BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA

LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGÍA DE LA CONDUCTA Y CONTROL MOTOR

Evaluación del efecto de dopaminérgicos y serotonérgicos sobre el patrón de la marcha en el mutante de mielina *taiep:* una modelo de esclerosis múltiple

Para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias Fisiológicas

Presenta:

LTF. Juan Carlos Ahumada Juárez

Asesor de Tesis:

Dr. José Ramón Eguibar Cuenca

Co-asesor de tesis:

Dra. Ma. Del Carmen Cortés Sánchez

Agradecimientos

A Dios, por acompañarme todos los días. A mi mamá Maria Haydee Juárez Santiesteban quien más que una buena madre ha sido mi mejor amiga, me ha consentido y apoyado en lo que me he propuesto y sobre todo ha sabido corregir mis errores.

Agradezco también a mis tutores José Ramón Eguibar Cuenca y Ma. Del Carmen Cortes por enseñarme, guiarme y por la amistad en todo el proceso de la maestría.

A la maestra Araceli y al veterinario Omar por brindarme toda la ayuda necesaria para los experimentos realizados en esta tesis.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y el Control Motor, por hacer de este proceso una magnífica experiencia,

A toda mi familia por apoyarme en todo momento.

Y gracias a todos los que nos brindaron su ayuda en este proyecto.

L.T.F Juan Carlos Ahumada Juárez

Contenido

Resumen 5
Abstract 6
Introducción 8
La esclerosis múltiple 8
Fisiopatología de la esclerosis múltiple 10
Los signos y síntomas de la esclerosis múltiple 12
La arquitectura y la topografía en la médula espinal 12
Fisiología de la locomoción 16
Modelo de los CPG's 18
Fisiología y biomecánica de la marcha 19
Rol de la dopamina en la marcha 22
La familia de receptores dopaminérgicos D2 25
Rol de la serotonina en la marcha 28
Tabla de receptores para 5-HT con sus agonistas y antagonistas 30
El receptor $5TH1_A$ 32
El receptor para la serotonina tipo $5TH2_A$ 32
El 8-OH-DPAT como un agonista específico para los receptores $5HT1_A$ 32
La quipacina un agonista de los receptores postsinápticos 33
Antecedentes 34
Justificación 40
Hipótesis 41
Objetivo General 41
Objetivos específicos 41
Metodología 42
Animales 42
Drogas 42
Equipo para el análisis de la marcha en la rata *taiep* 43
Los parámetros para el análisis de la marcha en la rata *taiep* 44
Estadística 47
Resultados 48
Discusión 81
Conclusiones 99

Perspectivas 100
Anexo……101
Referencias…… .139

Resumen

La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune, desmielinizante y crónica del SNC, afecta aproximadamente a 2 millones de personas en el mundo, uno de los principales signos de discapacidad son las alteraciones motoras producidas por la desmielinización progresiva, afectando la coordinación entre las extremidades y la velocidad de la marcha. Otras alteraciones relaciones relevantes de la mielina son las tubulinopatías, un grupo de enfermedades debidas a mutaciones puntuales para los genes TUBB4A, que codifican para la tubulina. Los generadores centrales de patrones (CPGs) son redes neuronales encargadas de activar y modular los procesos locomotores como lo es la marcha. Se ha demostrado que los receptores dopaminérgicos D_2 y los serotoninérgicos a través de receptores $5HT1_A$ y $5HT2_A$ para serotonina son capases de modular y activar los CPGs para la marcha en modelos animales de lesión espinal.

La rata *taeip* es un mutante de mielina, el nombre es un acrónimo de los signos motores que muestra en el transcurso de su vida: temblor, ataxia, inmovilidad, epilepsia y parálisis. La mutación se encuentra en el gen TUBB4A que codifica para la beta tubulina, proteína necesaria para la distribución de las proteínas y lípidos de la mielina en los oligodendrocitos. Patológicamente es similar a lo obtenido en un modelo homólogo de los signos motores que se producen en la esclerosis múltiple del tipo primaria progresiva. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la administración sistémica de un dopaminérgico de la familia D_2 pramipexol y de dos serotonérgicos uno presináptico el 8-OH-DPAT y otro postsináptico la quipacina sobre el patrón de la marcha de la rata *taiep* macho de tres meses de edad.

Se utilizaron 20 ratas *taiep* macho de tres meses de edad, se tuvieron grupos de 6 ratas *taiep* para cada grupo, uno para la administración de pramipexol a las dosis de 0.5 y 1 mg/Kg por vía intraperitoneal, 7 para el grupo de 8-OH-DPAT a las dosis de 0.085, 0.125 y 0.25 mg/Kg por vía subcutánea y 7 para el grupo de quipacina a las dosis de 0.128, 0.25 y 0.5 mg/Kg por vía intraperitoneal. Se registraron previamente a los sujetos bajo condición control a los cuales se administró solución salina al 0.9%-.

La marcha fue registrada mediante el sistema de tipo pasarela Catwalk 9.1 (Noldus Technologies, Países Bajos), los parámetros evaluados fueron: fase de soporte, fase de balanceo, longitud de la zancada, velocidad de la marcha, coordinación entre las extremidades y cadencia.

El pramipexol a la dosis de 0.5 y 1 mg/Kg disminuyó la fase de soporte, la fase de balanceo, la velocidad y la cadencia ($P<0.05$). Por otro lado, el 8-OH-DPAT a la dosis de 0.25 mg/Kg disminuyó la fase de soporte y la fase de balanceo, aumentando el índice de regularidad y la cadencia ($P<0.05$). Finalmente, la administración quipacina a la dosis de 0.25 mg/Kg disminuyó la longitud de zancada y aumento el índice de regularidad y la velocidad de la marcha ($P<0.05$).

En conclusión, ambas drogas serotonérgicas mejoraron la coordinación entre las extremidades, pero solo la quipacina mejoró la velocidad de la marcha. Esto nos indica que los receptores para la serotonina $5HT1_A$ y $5HT2_A$ son capaces de modular el generador central de patrones al regular la coordinación entre las cuatro extremidades, pero solo el receptor $5HT2_A$ fue capaz de incrementar la función del ritmo en la rata *taiep* al aumentar la velocidad de la marcha.

