzades en aquesta zona (veure apartat 1.3 de la Introducció). Pel contrari, l'efecte d'una insuficiència funcional de la unió neuromuscular (NMJ) en neuropaties autoimmunes amb símptomes motors, com és el cas del nostre pacient, ha estat poc estudiat. Alteracions tant funcionals com patològiques (disrupcions de membranes) d'estructures localitzades en el terminal nerviós motor o en la cèl·lula de Schwann terminal podrien estar involucrades en el mal funcionament de la placa motora. Anticossos que reconeixen aquestes estructures sinàptiques indueixen bloqueigs de la neurotransmissió (O'Hanlon i cols., 2001; Ortiz i cols., 2001; O'Hanlon i cols., 2002 i 2003; Halstead i cols., 2004; Goodfellow i cols., 2005; Santafe i cols., 2005; Willison, 2005 i 2006).

La síndrome d'AMAN (*Acute Motor Axonal Neuropathy*; una variant axonal de la GBS) es considerada com una neuropatia axonal donat que l'amplitud dels seus potencials d'acció motors compostos (o CMAPs) estan molt reduïts. Les neuropaties axonals tenen un temps de recuperació molt lent, però hi ha un subgrup de pacients AMAN que milloren ràpidament. Per aquests pacients, la pèrdua transitòria de la funció motora podria estar relacionada amb la unió d'anticossos als nòduls de Ranvier amb el conseqüent bloqueig de conducció per desmielinització distal sense dany axonal o seria degut a dany axonal en la porció distal del nervi motor (Ho i cols., 1997). Una altra

possible explicació és que els anticossos que hi puguin estar augmentats (en molts casos anticossos anti-gangliòsids), indueixin bloqueig neuromuscular presinàptic i que sigui revertit ràpidament després d'un tractament amb immunoglobulines endovenoses (Jacobs i cols., 2003).

De fet, estudis recents han demostrat alteracions funcionals en la unió neuromuscular de pacients amb síndrome de Guillain-Barré (GBS). Utilitzant electromiografia d'estimulació de fibra única (o *jitter*) per avaluar la funcionalitat de la unió neuromuscular, Spaans i col·laboradors (2003) van descriure que 9/9 pacients amb GBS mostraven un *jitter* incrementat i bloqueig intermitent dels potencials d'acció de fibres musculars. Una dada interessant és el fet que es van detectar anticossos anti-gangliòsids en el sèrum de 5/9 d'aquests pacients. Aquests autors conclouen que una disfunció en la transmissió neuromuscular té un paper en la patofisiologia de la GBS. De la mateixa manera, Lo i col·laboradors (2004) mostren com pacients amb oftalmoplegia aguda i títols alts d'anticossos anti-GQ1b en el seu sèrum (que correlacionen amb la recuperació clínica) tenen electromiografia de fibra única anormals.

Els estudis de fibra única (Spaans *i cols.*, 2003; Lo *i cols.*, 2004), juntament amb els nostres i d'altres (Taguchi *i cols.*, 2004a i 2004b), ens confirmen que la placa motora està involucrada en neuropaties autoimmunes amb símptomes motors. En aquest estudi hem demostrat que hi ha un bloqueig de transmissió sinàptica provocat per anticossos anti-gangliòsids tant a nivell crònic com agut, que aquestes immunoglobulines indueixen canvis plàstics en la sinapsi neuromuscular tant a nivell morfològic com funcional (veiem l'aparició d'un nou canal de calci) i que bloquegen la conducció nerviosa.

L'aplicació més important d'aquestes dades és que la unió neuromuscular pot ser modulada per drogues, com inhibidors de la colinesterasa i la 3,4-diaminopiridina (inhibidor dels canals de K^+ que fa augmentar la despolarització del terminal nerviós i per tant, augmenten el Ca^{2+} intracel·lular donat que els canals de calci estan oberts més temps), les quals podrien servir per tractar les anomalies funcionals i millorar parcialment els símptomes motors de les neuropaties autoimmunes.

6.- CONCLUSIONS

1.- El component monoclonal de classe IgM detectat en el sèrum d'un pacient afecte d'una polineuropatia desmielinitzant purament motora reconeix de forma específica la seqüència carbohidratada terminal [GalNAc β 1-4Gal(3-2 α NeuAc) β 1-], comú als gangliòsids GM2, GD1a-GalNAc i GM1b-GalNAc.

2.- En ratolins adults normals, aquests gangliòsids es localitzen a: la part presinàptica de la sinapsi neuromuscular (tant a l'axó com a la cèl·lula de Schwann) i en els nervis perifèrics (tant a la beina de mielina com en l'axó).

3- Les IgM del sèrum del pacient provoquen un bloqueig de la neurotransmissió evocada, tant pel que fa al contingut quàntic com en l'amplitud dels EPPs, d'una manera reversible. Aquesta acció no varia al llarg del temps, a més tampoc afecta la velocitat de conducció nerviosa. Aquest bloqueig neuromuscular s'ha observat tant en exposicions agudes en estudis *in vitro* com en els estudis crònics en animals vius.

4.- Les IgM del sèrum del malalt incrementen de forma aguda la freqüència espontània dels MEPPs d'una manera reversible. Aquesta acció augmenta amb el temps. En els estudis crònics no es veu modificada la freqüència de la neurotransmissió espontània.

5.- Els canals de calci VDCC estan involucrats en el mecanisme d'acció dels gangliòsids en l'alliberament del neurotransmissor. Els del tipus P i L en la resposta evocada i el de tipus P en la neurotransmissió espontània.

6.- Les IgM del pacient inoculades crònicament indueixen remodelament del terminal nerviós amb creixements i/o retraccions axonals. A més, indueixen desestructuració de les beines de mielina.

7.- La neurografia motora dels músculs tractats amb IgM anti-gangliòsids del pacient mostren una disminució de l'amplitud del potencial d'acció compost que pot ser explicada pel bloqueig neuromuscular.

8.- Les mIgM del malalt no activen el complement del ratolí, per tant les alteracions trobades no estan provocades per destrucció de membrana per part del complement. D'aquesta manera podem deduir que els resultats aquí exposats responen majoritàriament a una interferència de les funcions fisiològiques dels gangliòsids per part de les IgM. A diferència del nostre model les IgM del pacient activen complement humà, donant a entendre que les alteracions fisiopatològiques del pacient poden estar perfectament provocades per lesió de membrana mediada pel complement. Els resultats aquí exposats donen suport a la idea de la doble via (lesió de membrana i alteració de la fisiologia dels gangliòsids) d'actuació dels anticossos anti-gangliòsids en les neuropaties autoimmunes.