Abstract

Multiple sclerosis is an autoimmune, demyelinating and chronic disease of the CNS, it affects approximately two million people in the world, one of the most common signs of disability is the motor disorders produced by progressive demyelination, affecting the coordination between the extremities and the gait speed. Other relevant relationship disorders of myelin are tubulinopathies, a group of diseases due to point mutations for the TUBB4A genes, which code for beta tubulin. Central pattern generators (CPGs) are neural networks that are responsible for activating and modulating locomotor behavior such as gait. Dopamine D_2 like and serotonergic receptors $5HT_{1A}$ and $5HT_{2A}$ receptors for serotonin have been shown to be capable of modulating and activating CPGs for gait in animal models of spinal injury.

The *taeip* rat is a myelin mutant, the name is an acronym for the motor signs that it shows throughout its life: tremor, ataxia, immobility of hind limbs, epilepsy and paralysis. The mutation is found in the TUBB4A gene that codes for beta tubulin, a protein necessary for the distribution of myelin proteins and lipids in oligodendrocytes. Pathologically, it is similar to that obtained in a homologous model of the motor signs that occur in multiple sclerosis of the progressive primary type. The objective of this study was to evaluate the effects of the systemic administration of a dopaminergic of the D_2 like pramipexole and of two serotonergics, one presynaptic 8-OH-DPAT and the other postsynaptic quipazine on the gait pattern of the male *taiep* rat three months old.

Twenty three-month-old male *taiep* rats were used, groups of 6 *taiep* rats were kept for each group, one for the administration of pramipexole at doses of 0.5 and 1 mg/Kg intraperitoneally (i.p.), 7 for the group of 8- OH-DPAT at doses of 0.085, 0.125 and 0.25 mg/Kg subcutaneously (s.c.) and 7 for the quipazine group at doses of 0.128, 0.25 and 0.5 mg/Kg i.p. pathway. Subjects were previously registered under control condition to which 0.9% saline was administered.

The gait was recorded using the Catwalk 9.1 system (Noldus Technologies, The Netherlands), the parameters evaluated were: support, swing, stride length, gait speed, coordination between the limbs and cadence.

Pramipexole at the dose of 0.5 and 1 mg/Kg decreased the support phase, the swing phase, speed and cadence ($P < 0.05$). On the other hand, 8-OH-DPAT at the 0.25 mg/Kg dose decreased the support and the swing, increasing the regularity index and the

cadence ($P < 0.05$). Finally, administration of quipazine at the 0.25 mg/Kg dose decreased stride length and increased the regularity index and walking speed ($P < 0.05$).

In conclusion, both serotonergic drugs improved coordination between the limbs, but only quipazine improved gait speed. This indicates that the $5HT_{1A}$ and $5HT_{2A}$ serotonin receptors are capable of modulating the central pattern generator by regulating coordination between the four extremities, but only the $5HT_{2A}$ receptor was able to increase rhythm function in the *taiep* rat by increasing the gait speed.

Introducción

La esclerosis múltiple es una de las enfermedades neurológicas más frecuentes, afecta a poco más de 2.5 millones de personas, siendo las mujeres de entre 20 a 40 años de edad las más afectadas (Goodman y cols., 2010). En México se tiene un registro de 10 a 15 casos de esclerosis múltiple por cada 100,000 habitantes, es decir existen más de 20,000 casos en todo el país (Osorio y cols., 2016).

La esclerosis múltiple

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a la esclerosis múltiple como una enfermedad del tipo desmielinizante, crónica, autoinmune e inflamatoria que afecta a todo el sistema nervioso central (SNC), y prevalece en adultos jóvenes de entre 30 y 50 años de edad siendo mujeres las que muestran una mayor incidencia (Olek, 2005).

La esclerosis múltiple tiene distintos subtipos clínicos que reflejan una evolución clínica divergente, estas diferencias se han propuesto que se deben a factores inmunológicos, los tipos de esclerosis múltiple descritos son:

- La esclerosis múltiple remitente-recurrente: los pacientes presentan recaídas y exacerbaciones con presencia de placas neuroinflamatorias, el cuadro clínico principal se caracteriza por: neuritis óptica, diplopía, vértigo, parestesia y mielopatía. Aunque se describa como remitente, la gran mayoría de los pacientes sana de manera incompleta posterior a un episodio de desmielinización ya que quedan áreas (placas) desmielinizadas provocando discapacidad a largo plazo (Cohen, 2010). Un 85% de los pacientes tienen este tipo de esclerosis múltiple.

- La esclerosis múltiple secundaria progresiva: Esta forma presenta una disminución progresiva de las funciones neurológicas, principalmente la marcha provocado por una placa de desmielinización en el cerebelo, la corteza motora o la médula espinal produciendo frecuentemente alteraciones en la marcha. Por otra parte, se altera el funcionamiento normal de las vísceras afectando órganos como la vejiga, el intestino y la función sexual (Zorzon y cols., 1999). Frecuentemente existen

alteraciones en la visión y la función cognitiva. La esclerosis múltiple remitente recurrente puede evolucionar hacia una esclerosis múltiple secundaria progresiva después de 10 a 20 años después de que el paciente inicia con dicha patología.

- La esclerosis múltiple primaria progresiva afecta a tan solo un 15 % de todos los pacientes, se caracteriza por una sintomatología neurológica, pero sin remisiones, de manera progresiva y lenta desde el primer episodio, y a nivel neuropatológico se caracteriza por un proceso de desmielinización progresivo en amplias áreas del SNC (Hawker y cols., 2004; Olek, 2005; Dendrou y cols., 2015).

- La esclerosis múltiple progresiva recurrente: Es un subtipo de la esclerosis múltiple primaria progresiva, en la cual presenta recaídas espontáneas de los signos y síntomas, sobreimpuestas a una progresión lenta. A diferencia de la esclerosis múltiple remitente-recurrente, este subtipo carece de lesiones en el cerebro y la médula espinal visibles por resonancia magnética, y difieren inmunológica y clínicamente de las demás de los otros tipos de esclerosis múltiple, la relación hombre mujer en este tipo es de 1:1 (Lublin y cols., 1996; Hawker y cols., 2004; Olek, 2005).