7.- BIBLIOGRAFIA

- Ando, S., Tanaka, Y., Waki, H., Kon, K., Iwamoto, M. & Fukui, F. (1998) Gangliosides and sialylcholesterol as modulators of synaptic functions. *Ann N Y Acad Sci*, **845**, 232-239.
- Angaut-Petit, D., Molgo, J., Connold, A.L. & Faille, L. (1987) The levator auris longus muscle of the mouse: a convenient preparation for studies of short- and long-term presynaptic effects of drugs or toxins. *Neurosci Lett*, **82**, 83-88.
- Angstrom, J., Teneberg, S. & Karlsson, K.A. (1994) Delineation and comparison of ganglioside-binding epitopes for the toxins of *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, and *Clostridium tetani*: evidence for overlapping epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11859-11863.
- Appel, S.H., Engelhardt, J.I., Garcia, J. & Stefani, E. (1991) Immunoglobulins from animal models of motor neuron disease and from human amyotrophic lateral sclerosis patients passively transfer physiological abnormalities to the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 647-651.
- Appel, S.H., Stockton-Appel, V., Stewart, S.S. & Kerman, R.H. (1986) Amyotrophic lateral sclerosis. Associated clinical disorders and immunological evaluations. *Arch Neurol*, **43**, 234-238.
- Arasaki, K., Kusunoki, S., Kudo, N. & Kanazawa, I. (1993) Acute conduction block in vitro following exposure to antiganglioside sera. *Muscle Nerve*, **16**, 587-593.
- Atchison, W.D. (1989) Dihydropyridine-sensitive and -insensitive components of acetylcholine release from rat motor nerve terminals. *J Pharmacol Exp Ther*, **251**, 672-678.
- Baumann, N., Harpin, M.L., Marie, Y., Lemerle, K., Chassande, B., Bouche, P., Meininger, V., Yu, R.K. & Leger, J.M. (1998) Antiglycolipid antibodies in motor neuropathies. *Ann N Y Acad Sci*, **845**, 322-329.
- Bekoff, A. & Betz, W. (1977) Properties of isolated adult rat muscle fibres maintained in tissue culture. *J Physiol*, **271**, 537-547.
- Birks, R., Katz, B. & Miledi, R. (1960) Physiological and structural changes at the amphibian myoneural junction, in the course of nerve degeneration. *J Physiol*, **150**, 145-168.
- Birks, R.I. (1974) The relationship of transmitter release and storage to fine structure in a sympathetic ganglion. *J Neurocytol*, **3**, 133-160.
- Bowersox, S.S., Miljanich, G.P., Sugiura, Y., Li, C., Nadasdi, L., Hoffman, B.B., Ramachandran, J. & Ko, C.P. (1995) Differential blockade of voltage-sensitive calcium channels at the mouse neuromuscular junction by novel omega-conopeptides and omega-agatoxin-IVA. *J Pharmacol Exp Ther*, **273**, 248-256.
- Buccoliero, R., Bodennec, J. & Futerman, A.H. (2002) The role of sphingolipids in neuronal development: lessons from models of sphingolipid storage diseases. *Neurochem Res*, **27**, 565-574.
- Buchwald, B., Ahangari, R. & Toyka, K.V. (2002) Differential blocking effects of the monoclonal anti-GQ1b IgM antibody and alpha-latrotoxin in the absence of complement at the mouse neuromuscular junction. *Neurosci Lett*, **334**, 25-28.
- Buchwald, B., Bufler, J., Carpo, M., Heidenreich, F., Pitz, R., Dudel, J., Nobile-Orazio, E. & Toyka, K.V. (2001) Combined pre- and postsynaptic action of IgG antibodies in Miller Fisher syndrome. *Neurology*, **56**, 67-74.
- Buchwald, B., Toyka, K.V., Zielasek, J., Weishaupt, A., Schweiger, S. & Dudel, J. (1998) Neuromuscular blockade by IgG antibodies from patients with Guillain-Barre syndrome: a macro-patch-clamp study. *Ann Neurol*, **44**, 913-922.

- Bullens, R.W., Halstead, S.K., O'Hanlon, G.M., Veitch, J., Molenaar, P.C., Willison, H.J. & Plomp, J.J. (2005) Concanavalin A inhibits pathophysiological effects of anti-ganglioside GQ1b antibodies at the mouse neuromuscular synapse. *Muscle Nerve*, **31**, 751-760.
- Bullens, R.W., O'Hanlon, G.M., Goodyear, C.S., Molenaar, P.C., Conner, J., Willison, H.J. & Plomp, J.J. (2000) Anti-GQ1b antibodies and evoked acetylcholine release at mouse motor endplates. *Muscle Nerve*, **23**, 1035-1043.
- Bullens, R.W., O'Hanlon, G.M., Wagner, E., Molenaar, P.C., Furukawa, K., Plomp, J.J. & Willison, H.J. (2002) Complex gangliosides at the neuromuscular junction are membrane receptors for autoantibodies and botulinum neurotoxin but redundant for normal synaptic function. *J Neurosci*, **22**, 6876-6884.
- Carlson, R.O., Masco, D., Brooker, G. & Spiegel, S. (1994) Endogenous ganglioside GM1 modulates L-type calcium channel activity in N18 neuroblastoma cells. *J Neurosci*, **14**, 2272-2281.
- Catterall, W.A. (1999) Interactions of presynaptic Ca²⁺ channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Ann N Y Acad Sci*, **868**, 144-159.
- Catterall, W.A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 521-555.
- Colomar, A. & Robitaille, R. (2004) Glial modulation of synaptic transmission at the neuromuscular junction. *Glia*, **47**, 284-289.
- Chiba, A., Kusunoki, S., Shimizu, T. & Kanazawa, I. (1992) Serum IgG antibody to ganglioside GQ1b is a possible marker of Miller Fisher syndrome. *Ann Neurol*, **31**, 677-679.
- Dalkara, T. & Onur, R. (1987) Facilitatory effects of dexamethasone on neuromuscular transmission. *Exp Neurol*, **95**, 116-125.
- Daune, G.C., Farrer, R.G., Dalakas, M.C. & Quarles, R.H. (1992) Sensory neuropathy associated with monoclonal immunoglobulin M to GD1b ganglioside. *Ann Neurol*, **31**, 683-685.
- Day, N.C., Wood, S.J., Ince, P.G., Volsen, S.G., Smith, W., Slater, C.R. & Shaw, P.J. (1997) Differential localization of voltage-dependent calcium channel alpha 1 subunits at the human and rat neuromuscular junction. *J Neurosci*, **17**, 6226-6235.
- Del Castillo, J. & Katz, B. (1954) Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol*, **124**, 560-573.
- Eidels, L., Proia, R.L. & Hart, D.A. (1983) Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiol Rev*, **47**, 596-620.
- Engel, A.G., Walls, T.J., Nagel, A. & Uchitel, O. (1990) Newly recognized congenital myasthenic syndromes: I. Congenital paucity of synaptic vesicles and reduced quantal release. II. High-conductance fast-channel syndrome. III. Abnormal acetylcholine receptor (AChR) interaction with acetylcholine. IV. AChR deficiency and short channel-open time. *Prog Brain Res*, **84**, 125-137.
- Fatt, P. & Katz, B. (1951) An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J Physiol*, **115**, 320-370.
- Fatt, P. & Katz, B. (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol*, **117**, 109-128.
- Feasby, T.E. & Hughes, R.A. (1998) Campylobacter jejuni, antiganglioside antibodies, and Guillain-Barre syndrome. *Neurology*, **51**, 340-342.
- Fishman, P.H. (1982) Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins. *J Membr Biol*, **69**, 85-97.

- Flink, M.T. & Atchison, W.D. (2002) Passive transfer of Lambert-Eaton syndrome to mice induces dihydropyridine sensitivity of neuromuscular transmission. *J Physiol*, **543**, 567-576.
- Flink, M.T. & Atchison, W.D. (2003) Ca²⁺ channels as targets of neurological disease: Lambert-Eaton Syndrome and other Ca²⁺ channelopathies. *J Bioenerg Biomembr*, **35**, 697-718.
- Flucher, B.E. & Daniels, M.P. (1989) Distribution of Na⁺ channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kd protein. *Neuron*, **3**, 163-175.
- Fratantoni, S.A., Dubrovsky, A.L. & Uchitel, O.D. (1996) Uptake of immunoglobulin G from amyotrophic lateral sclerosis patients by motor nerve terminals in mice. *J Neurol Sci*, **137**, 97-102.
- Fratantoni, S.A., Weisz, G., Pardal, A.M., Reisin, R.C. & Uchitel, O.D. (2000) Amyotrophic lateral sclerosis IgG-treated neuromuscular junctions develop sensitivity to L-type calcium channel blocker. *Muscle Nerve*, **23**, 543-550.
- Fu, W.M. & Huang, F.L. (1994) L-type Ca²⁺ channel is involved in the regulation of spontaneous transmitter release at developing neuromuscular synapses. *Neuroscience*, **58**, 131-140.
- Gilbert, J. & Benjamin, T. (2004) Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a. *J Virol*, **78**, 12259-12267.
- Goodfellow, J.A., Bowes, T., Sheikh, K., Odaka, M., Halstead, S.K., Humphreys, P.D., Wagner, E.R., Yuki, N., Furukawa, K., Plomp, J.J. & Willison, H.J. (2005) Overexpression of GD1a ganglioside sensitizes motor nerve terminals to anti-GD1a antibody-mediated injury in a model of acute motor axonal neuropathy. *J Neurosci*, **25**, 1620-1628.
- Goodyear, C.S., O'Hanlon, G.M., Plomp, J.J., Wagner, E.R., Morrison, I., Veitch, J., Cochrane, L., Bullens, R.W., Molenaar, P.C., Conner, J. & Willison, H.J. (1999) Monoclonal antibodies raised against Guillain-Barre syndrome-associated *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides react with neuronal gangliosides and paralyze muscle-nerve preparations. *J Clin Invest*, **104**, 697-708.
- Grados-Munro, E.M. & Fournier, A.E. (2003) Myelin-associated inhibitors of axon regeneration. *J Neurosci Res*, **74**, 479-485.
- Gray, D.B., Bruses, J.L. & Pilar, G.R. (1992) Developmental switch in the pharmacology of Ca²⁺ channels coupled to acetylcholine release. *Neuron*, **8**, 715-724.
- Gregson, N.A. (1993) The extraction and analysis of glycosphingolipids. *Methods Mol Biol*, **19**, 287-301.
- Hafer-Macko, C., Hsieh, S.T., Li, C.Y., Ho, T.W., Sheikh, K., Cornblath, D.R., McKhann, G.M., Asbury, A.K. & Griffin, J.W. (1996) Acute motor axonal neuropathy: an antibody-mediated attack on axolemma. *Ann Neurol*, **40**, 635-644.
- Hakomori, S. (1990) Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem*, **265**, 18713-18716.
- Hakomori, S. (2000) Traveling for the glycosphingolipid path. *Glycoconj J*, **17**, 627-647.
- Halstead, S.K., Humphreys, P.D., Goodfellow, J.A., Wagner, E.R., Smith, R.A. & Willison, H.J. (2005a) Complement inhibition abrogates nerve terminal injury in Miller Fisher syndrome. *Ann Neurol*, **58**, 203-210.