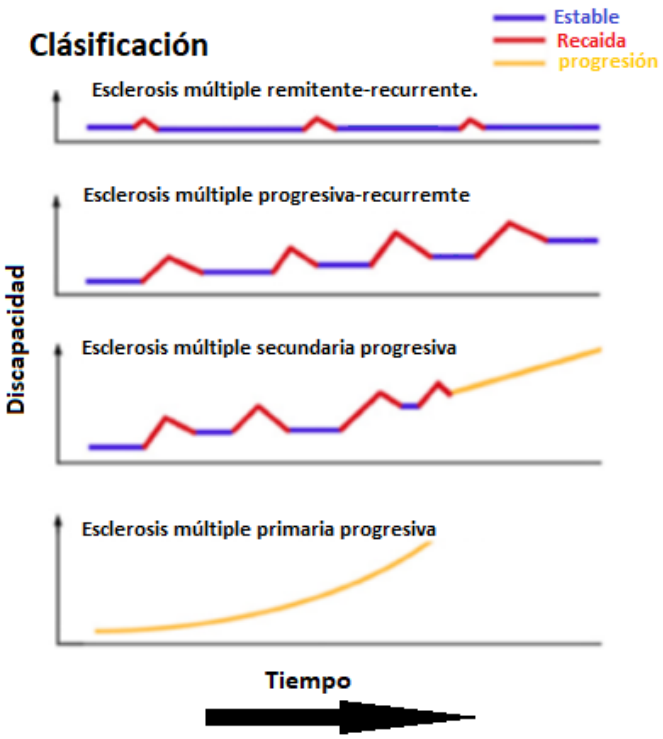

Figura 1. **Representación gráfica del curso clínico de los cuatro tipos clínicos de esclerosis múltiple.** Note que en la parte superior se encuentra la fase de recaída representada en color rojo, la fase estable representada en color azul y la progresión de la discapacidad que produce la esclerosis múltiple en color amarillo (modificada de Olek, 2005).

Fisiopatología de la esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple es una alteración del sistema nervioso central, es de carácter idiopático y se cree que hay una relación entre la genética y con componentes exigenticos. Se ha reportado que existe una relación entre la presencia del alelo HLA-DR2 del complejo mayor de histocompatibilidad como un factor de riesgo importante para padecer la esclerosis múltiple (Jersild y cols., 1973).

En la esclerosis múltiple se han reportado lesiones en la sustancia blanca, principalmente en las estructuras tales como el nervio óptico, ganglios basales, cerebelo, tronco encefálico y en la médula espinal (Poser y cols., 1983). Las únicas células encargadas de la producción y el mantenimiento de la mielina en el SNC son los oligodendrocitos, y estos se ven afectados en el transcurso de la esclerosis múltiple, desencadenando un proceso de desmielinización (Lassmann y cols., 2011).

Existen procesos importantes en la esclerosis múltiple que median el curso de la fisiopatología; inicialmente son los linfocitos T, células especializadas del sistema inmune, están presentes de manera atípica y esto desencadena una deficiencia en la regulación inmunológica, lo que desencadena que reaccionen ante antígenos derivados de la mielina, este proceso sucede con una alteración de la actividad de las integrinas o proteínas de adhesión de la parte superior del endotelio, y las metaloproteasas que son proteínas que degradan la matriz extracelular por medio de proteólisis del colágeno y las fibronectinas, de esta forma los linfocitos T pueden transportarse dentro de la barrera hematoencefálica de manera atípica y tengan como blanco principal a la proteína básica de la mielina asociada a los oligodendrocitos (MOBP) y a la proteína específica de los oligodendrocitos (OSP) (Noseworthy y cols., 2000; Kaye y cols., 2000).

Existe una placa de desmielinización en la sustancia blanca en el SNC, es decir, que existe una zona delimitada con una pérdida en el grosor de la mielina asociado a una disminución de los oligodendrocitos por la inducción de apoptosis producida por la

interacción de la IL2, FNTα e IFN-γ y una preservación relativa de los axones (Dendrou y cols., 2015; Hawker y cols., 2004).

El segundo proceso es la respuesta inflamatoria, la cual produce daño en la mielina. El cual es mediado por los linfocitos T con un proceso de neuroinflamación en el cual participan: los macrófagos, los anticuerpos de las células B plasmáticas, los linfocitos T citotóxicos CD8+, los que a su vez elevan los niveles de citocinas proinflamatorias (Dendrou y cols., 2015).

El proceso de neuroinflamación es mediado por 2 vías la Th1 y la Th2; la primera vía es producida por los linfocitos CD4+ tipo 1, las cuales producen citoquinas pro-inflamatorias como son las interleucinas 2 (IL2), el factor de necrosis tumoral alfa (FNTα) e Interferón gamma (IFN-γ), además activa las células presentadoras de antígenos. En cambio, la respuesta Th2 activa la producción de citosinas antiinflamatorias como las interleucinas 4, 5, 6, 10 y 13 (Begolka y cols., 1998). En la esclerosis múltiple la respuesta que predomina es la Th1, lo que favorece un proceso de neuroinflamación crónica (Zoghi y cols., 2011; Dendrou y cols., 2015).

La liberación de las citosinas pro-inflamatorias activadas por la respuesta Th1 *per se* induce la actividad de los macrófagos activando a su vez un proceso de fagocitosis en la mielina lo que conlleva a un proceso de desmielinización (Lassmann y cols., 2011; Dendrou y cols., 2015; Zoghi y cols., 2011). Por otra parte, los oligodendrocitos presentan muerte inducida por FNT-α, IFN- γ y los radicales libres como el H_2O_2, O_2+ y NO, estos elementos activan a las caspasas 1, 3, 8 y 11 alterando las mitocondrias de los oligodendrocitos, de tal forma que induce apoptosis, evento que desencadena una falta de producción de la mielina exacerbando el proceso de desmielinización (Cudrici y cols., 2006).

En la fase temprana de la esclerosis múltiple, aparece una desmielinización seguido de una remielinización, al progreso de la patología los oligodendrocitos no pueden reparar las vainas de mielina, por lo que la desmielinización aumenta a lo largo del SNC (Trapp y cols., 2008; Chari y cols., 2007).

Los signos y síntomas de la esclerosis múltiple

En la esclerosis múltiple los signos y síntomas son diversos, debido al curso de la patología, y al subtipo de esclerosis múltiple que se trate, pero entre los más frecuentes se presenta debilidad muscular, entumecimiento de las extremidades, pérdida de la visión parcial o total, diplopía, dolor, mareo, temblores, ataxia, espasticidad, alteraciones cognitivas, alteraciones en el equilibrio y de manera importante afectando la marcha (Olek y cols., 2005; Solaro y cols., 2013; Feinstein y cols., 2015).