- Halstead, S.K., Morrison, I., O'Hanlon, G.M., Humphreys, P.D., Goodfellow, J.A., Plomp, J.J. & Willison, H.J. (2005b) Anti-disialosyl antibodies mediate selective neuronal or Schwann cell injury at mouse neuromuscular junctions. *Glia*, **52**, 177-189.
- Halstead, S.K., O'Hanlon, G.M., Humphreys, P.D., Morrison, D.B., Morgan, B.P., Todd, A.J., Plomp, J.J. & Willison, H.J. (2004) Anti-disialoside antibodies kill perisynaptic Schwann cells and damage motor nerve terminals via membrane attack complex in a murine model of neuropathy. *Brain*, **127**, 2109-2123.
- Hall, Z.W. & Sanes, J.R. (1993) Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell*, **72 Suppl**, 99-121.
- Harvey, G.K., Toyka, K.V., Zielasek, J., Kiefer, R., Simonis, C. & Hartung, H.P. (1995) Failure of anti-GM1 IgG or IgM to induce conduction block following intraneural transfer. *Muscle Nerve*, **18**, 388-394.
- Heuser, J.E. & Reese, T.S. (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*, **57**, 315-344.
- Heuser, J.E., Reese, T.S. & Landis, D.M. (1974) Functional changes in frog neuromuscular junctions studied with freeze-fracture. *J Neurocytol*, **3**, 109-131.
- Hirota, N., Kaji, R., Bostock, H., Shindo, K., Kawasaki, T., Mizutani, K., Oka, N., Kohara, N., Saida, T. & Kimura, J. (1997) The physiological effect of anti-GM1 antibodies on saltatory conduction and transmembrane currents in single motor axons. *Brain*, **120 (Pt 12)**, 2159-2169.
- Ho, T.W., Hsieh, S.T., Nachamkin, I., Willison, H.J., Sheikh, K., Kiehlbauch, J., Flanigan, K., McArthur, J.C., Cornblath, D.R., McKhann, G.M. & Griffin, J.W. (1997) Motor nerve terminal degeneration provides a potential mechanism for rapid recovery in acute motor axonal neuropathy after Campylobacter infection. *Neurology*, **48**, 717-724.
- Ho, T.W., Willison, H.J., Nachamkin, I., Li, C.Y., Veitch, J., Ung, H., Wang, G.R., Liu, R.C., Cornblath, D.R., Asbury, A.K., Griffin, J.W. & McKhann, G.M. (1999) Anti-GD1a antibody is associated with axonal but not demyelinating forms of Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*, **45**, 168-173.
- Hong, S.J. & Chang, C.C. (1995) Inhibition of acetylcholine release from mouse motor nerve by a P-type calcium channel blocker, omega-agatoxin IVA. *J Physiol*, **482 (Pt 2)**, 283-290.
- Hubbard, J.I., Llinas, R. & Quastel, D.M.L. (1969) Electrophysiological Analysis of Synaptic Transmission. Edward Arnold Publishers Ltd, London.
- Hubbard, J.I. & Wilson, D.F. (1973) Neuromuscular transmission in a mammalian preparation in the absence of blocking drugs and the effect of D-tubocurarine. *J Physiol*, **228**, 307-325.
- Huxley, A. & Stampfli, R. (1949) Evidence for saltatory conduction in peripheral myelinated nerve fibers. *J Physiol (London)*, **108**, 315-339.
- Ilyas, A.A., Li, S.C., Chou, D.K., Li, Y.T., Jungalwala, F.B., Dalakas, M.C. & Quarles, R.H. (1988a) Gangliosides GM2, IV4GalNAcGM1b, and IV4GalNAcGC1a as antigens for monoclonal immunoglobulin M in neuropathy associated with gammopathy. *J Biol Chem*, **263**, 4369-4373.
- Ilyas, A.A., Mithen, F.A., Dalakas, M.C., Chen, Z.W. & Cook, S.D. (1992) Antibodies to acidic glycolipids in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol Sci*, **107**, 111-121.

- Ilyas, A.A., Quarles, R.H., Dalakas, M.C. & Brady, R.O. (1985) Polyneuropathy with monoclonal gammopathy: glycolipids are frequently antigens for IgM paraproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 6697-6700.
- Ilyas, A.A., Willison, H.J., Quarles, R.H., Jungalwala, F.B., Cornblath, D.R., Trapp, B.D., Griffin, D.E., Griffin, J.W. & McKhann, G.M. (1988b) Serum antibodies to gangliosides in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*, **23**, 440-447.
- Illa, I., Ortiz, N., Gallard, E., Juarez, C., Grau, J.M. & Dalakas, M.C. (1995) Acute axonal Guillain-Barre syndrome with IgG antibodies against motor axons following parenteral gangliosides. *Ann Neurol*, **38**, 218-224.
- IUPAC-IUB. Commission on Biochemical Nomenclature (1977) The nomenclature of lipids. *Eur J Biochem.*, **79**, 11-21.
- Jacobs, B.C., Bullens, R.W., O'Hanlon, G.M., Ang, C.W., Willison, H.J. & Plomp, J.J. (2002) Detection and prevalence of alpha-latrotoxin-like effects of serum from patients with Guillain-Barre syndrome. *Muscle Nerve*, **25**, 549-558.
- Jacobs, B.C., O'Hanlon, G.M., Bullens, R.W., Veitch, J., Plomp, J.J. & Willison, H.J. (2003) Immunoglobulins inhibit pathophysiological effects of anti-GQ1b-positive sera at motor nerve terminals through inhibition of antibody binding. *Brain*, **126**, 2220-2234.
- Jacobs, B.C., Rothbarth, P.H., van der Meche, F.G., Herbrink, P., Schmitz, P.I., de Klerk, M.A. & van Doorn, P.A. (1998) The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barre syndrome: a case-control study. *Neurology*, **51**, 1110-1115.
- Kandel, E. (1991) Transmitter release. A: Principles of Neural Science. In Kandel, E., Schwatz, JH, Jessell, TM (ed.). Elsevier Science., New York. Cap 13, pp. 194-212.
- Katz, B. & Miledi, R. (1965) The Measurement of Synaptic Delay, and the Time Course of Acetylcholine Release at the Neuromuscular Junction. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **161**, 483-495.
- Katz, B. & Miledi, R. (1979) Estimates of quantal content during 'chemical potentiation' of transmitter release. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **205**, 369-378.
- Katz, E., Ferro, P.A., Weisz, G. & Uchitel, O.D. (1996) Calcium channels involved in synaptic transmission at the mature and regenerating mouse neuromuscular junction. *J Physiol*, **497 (Pt 3)**, 687-697.
- Kessler, K.R. & Benecke, R. (1997) Botulinum toxin: from poison to remedy. *Neurotoxicology*, **18**, 761-770.
- Klenk, E. (1942) Über die Ganglioside, eine neue Gruppe von zuckerhaltigen Gehirnlipiden. *Physiol Chem*. 273: 76-86. (Citat a Svennerholm, 1994).
- Koga, M., Yuki, N. & Hirata, K. (1999) Antiganglioside antibody in patients with Guillain-Barre syndrome who show bulbar palsy as an initial symptom. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **66**, 513-516.
- Koirala, S., Reddy, L.V. & Ko, C.P. (2003) Roles of glial cells in the formation, function, and maintenance of the neuromuscular junction. *J Neurocytol*, **32**, 987-1002.
- Kuffler, S.W. & Yoshikami, D. (1975) The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. *J Physiol*, **251**, 465-482.
- Kusunoki, S., Shimizu, J., Chiba, A., Ugawa, Y., Hitoshi, S. & Kanazawa, I. (1996) Experimental sensory neuropathy induced by sensitization with ganglioside GD1b. *Ann Neurol*, **39**, 424-431.

- Lanuza, M.A., Garcia, N., Gonzalez, C.M., Santafe, M.M., Nelson, P.G. & Tomas, J. (2003) Role and expression of thrombin receptor PAR-1 in muscle cells and neuromuscular junctions during the synapse elimination period in the neonatal rat. *J Neurosci Res*, **73**, 10-21.
- Lanuza, M.A., Garcia, N., Santafe, M., Gonzalez, C.M., Alonso, I., Nelson, P.G. & Tomas, J. (2002) Pre- and postsynaptic maturation of the neuromuscular junction during neonatal synapse elimination depends on protein kinase C. *J Neurosci Res*, **67**, 607-617.
- Lanuza, M.A., Garcia, N., Santafe, M., Nelson, P.G., Fenoll-Brunet, M.R. & Tomas, J. (2001) Pertussis toxin-sensitive G-protein and protein kinase C activity are involved in normal synapse elimination in the neonatal rat muscle. *J Neurosci Res*, **63**, 330-340.
- Latov, N. (1990) Antibodies to glycoconjugates in neurologic disease. *Clinical Aspects of Autoimmunity*, **4**, 18-29.
- Ledeen, R.W. & Wu, G. (2002) Ganglioside function in calcium homeostasis and signaling. *Neurochem Res*, **27**, 637-647.
- Ledeen, R.W., Wu, G., Lu, Z.H., Kozireski-Chuback, D. & Fang, Y. (1998) The role of GM1 and other gangliosides in neuronal differentiation. Overview and new finding. *Ann N Y Acad Sci*, **845**, 161-175.
- Lin, M.J. & Lin-Shiau, S.Y. (1997) Multiple types of Ca²⁺ channels in mouse motor nerve terminals. *Eur J Neurosci*, **9**, 817-823.
- Lo, Y.L., Chan, L.L., Pan, A. & Ratnagopal, P. (2004) Acute ophthalmoparesis in the anti-GQ1b antibody syndrome: electrophysiological evidence of neuromuscular transmission defect in the orbicularis oculi. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **75**, 436-440.
- Losavio, A. & Muchnik, S. (1997) Spontaneous acetylcholine release in mammalian neuromuscular junctions. *Am J Physiol*, **273**, C1835-1841.
- McLachlan, E.M. & Martin, A.R. (1981) Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J Physiol*, **311**, 307-324.
- Melendez-Vasquez, C., Redford, J., Choudhary, P.P., Gray, I.A., Maitland, P., Gregson, N.A., Smith, K.J. & Hughes, R.A. (1997) Immunological investigation of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol*, **73**, 124-134.
- Miledi, R. (1973) Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **183**, 421-425.
- Miledi, R., Molenaar, P.C. & Polak, R.L. (1983) Electrophysiological and chemical determination of acetylcholine release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*, **334**, 245-254.
- Mizutani, K., Oka, N., Kusunoki, S., Kaji, R., Kanda, M., Akiguchi, I. & Shibasaki, H. (2003) Amyotrophic lateral sclerosis with IgM antibody against gangliosides GM2 and GD2. *Intern Med*, **42**, 277-280.
- Molenaar, P.C., Newsom-Davis, J., Polak, R.L. & Vincent, A. (1982) Eaton-Lambert syndrome: acetylcholine and choline acetyltransferase in skeletal muscle. *Neurology*, **32**, 1061-1065.
- Muthing, J., Peter-Katalinic, J., Hanisch, F.G. & Neumann, U. (1991) Structural studies of gangliosides from the YAC-1 mouse lymphoma cell line by immunological detection and fast atom bombardment mass spectrometry. *Glycoconj J*, **8**, 414-423.

- Nagai, Y. (1995) Functional roles of gangliosides in bio-signaling. *Behav Brain Res*, **66**, 99-104.
- Nakao, T., Kon, K., Ando, S., Miyatake, T., Yuki, N., Li, Y.T., Furuya, S. & Hirabayashi, Y. (1993) Novel lacto-ganglio type gangliosides with GM2-epitope in bovine brain which react with IgM from a patient of the amyotrophic lateral sclerosis-like disorder. *J Biol Chem*, **268**, 21028-21034.
- Nojiri, H., Yamana H., Suzuki T. & Isono H. (2000) Glycopathology and glycotherapy of cancer: Ganglioside remodeling as an effective approach for differentiation therapy of cancer. *Cancer Detection and Prevention*, **24 (Supl 1)**.
- O'Hanlon, G.M., Bullens, R.W., Plomp, J.J. & Willison, H.J. (2002) Complex gangliosides as autoantibody targets at the neuromuscular junction in Miller Fisher syndrome: a current perspective. *Neurochem Res*, **27**, 697-709.
- O'Hanlon, G.M., Humphreys, P.D., Goldman, R.S., Halstead, S.K., Bullens, R.W., Plomp, J.J., Ushkaryov, Y. & Willison, H.J. (2003) Calpain inhibitors protect against axonal degeneration in a model of anti-ganglioside antibody-mediated motor nerve terminal injury. *Brain*, **126**, 2497-2509.
- O'Hanlon, G.M., Plomp, J.J., Chakrabarti, M., Morrison, I., Wagner, E.R., Goodyear, C.S., Yin, X., Trapp, B.D., Conner, J., Molenaar, P.C., Stewart, S., Rowan, E.G. & Willison, H.J. (2001) Anti-GQ1b ganglioside antibodies mediate complement-dependent destruction of the motor nerve terminal. *Brain*, **124**, 893-906.
- O'Hanlon, G.M., Veitch, J., Gallardo, E., Illa, I., Chancellor, A.M. & Willison, H.J. (2000) Peripheral neuropathy associated with anti-GM2 ganglioside antibodies: clinical and immunopathological studies. *Autoimmunity*, **32**, 133-144.
- O'Neill, J.H., Murray, N.M. & Newsom-Davis, J. (1988) The Lambert-Eaton myasthenic syndrome. A review of 50 cases. *Brain*, **111 (Pt 3)**, 577-596.
- Onur, R., Bozdagi, O. & Ayata, C. (1995) Effects of aconitine on neurotransmitter release in the rat neuromuscular junction. *Neuropharmacology*, **34**, 1139-1145.
- Ortiz, N., Rosa, R., Gallardo, E., Illa, I., Tomas, J., Aubry, J., Sabater, M. & Santafe, M. (2001) IgM monoclonal antibody against terminal moiety of GM2, GalNAc-GD1a and GalNAc-GM1b from a pure motor chronic demyelinating polyneuropathy patient: effects on neurotransmitter release. *J Neuroimmunol*, **119**, 114-123.
- O'Shaughnessy, T.J., Yan, H., Kim, J., Middlekauff, E.H., Lee, K.W., Phillips, L.H. & Kim, Y.I. (1998) Amyotrophic lateral sclerosis: serum factors enhance spontaneous and evoked transmitter release at the neuromuscular junction. *Muscle Nerve*, **21**, 81-90.
- Pan, B., Fromholt, S.E., Hess, E.J., Crawford, T.O., Griffin, J.W., Sheikh, K.A. & Schnaar, R.L. (2005) Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. *Exp Neurol*, **195**, 208-217.
- Paparounas, K., O'Hanlon, G.M., O'Leary, C.P., Rowan, E.G. & Willison, H.J. (1999) Anti-ganglioside antibodies can bind peripheral nerve nodes of Ranvier and activate the complement cascade without inducing acute conduction block in vitro. *Brain*, **122 (Pt 5)**, 807-816.
- Patton, B.L. (2003) Basal lamina and the organization of neuromuscular synapses. *J Neurocytol*, **32**, 883-903.