La arquitectura y la topografía en la médula espinal

La médula espinal forma parte de sistema nervioso central, se localiza dentro del conducto vertebral y está protegida por las estructuras óseas denominadas vertebras y las meninges que conforman la columna vertebral (Cramer y cols., 2017).

La médula espinal inicia en el agujero magno u occipital recorriendo de manera céfalo-caudal la por la parte postero-medial del tronco, hasta la segunda vértebra lumbar y termina en la zona sacro-coccígea denominada cauda equina (Cramer y cols., 2017).

De acuerdo con su ubicación céfalo-caudal se puede dividir en diferentes zonas: cervical, torácica, lumbar, sacra y coccígea. También la médula espinal puede subdividirse en 31 segmentos de los cuales existen ocho nervios cervicales, doce nervios torácicos, cinco nervios lumbares, cinco nervios sacros y uno coccígeo (Bican y cols.,2013).

Se encuentran dos fisuras a nivel medial, una anterior y otra posterior que dividen al cordón medular en dos porciones iguales conectadas por las comisuras transversales anterior y posterior, en ese punto las raíces anteriores y posteriores surgen y forman los nervios espinales. En el centro de la médula se encuentra el conducto central por el que circula el líquido céfalo raquídeo (LCR).

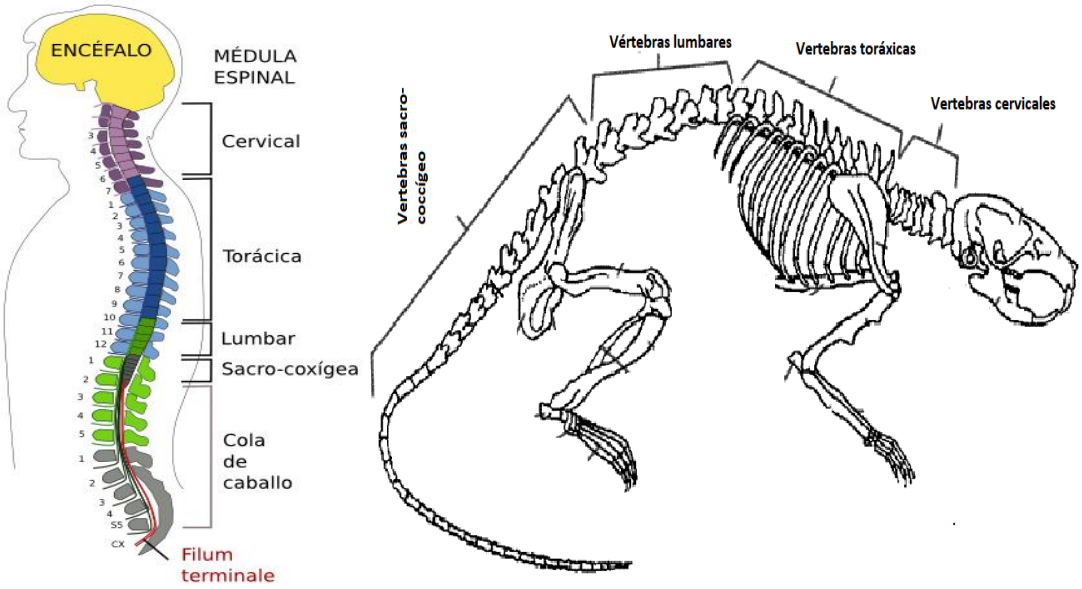

Figura 2. Esquema que muestra la columna vertebral y sus segmentos humanos y en rata. Note que en el humano se tienen 31 segmentos vertebrales subdivididos en las zonas: cervical, torácica, lumbar, sacro-coccígea, la cola de caballo o *filum terminale* y sus equivalentes en el esqueleto de la rata (modificado de Puelles y cols., 2008).

La médula espinal se conforma por la sustancia gris que tiene forma de mariposa y se subdivide en las astas o cuernos dorsales y las ventrales; el asta dorsal es una estructura laminada que deriva de la placa alar embrionaria. Por otra parte, el asta ventral se origina en la placa basal del tubo neural y contiene grandes grupos de motoneuronas. El neuroanatomista Rexed (1952) subdividió a la sustancia gris del gato en 10 láminas basándose en criterios citoarquitectónicos, esta división ha sido aplicada a otras especies incluyendo los humanos. Las láminas I a la IV se encuentran en el asta dorsal y la lámina V ocupan la base del asta dorsal, la región central del asta ventral correspondiente a la lámina X; por otra parte las láminas VI y VII corresponden al núcleo intermedio y las láminas VIII y IX corresponden los núcleos motores donde se localizan las motoneuronas.