- Pecot-Dechavassine, M. & Brouard, M.O. (1993) Changes in large dense-core vesicles during maturation of the rat neuromuscular junction. *Neuroreport*, **4**, 29-32.
- Pecot-Dechavassine, M. & Brouard, M.O. (1997) Large dense-core vesicles at the frog neuromuscular junction: characteristics and exocytosis. *J Neurocytol*, **26**, 455-465.
- Peers, C., Johnston, I., Lang, B. & Wray, D. (1993) Cross-linking of presynaptic calcium channels: a mechanism of action for Lambert-Eaton myasthenic syndrome antibodies at the mouse neuromuscular junction. *Neurosci Lett*, **153**, 45-48.
- Penner, R. & Dreyer, F. (1986) Two different presynaptic calcium currents in mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch*, **406**, 190-197.
- Pestronk, A., Cornblath, D.R., Ilyas, A.A., Baba, H., Quarles, R.H., Griffin, J.W., Alderson, K. & Adams, R.N. (1988) A treatable multifocal motor neuropathy with antibodies to GM1 ganglioside. *Ann Neurol*, **24**, 73-78.
- Plomp, J.J., Molenaar, P.C., O'Hanlon, G.M., Jacobs, B.C., Veitch, J., Daha, M.R., van Doorn, P.A., van der Meche, F.G., Vincent, A., Morgan, B.P. & Willison, H.J. (1999) Miller Fisher anti-GQ1b antibodies: alpha-latrotoxin-like effects on motor end plates. *Ann Neurol*, **45**, 189-199.
- Protti, D.A., Reisin, R., Mackinley, T.A. & Uchitel, O.D. (1996) Calcium channel blockers and transmitter release at the normal human neuromuscular junction. *Neurology*, **46**, 1391-1396.
- Protti, D.A., Szczupak, L., Scornik, F.S. & Uchitel, O.D. (1991) Effect of omega-conotoxin GVIA on neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *Brain Res*, **557**, 336-339.
- Protti, D.A. & Uchitel, O.D. (1993) Transmitter release and presynaptic Ca²⁺ currents blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Neuroreport*, **5**, 333-336.
- Pullen, A.H. & Humphreys, P. (2000) Ultrastructural analysis of spinal motoneurons from mice treated with IgG from ALS patients, healthy individuals, or disease controls. *J Neurol Sci*, **180**, 35-45.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.S. & McNamara, J.O. (2004) Invitación a la Neurociencia. Médica Panamericana, Buenos Aires. Cap 5, pp. 93-107.
- Quattrini, A., Lorenzetti, I., Sciorati, C., Corbo, M., Previtali, S.C., Feltri, M.L., Canal, N., Wrabetz, L., Nemni, R. & Clementi, E. (2001) Human IgM anti-GM1 autoantibodies modulate intracellular calcium homeostasis in neuroblastoma cells. *J Neuroimmunol*, **114**, 213-219.
- Reddy, L.V., Koirala, S., Sugiura, Y., Herrera, A.A. & Ko, C.P. (2003) Glial cells maintain synaptic structure and function and promote development of the neuromuscular junction in vivo. *Neuron*, **40**, 563-580.
- Redfern, P.A. (1970) Neuromuscular transmission in new-born rats. *J Physiol*, **209**, 701-709.
- Ritz, M.F., Erne, B., Ferracin, F., Vital, A., Vital, C. & Steck, A.J. (1999) Anti-MAG IgM penetration into myelinated fibers correlates with the extent of myelin widening. *Muscle Nerve*, **22**, 1030-1037.
- Roberts, A., Perera, S., Lang, B., Vincent, A. & Newsom-Davis, J. (1985) Paraneoplastic myasthenic syndrome IgG inhibits 45Ca²⁺ flux in a human small cell carcinoma line. *Nature*, **317**, 737-739.
- Robitaille, R. (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron*, **21**, 847-855.

- Rosato Siri, M.D. & Uchitel, O.D. (1999) Calcium channels coupled to neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions. *J Physiol*, **514** (Pt 2), 533-540.
- Rus, H. & Niculescu, F. (2003) Association of complement inhibitors with connective tissue matrix in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 1478.
- Salpeter, M. (1987) The vertebrate neuromuscular junction. In Salpeter, M. (ed.). Alan R Liss, Inc., New York.
- Sandoval-Romero, A. & Felix-Grijalva, R. (2003) [Cerebellar ataxia and absence epilepsy: genes, channels, neurons and mice]. *Rev Neurol*, **37**, 447-453.
- Sanes, J.R. (1983) Roles of extracellular matrix in neural development. *Annu Rev Physiol*, **45**, 581-600.
- Sanes, J.R. & Lichtman, J.W. (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci*, **22**, 389-442.
- Santafe, M.M., Garcia, N., Lanuza, M.A., Uchitel, O.D., Salon, I. & Tomas, J. (2002) Decreased calcium influx into the neonatal rat motor nerve terminals can recruit additional neuromuscular junctions during the synapse elimination period. *Neuroscience*, **110**, 147-154.
- Santafe, M.M., Garcia, N., Lanuza, M.A., Uchitel, O.D. & Tomas, J. (2001) Calcium channels coupled to neurotransmitter release at dually innervated neuromuscular junctions in the newborn rat. *Neuroscience*, **102**, 697-708.
- Santafe, M.M., Sabate, M.M., Garcia, N., Ortiz, N., Lanuza, M.A. & Tomas, J. (2005) Changes in the neuromuscular synapse induced by an antibody against gangliosides. *Ann Neurol*, **57**, 396-407.
- Santafe, M.M., Salon, I., Garcia, N., Lanuza, M.A., Uchitel, O.D. & Tomas, J. (2003) Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Eur J Neurosci*, **17**, 119-127.
- Santafe, M.M., Salon, I., Garcia, N., Lanuza, M.A., Uchitel, O.D. & Tomas, J. (2004) Muscarinic autoreceptors related with calcium channels in the strong and weak inputs at polyinnervated developing rat neuromuscular junctions. *Neuroscience*, **123**, 61-73.
- Santafe, M.M., Urbano, F.J., Lanuza, M.A. & Uchitel, O.D. (2000) Multiple types of calcium channels mediate transmitter release during functional recovery of botulinum toxin type A-poisoned mouse motor nerve terminals. *Neuroscience*, **95**, 227-234.
- Santoro, M., Uncini, A., Corbo, M., Staugaitis, S.M., Thomas, F.P., Hays, A.P. & Latov, N. (1992) Experimental conduction block induced by serum from a patient with anti-GM1 antibodies. *Ann Neurol*, **31**, 385-390.
- Satoh, Y., Hirashima, N., Tokumaru, H., Takahashi, M.P., Kang, J., Viglione, M.P., Kim, Y.I. & Kirino, Y. (1998) Lambert-Eaton syndrome antibodies inhibit acetylcholine release and P/Q-type Ca²⁺ channels in electric ray nerve endings. *J Physiol*, **508** (Pt 2), 427-438.
- Scheff, S.W. & Dekosky, S.T. (1989) Glucocorticoid suppression of lesion-induced synaptogenesis: effect of temporal manipulation of steroid treatment. *Exp Neurol*, **105**, 260-264.
- Schmid, S.L., Braell, W.A., Schlossman, D.M. & Rothman, J.E. (1984) A role for clathrin light chains in the recognition of clathrin cages by 'uncoating ATPase'. *Nature*, **311**, 228-231.

- Schnaar, R.L., Collins, B.E., Wright, L.P., Kiso, M., Tropak, M.B., Roder, J.C. & Crocker, P.R. (1998) Myelin-associated glycoprotein binding to gangliosides. Structural specificity and functional implications. *Ann N Y Acad Sci*, **845**, 92-105.
- Sheikh, K.A., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H. & Griffin, J.W. (1999a) The distribution of ganglioside-like moieties in peripheral nerves. *Brain*, **122** (Pt 3), 449-460.
- Sheikh, K.A., Sun, J., Liu, Y., Kawai, H., Crawford, T.O., Proia, R.L., Griffin, J.W. & Schnaar, R.L. (1999b) Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7532-7537.
- Sinha, S., Newsom-Davis, J., Mills, K., Byrne, N., Lang, B. & Vincent, A. (1991) Autoimmune aetiology for acquired neuromyotonia (Isaacs' syndrome). *Lancet*, **338**, 75-77.
- Slater, C. (2001) Double agents and breakdown of integrity at the neuromuscular junction in Miller-Fisher syndrome. *Brain*, **124**, 847-848.
- Slater, C.R., Lyons, P.R., Walls, T.J., Fawcett, P.R. & Young, C. (1992) Structure and function of neuromuscular junctions in the vastus lateralis of man. A motor point biopsy study of two groups of patients. *Brain*, **115** (Pt 2), 451-478.
- Smith, R.G., Alexianu, M.E., Crawford, G., Nyormoi, O., Stefani, E. & Appel, S.H. (1994) Cytotoxicity of immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients on a hybrid motoneuron cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3393-3397.
- Son, Y.J. & Thompson, W.J. (1995) Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron*, **14**, 133-141.
- Spaans, F., Vredevelde, J.W., Morre, H.H., Jacobs, B.C. & De Baets, M.H. (2003) Dysfunction at the motor end-plate and axon membrane in Guillain-Barre syndrome: a single-fiber EMG study. *Muscle Nerve*, **27**, 426-434.
- Sugiura, Y., Furukawa, K., Tajima, O., Mii, S. & Honda, T. (2005) Sensory nerve-dominant nerve degeneration and remodeling in the mutant mice lacking complex gangliosides. *Neuroscience*, **135**, 1167-1178.
- Sugiura, Y. & Ko, C.P. (1997) Novel modulatory effect of L-type calcium channels at newly formed neuromuscular junctions. *J Neurosci*, **17**, 1101-1111.
- Svennerholm, L. (1994) Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids. *Prog Brain Res*, **101**, XI-XIV.
- Svennerholm, L. & Fredman, P. (1980) A procedure for the quantitative isolation of brain gangliosides. *Biochim Biophys Acta*, **617**, 97-109.
- Taguchi, K., Ren, J., Utsunomiya, I., Aoyagi, H., Fujita, N., Ariga, T., Miyatake, T. & Yoshino, H. (2004a) Neurophysiological and immunohistochemical studies on Guillain-Barre syndrome with IgG anti-GalNAc-GD1a antibodies-effects on neuromuscular transmission. *J Neurol Sci*, **225**, 91-98.
- Taguchi, K., Utsunomiya, I., Ren, J., Yoshida, N., Aoyagi, H., Nakatani, Y., Ariga, T., Usuki, S., Yu, R.K. & Miyatake, T. (2004b) Effect of rabbit anti-asialo-GM1 (GA1) polyclonal antibodies on neuromuscular transmission and acetylcholine-induced action potentials: neurophysiological and immunohistochemical studies. *Neurochem Res*, **29**, 953-960.
- Tanaka, Y., Waki, H., Kon, K. & Ando, S. (1997) Gangliosides enhance KCl-induced Ca²⁺ influx and acetylcholine release in brain synaptosomes. *Neuroreport*, **8**, 2203-2207.
- Tasaki, I. (1959) Conduction of nerve impulse. Handbook of physiology. In Field, J. (ed.). American Physiological Society. Bethesda MD. Cap III, pp. 75-121.