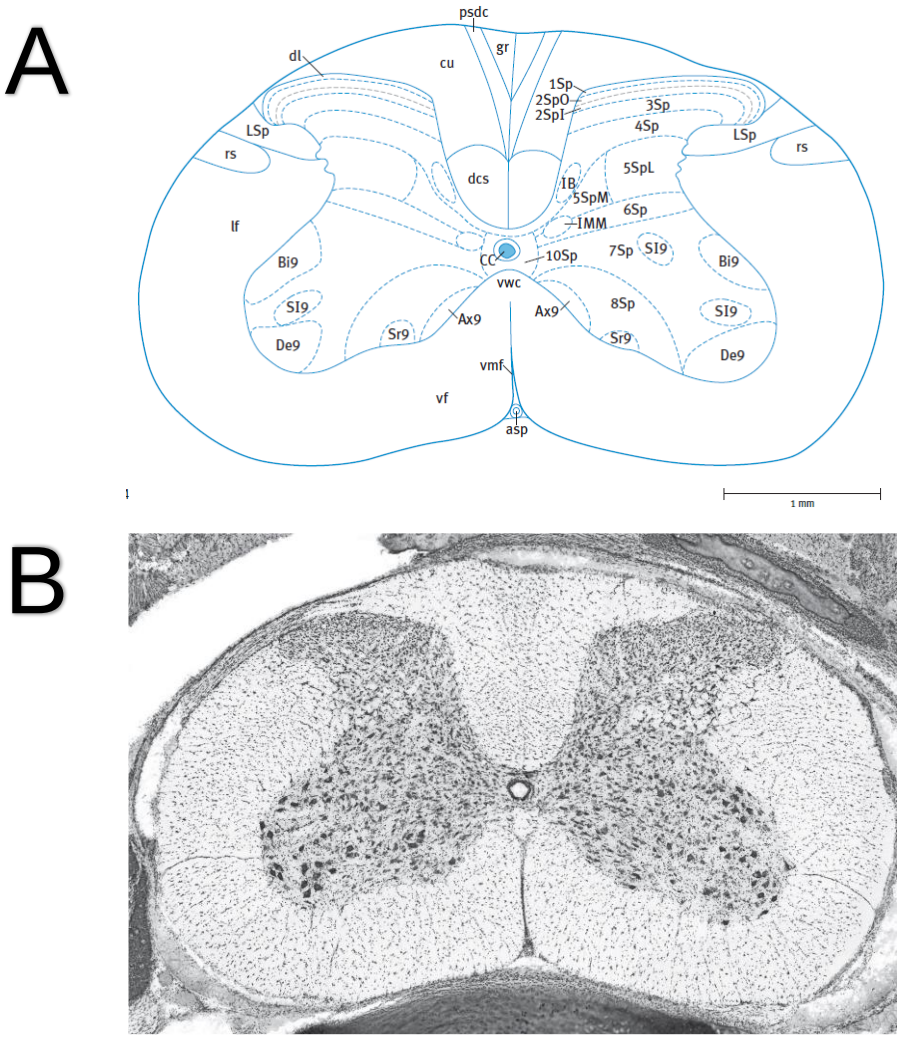

Figura 3. Corte coronal de la médula espinal de la rata. En la parte superior (A) se muestra un mapa topográfico de la médula donde se describen los núcleos y diferentes tractos ascendentes y descendentes, en la citología se describe en abreviaturas: (1Sp) lámina uno, (2SpI) lámina dos en su porción interna, (2SpO) lámina dos en su porción externa, (3Sp) lámina tres, (4Sp) lámina 4, (5Spl) lámina 5 en su porción medial, (6Sp) lámina 6, (7Sp) lámina 7, (8Sp) lámina 8, (10Sp) lámina 10, (Axp) zona de los músculos axiales, (Bi9) zona del bíceps, (CC) canal central, (De9) deltoides, (fdl) fascículo dorso lateral, (gr) fascículo grácil, (SI9) supra espinoso, (Sr9) serrato anterior, (rs) tracto rubro espinal (modificado de Watson y cols., 2009). En la parte inferior (B) se muestra un corte coronal de medula espinal de rata.

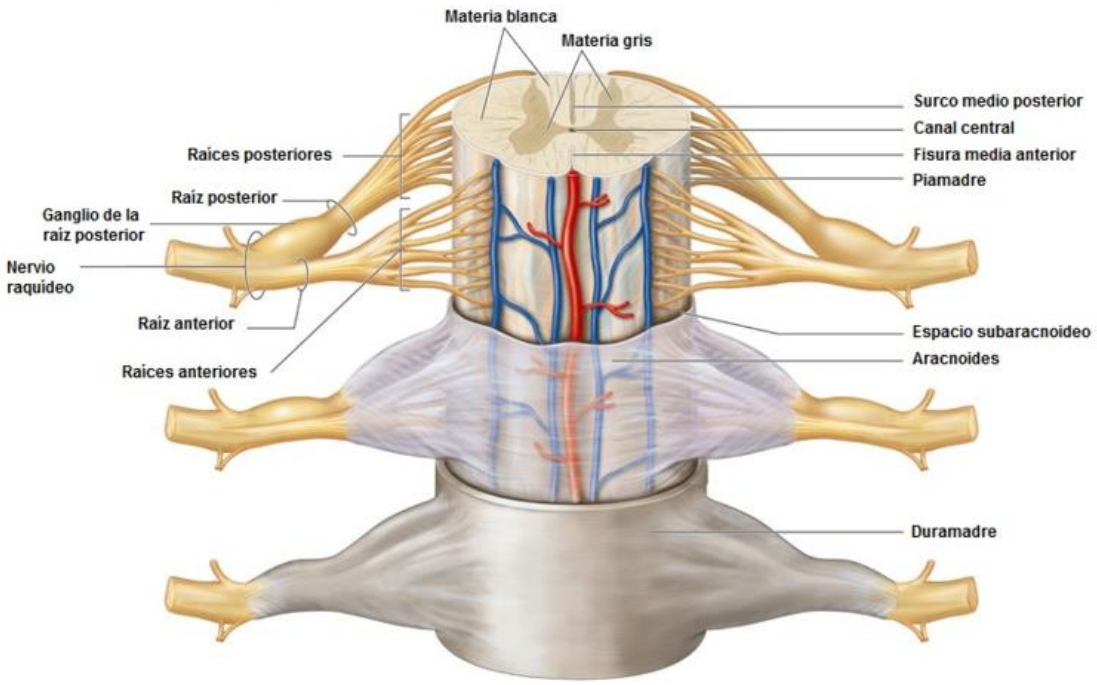

Figura 4: Estructura de la médula espinal y las meninges. La duramadre y la aracnoides han sido seccionadas para mostrar las raíces anteriores y posteriores y el ligamento dentado. Este es un engrosamiento bilateral, longitudinal y dentado de la piamadre que fija la médula en el centro del conducto vertebral. La médula espinal está seccionada para mostrar los cuernos (astas) de la sustancia gris. Las meninges se extienden a lo largo de las raíces nerviosas y después se fusionan con el epineuro en el punto donde la raíz anterior y la posterior se juntan, formando la vaina dural que encierra los ganglios sensitivos de las raíces posteriores de los nervios espinales (modificado de Moor, 2007).

Los nervios espinales emergen de la médula espinal en forma de raicillas que convergen para formar dos raíces:

- Una raíz nerviosa ventral o anterior que está compuesta de fibras motoras que funcionan de manera eferente, viajan desde el asta anterior de la sustancia gris medular y se dirigen hacia los músculos estriados.
- Una raíz nerviosa dorsal o posterior que está formada de fibras aferentes sensitivas que se originan en los ganglios sensitivos de la raíz dorsal y se extienden de manera periférica a la piel, los músculos y las vísceras.

La médula espinal es irrigada por la arteria espinal anterior formadas por dos ramas emergentes de las arterias vertebrales a nivel intracraneal, recorren toda le médula espinal por el surco medio anterior, y también por unas las arterias espinales posteriores originadas de igual manera desde las arterias vertebrales (Moor, 2007).