- Taverna, E., Saba, E., Rowe, J., Francolini, M., Clementi, F. & Rosa, P. (2004) Role of lipid microdomains in P/Q-type calcium channel (Cav2.1) clustering and function in presynaptic membranes. *J Biol Chem*, **279**, 5127-5134.
- Tomas, J., Fenoll, R., Santafe, M., Batlle, J. & Mayayo, E. (1989) Motor nerve terminal morphologic plasticity induced by small changes in the locomotor activity of the adult rat. *Neurosci Lett*, **106**, 137-140.
- Tomas, J., Lanuza, M.A., Santafe, M., Fenoll-Brunet, M.R. & Garcia, N. (2000) Topological differences along mammalian motor nerve terminals for spontaneous and alpha-bungarotoxin-induced sprouting. *Histol Histopathol*, **15**, 43-52.
- Tsai, S.Y., Chiu, P.Y., Yang, C.P. & Lee, Y.H. (2002) Synergistic effects of corticosterone and kainic acid on neurite outgrowth in axotomized dorsal root ganglion. *Neuroscience*, **114**, 55-67.
- Uchitel, O.D. (1997) Toxins affecting calcium channels in neurons. *Toxicon*, **35**, 1161-1191.
- Uchitel, O.D., Appel, S.H., Crawford, F. & Sczcupak, L. (1988) Immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients enhance spontaneous transmitter release from motor-nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 7371-7374.
- Uchitel, O.D., Protti, D.A., Sanchez, V., Cherksey, B.D., Sugimori, M. & Llinas, R. (1992) P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 3330-3333.
- Uncini, A., Santoro, M., Corbo, M., Lugaresi, A. & Latov, N. (1993) Conduction abnormalities induced by sera of patients with multifocal motor neuropathy and anti-GM1 antibodies. *Muscle Nerve*, **16**, 610-615.
- Urbano, F.J., Depetris, R.S. & Uchitel, O.D. (2001) Coupling of L-type calcium channels to neurotransmitter release at mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch*, **441**, 824-831.
- Urbano, F.J., Piedras-Renteria, E.S., Jun, K., Shin, H.S., Uchitel, O.D. & Tsien, R.W. (2003) Altered properties of quantal neurotransmitter release at endplates of mice lacking P/Q-type Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3491-3496.
- Vincent, A., Roberts, M., Willison, H., Lang, B. & Newsom-Davis, J. (1995) Autoantibodies, neurotoxins and the nervous system. *J Physiol Paris*, **89**, 129-136.
- Vinson, M., Strijbos, P.J., Rowles, A., Facci, L., Moore, S.E., Simmons, D.L. & Walsh, F.S. (2001) Myelin-associated glycoprotein interacts with ganglioside GT1b. A mechanism for neurite outgrowth inhibition. *J Biol Chem*, **276**, 20280-20285.
- Vyas, A.A., Patel, H.V., Fromholt, S.E., Heffer-Laue, M., Vyas, K.A., Dang, J., Schachner, M. & Schnaar, R.L. (2002) Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8412-8417.
- Westenbroek, R.E., Hoskins, L. & Catterall, W.A. (1998) Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci*, **18**, 6319-6330.
- Wiegandt, H. (1995) The chemical constitution of gangliosides of the vertebrate nervous system. *Behav Brain Res*, **66**, 85-97.
- Willison, H.J. (1994) Antiglycolipid antibodies in peripheral neuropathy: fact or fiction? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **57**, 1303-1307.

- Willison, H.J. (2005) The immunobiology of Guillain-Barre syndromes. *J Peripher Nerv Syst*, **10**, 94-112.
- Willison, H.J. (2006) Basic and clinical aspects of autoimmune disorders in peripheral nerves. *Acta Neurol Scand Suppl*, **183**, 14-18.
- Willison, H.J., O'Hanlon, G., Paterson, G., O'Leary, C.P., Veitch, J., Wilson, G., Roberts, M., Tang, T. & Vincent, A. (1997) Mechanisms of action of anti-GM1 and anti-GQ1b ganglioside antibodies in Guillain-Barre syndrome. *J Infect Dis*, **176 Suppl 2**, S144-149.
- Willison, H.J. & O'Hanlon, G.M. (1999) The immunopathogenesis of Miller Fisher syndrome. *J Neuroimmunol*, **100**, 3-12.
- Willison, H.J., O'Hanlon, G.M., Paterson, G., Veitch, J., Wilson, G., Roberts, M., Tang, T. & Vincent, A. (1996) A somatically mutated human antiganglioside IgM antibody that induces experimental neuropathy in mice is encoded by the variable region heavy chain gene, V1-18. *J Clin Invest*, **97**, 1155-1164.
- Willison, H.J., O'Leary, C.P., Veitch, J., Blumhardt, L.D., Busby, M., Donaghy, M., Fuhr, P., Ford, H., Hahn, A., Renaud, S., Katifi, H.A., Ponsford, S., Reuber, M., Steck, A., Sutton, I., Schady, W., Thomas, P.K., Thompson, A.J., Vallat, J.M. & Winer, J. (2001) The clinical and laboratory features of chronic sensory ataxic neuropathy with anti-disialosyl IgM antibodies. *Brain*, **124**, 1968-1977.
- Willison, H.J., Veitch, J., Swan, A.V., Baumann, N., Comi, G., Gregson, N.A., Illa, I., Zielasek, J. & Hughes, R.A. (1999) Inter-laboratory validation of an ELISA for the determination of serum anti-ganglioside antibodies. *Eur J Neurol*, **6**, 71-77.
- Willison, H.J. & Yuki, N. (2002) Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain*, **125**, 2591-2625.
- Wu, G., Xie, X., Lu, Z.H. & Ledeen, R.W. (2001) Cerebellar neurons lacking complex gangliosides degenerate in the presence of depolarizing levels of potassium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 307-312.
- Yin, X., Crawford, T.O., Griffin, J.W., Tu, P., Lee, V.M., Li, C., Roder, J. & Trapp, B.D. (1998) Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci*, **18**, 1953-1962.
- Yuki, N., Tagawa, Y. & Handa, S. (1996a) Autoantibodies to peripheral nerve glycosphingolipids SPG, SLPG, and SGPG in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol*, **70**, 1-6.
- Yuki, N., Taki, T. & Handa, S. (1996b) Antibody to GalNAc-GD1a and GalNAc-GM1b in Guillain-Barre syndrome subsequent to Campylobacter jejuni enteritis. *J Neuroimmunol*, **71**, 155-161.
- Yuki, N., Taki, T., Takahashi, M., Saito, K., Yoshino, H., Tai, T., Handa, S. & Miyatake, T. (1994) Molecular mimicry between GQ1b ganglioside and lipopolysaccharides of Campylobacter jejuni isolated from patients with Fisher's syndrome. *Ann Neurol*, **36**, 791-793.
- Yuki, N., Yamada, M., Koga, M., Odaka, M., Susuki, K., Tagawa, Y., Ueda, S., Kasama, T., Ohnishi, A., Hayashi, S., Takahashi, H., Kamijo, M. & Hirata, K. (2001) Animal model of axonal Guillain-Barre syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Ann Neurol*, **49**, 712-720.
- Yuki, N., Yoshino, H., Sato, S. & Miyatake, T. (1990) Acute axonal polyneuropathy associated with anti-GM1 antibodies following Campylobacter enteritis. *Neurology*, **40**, 1900-1902.