La médula espinal tiene tres funciones importantes: sensación, control autónomo y control motor (Moore, 2007). Esto sucede ya que existe una complicada red neuronal que trabaja en conjunto con el SNC para permitir un control y correcto funcionamiento de las áreas antes mencionadas.

Fisiología de la locomoción

La locomoción es una acción estereotipada generada por movimientos rítmicos y alternantes tanto del cuerpo en cada una de las extremidades o del tronco en el nado. En los primeros estudios sobre la locomoción Thomas Graham (1911) concluyó a través de experimentos realizados en gatos descerebrados que:

1. La marcha refleja no necesita de estructuras supra-espinales para producir su patrón básico de la alternancia entre los músculos flexores y extensores.
2. La ritmicidad de los patrones básicos de la marcha están contenidos en circuitos neuronales en la médula espinal.
3. Las señales tónicas del encéfalo pueden activar los circuitos neuronales espinales que comandan la marcha.
4. Esta red neuronal se le ha denominado generadores centrales de patrones y son modulados por vías serotonérgicas, dopaminérgicas, noradrenérgicas y por los propioceptores de las extremidades y los diferentes tipos de aferentes musculares (Kandel 2001).

Por lo tanto, la locomoción depende de una red neuronal específica llamada generadores centrales de patrones (CPG’s), los cuales se encuentran a nivel de la médula espinal en el engrosamiento cervical y a nivel lumbo-sacro para las extremidades inferiores. Este tipo de neuronas tienen la capacidad de generar patrones rítmicos de actividad en las motoneuronas en ausencia de aferencias, la generación de la actividad motora dada por los CPGs depende de tres factores:

- Las propiedades celulares de las neuronas individuales que construyen la red.
- Las propiedades de las conexiones sinápticas interneuronales.
- El patrón de las interconexiones entre dichas neuronas.

Las CPGs tienen excitadores endógenos, por tal motivo, poseen activación espontánea, principalmente los que producen ritmos continuos, como son la deambulación, la respiración, el nado y el rascado (Field y cols.,1959). Se ha demostrado que existe solo un CPG encargado de la marcha para cada extremidad (Rybak y cols., 2006).

No solo los CPGs son requeridos para modular la locomoción, ya que en la marcha son necesarios los reflejos espinales, los centros motores corticales y subcorticales para que exista un correcto ajuste en el patrón de la marcha según se requiera, dadas las condiciones medio ambientales tales con el transtorno del movimiento (Field y cols.,1959). Las eferencias que emanan de las motoneuronas suelen depender de la fase de la marcha, es decir, la activación de los músculos flexores o extensores dependen en qué fase del ciclo se encuentre (Hamers y cols., 2001; Rybak y cols., 2006).

Aunque el patrón básico de la marcha pueda ser regulado a nivel espinal, las vías descendentes supraespinales son necesarias para iniciar y controlar la marcha y se dividen en tres sistemas el primero activa el sistema locomotor de la médula espinal y el control la velocidad global de la marcha; el segundo refina el patrón motor a través de las aferencias de las fibras musculares, los propioceptores y el tercer factor está constituido por las aferencias visuales que ajustan el patrón locomotor (Mori y cols., 1992; Kandel, 2001).

Existe evidencia de que las aminas biogénicas regulaban la magnitud y la evolución temporal de la actividad motora y tanto la vía noradrenérgica procedente del *locus coeruleus,* como la actividad serotoninérgica del núcleo del rafé dorsal, son componentes fundamentales para la marcha (Grillner y cols., 1973., Jordan y cols., 1976). Sin embargo, aunque estas vías son importantes, ninguna es fundamental para el inicio de la locomoción, ya que la marcha se puede inducir sin la participación activa de estas dos vías (Guertin y cols., 2009). En los gatos descerebrados y en la rata neonata se ha mostrado que la administración de un agonista que se une a los receptores de aminoácidos exitadores de la familia del N-metil D-aspártico (NMDA) puede inducir la

locomoción y los antagonistas específicos de los receptores NMDA pueden impedir el inicio de la locomoción (Cazalets y cols., 1990). Estos hallazgos sugieren que la vía glutamatérgica descendentes está implicada de manera directa en el inicio de la locomoción (Mori y cols., 1992; Kandel, 2001). Finalmente, el cerebelo recibe información de los haces cerebelosos dorsal y ventral que es donde se integra la información permitiendo ajustar el patrón de la marcha, cuando los movimientos de alternancia se apartan de los movimientos de intención, son las vías cerebelosas las que participan en el ajusto. Una de las patologías más estudiadas con objetivo de entender más cuál es el rol de la vías espinocerebelosas dorsales y ventrales es el estudio de la marcha atáxica (Arshavsky y cols., 1972).

Las alteraciones caracterizadas principalmente por una falta de coordinación muscular en la postura o las extremidades resultante por una atrofia o patología del cerebelo o médula espinal involucran una marcha atáxica, esta patología fue reconocida por el neurólogo francés Pierre Marie en 1893 (Bastian y cols., 1996). La Ataxia de Friedreich es la más frecuente, es una enfermedad hereditaria que afecta a la médula espinal, inicia a partir de los cinco a los quince años de edad y se caracteriza por presentar problemas al caminar (marcha atáxica) y problemas de lenguaje (NINDS, 2007).

Modelo de los CPG's

El primer modelo es el de Thomas Graham Brown que describío 1916, se trata del modelo de los hemicentros espinales en el que cada hemicentro contiene a las tres estructuras: el generador de ritmo, el formador de patrones y las motoneuronas (Rybak y cols. 2006).

Este modelo se basa en la formación de patrones rítmicos y alternantes, posteriormente autores como McCrea, Rybak, Grillner, Burke, entre otros, aportaron componentes como son las aferencias sensitivas del órgano tendinoso de Golgi, más las interconexiones entre las motoneuronas, el rol de las interneuronas provenientes de la fibras intrafusales como lo son la Ia y las tipo II, también se ha descrito que las fibras Ib provenientes del órgano tendinoso de Golgi tienen un papel en la aferencia del GCPs (Kandel, 2001). Todo esto permitió modelar un generador central de patrones que se acoplara mejor a los movimientos más complejos o bien para el ajuste ante los obstáculos que se representan al navegar en un espacio en 3D el animal.

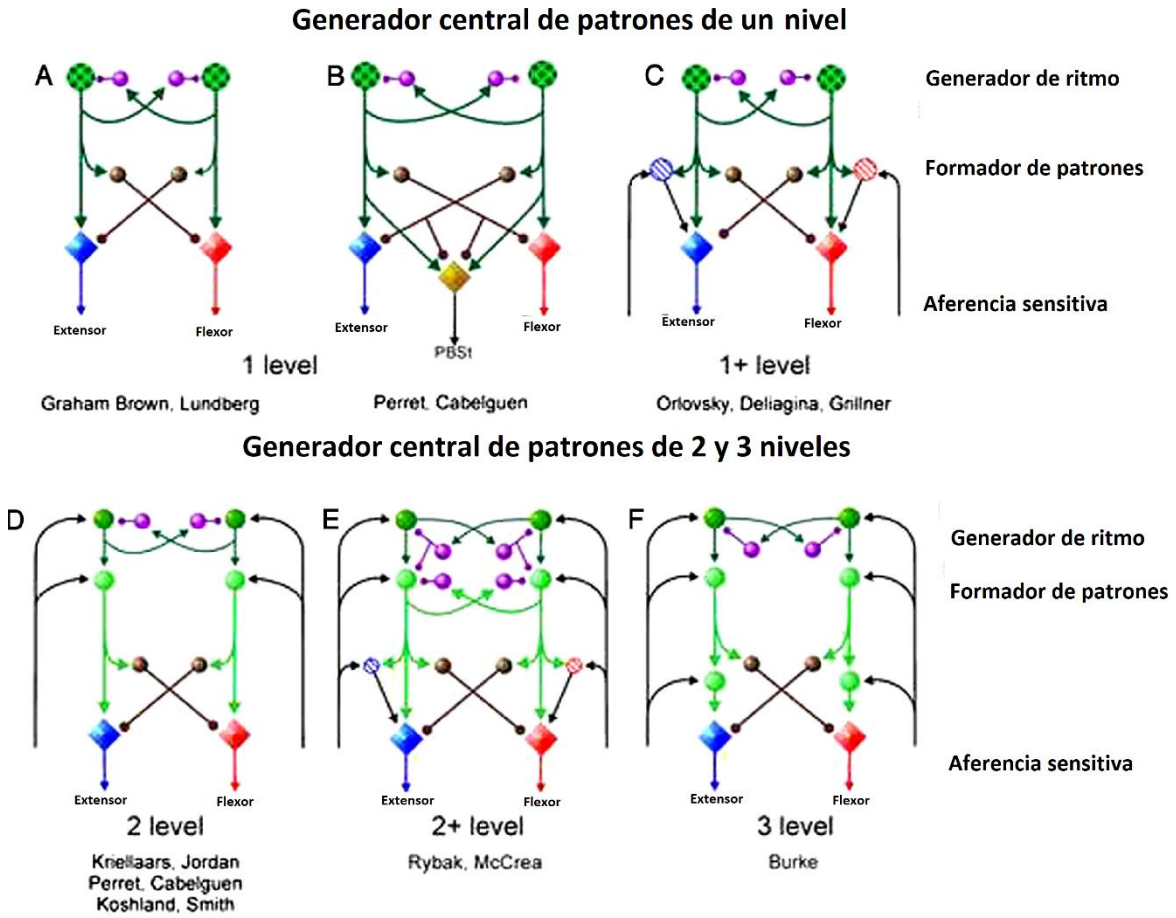

Figura 5. Diferentes modelos del generador central de patrones GPC's propuestos para la marcha. Los círculos representan las poblaciones de interneuronas y los diamantes las motoneuronas. (A-C) Modelos de generador central de patrones de un solo nivel, en el cual el ritmo y la formación de patrones se genera de las interneuronas superiores en color verde y actúa directamente sobre las motoneuronas. Los círculos cafés son las inhibiciones recíprocas de las interneuronas. (D-F) Modelos de CPG's de dos y tres niveles, en el cual las interneuronas funcionan a más niveles, el primero en verde oscuro es el generador de ritmo, el segundo en verde claro es el generador de patrones, el tercero son las aferencias sensitivas, los circuitos en morado son las inhibiciones recíprocas entre las interneuronas y en café las inhibiciones recíprocas inter-motoneuronas (Modificado de McCrea y cols; 2007).

Fisiología y biomecánica de la marcha

Los procesos biomecánicos y fisiológicos la postura y de la marcha han sido objeto de diversos estudios. El enfoque inicial fue el de Borelli y su publicación *motu animalum* a mediados del siglo XVII, posteriormente los hermanos Weber en 1873 describieron el ciclo de la marcha (Baker; 2006). Actualmente el desarrollo de las plataformas de la fuerza, así como los avances en la imagenología nos han ayudado a estudiar de manera más puntual la marcha y sus características (Dujardin y cols., 2009).

La postura es un término variable, depende del tipo de estudio que se realice, en el humano se resume en una posición erguida y bípeda, y se mantiene un equilibrio con un gasto energético mínimo. Es necesaria la activación conjunta de los músculos espinales, abdominales flexores de cadera, flexores de rodilla y flexores plantares del tobillo (Crowninshield y cols., 1981; Dujardin y cols., 2009).

De manera general la marcha es un conjunto de patrones de movimientos articulares y simétricos, que conllevan a un desplazamiento armónico desde el contacto del talón hasta el contacto con la punta del pie con la base de soporte (Dujardin y cols., 2009). Como cualquier otro proceso existe un gran número de variación dependientes del sujeto de estudio, del medio ambiente y principalmente de los patrones locomotores, por tal motivo se generaliza en un ciclo de puntos elementales:

- Fase de doble apoyo: existe contacto de ambas extremidades inferiores, el pie izquierdo se levanta progresivamente hasta la punta del pie es resultado del avance del peso del sujeto donde el vector resultante se origina en la pelvis.
- Fase unipodal: El miembro inferior contralateral es el único en contacto con la superficie, la cadera transmite la fuerza de forma céfalo-caudal, pero sin pasar por la articulación, ya que tiene un equilibrio dinámico gracias a los músculos abductores.
- Fase de oscilación: implica el retorno de los miembros inferiores a su posición inicial e inicia con la retracción del miembro que se encuentra en la parte posterior del vector central o resultante, mientras el miembro contralateral entra en extensión articular para alcanzar la fase de apoyo (Nilsson, Thorstensson y Halbertsma, 1985).
- Fase del paso: es el intervalo del contacto del talón ipsilateral hacia el talón contralateral.
- La longitud de la zancada: distancia recorrida durante el ciclo completo de la marcha (véase figura 6).

Figura 6. Fases de la marcha. Se ilustra el ciclo completo de la marcha de manera porcentual, donde se detallan los elementos en la marcha humana, la fase de apoyo y la fase de oscilación (Modificado de Dujardin y cols., 2009).

La marcha cuadrúpeda también es un ciclo dividido en fases, la primera tiene por nombre fase de oscilación, e involucra principalmente la flexión de la cadera, la rodilla y el tobillo; la segunda es la fase de apoyo y consiste en el contacto de la pata con la superficie, extensión de la rodilla y el tobillo, posteriormente existe una ligera flexión de la cadera y finalmente la extensión de los complejos articulares de la cadera, rodilla y tobillo (Parker y cols., 1990; Hamers y cols., 2001).

La marcha también consta de parámetros espacio-temporales, la velocidad observada en un grupo de adultos promedio se encuentra entre 0.7 a 1.5 m/s; aunque Whittle (1999) ha descrito que la velocidad puede alcanzar hasta los 1.6 m/s. Las ratas pueden alcanzar una velocidad promedio de 10 a 40 cm/s en ratas Sprague-Dawley adultas (Robert y cols., 1979). La cadencia es otro parámetro que se analiza en la marcha y se refiere al número de pasos por minuto, en el humano varia de 85 a 150 pasos por minuto y en la rata de 86 a 103 pasos por minuto (Cucarián y cols., 2017).

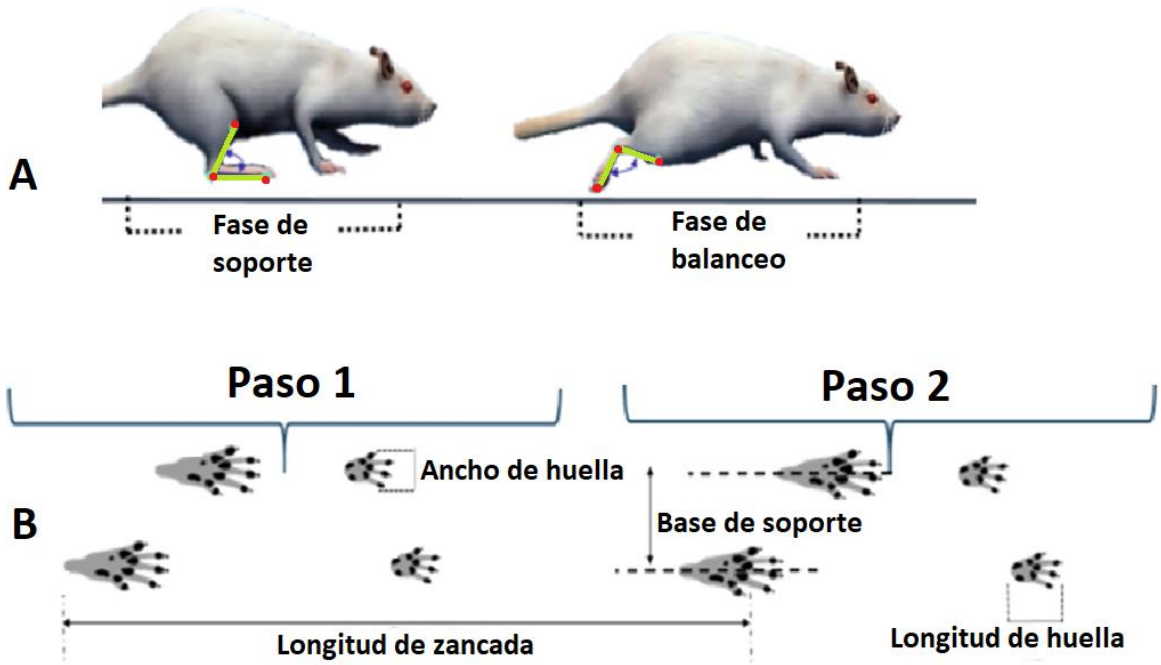

Figura 7. Esquema de los principales parámetros temporo-espaciales de la marcha de la rata. (A) Se ilustra la vista lateral de la marcha de la rata en sus dos fases, la fase de soporte y la fase de balanceo, en amarillo y rojo se muestra el ángulo de las articulaciones del tobillo y la rodilla en cada fase de la marcha. **(B)**Se ilustran los parámetros estáticos de la marcha en la rata (modificado de Cucarian y cols., 2017).

Rol de la dopamina en la marcha

La fórmula química de la dopamina es C_6H_3 (OH) 2-CH_2-CH_2-NH_2. La dopamina es una monoamina miembro de un grupo de neurotransmisores llamado catecolaminas (Iversen, 2007). En el SNC la dopamina es la mayor catecolamina presente y existen al menos 15,000 neuronas para cada hemicara del mesencéfalo; está involucrada en diferentes funciones como son la locomoción, la cognición, la regulación neuroendocrina y la conducta (Jacobs y cols., 1992). Kebabian y cols. (1978) clasificaron en dos familias a los receptores metabotrópicos de la dopamina según su acople con la enzima adenilato-ciclasa (AC) y en base también a su farmacología. La familia D1 activa a la adenilato-ciclasa y la familia D2 la inhibe (Kebabian, 1979; Jaber *y* cols., 1997; Levite y cols., 2017).

Las catecolaminas como la dopamina, adrenalina y noradrenalina se sintetizan a partier de un precursor común llamado L-tirosina, un aminoácido esencial que se obtiene a partir

de la dieta, la biosíntesis de cada catecolamina se debe a la enzima limitante tirosin-hidroxilasa. En el caso particular de la síntesis de dopamina, la tirosin-hidroxilasa actúa sobre la L-tirosina más oxigeno como base y una tetrahidrobiopterina como cofactor para formar L-Dopa y la acción de la enzima L-Dopa descarboxilasa para producir dopamina como se ilustra en la Fig. 8 (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994).

La familia de receptores dopaminérgicos D_1 está constituida por dos subtipos de receptores acoplados a proteínas Gs llamados D_1 y D_5, ya que ambos activan a la adenilato-ciclasa. La familia de receptores dopaminérgicos D2 está compuesto por los receptores D_2, D_3 y D_4, los cuales tienen una función inhibitoria sobre la adenilato-ciclasa acoplados a proteínas Gi o Gq (Mohamed y cols.,1997).

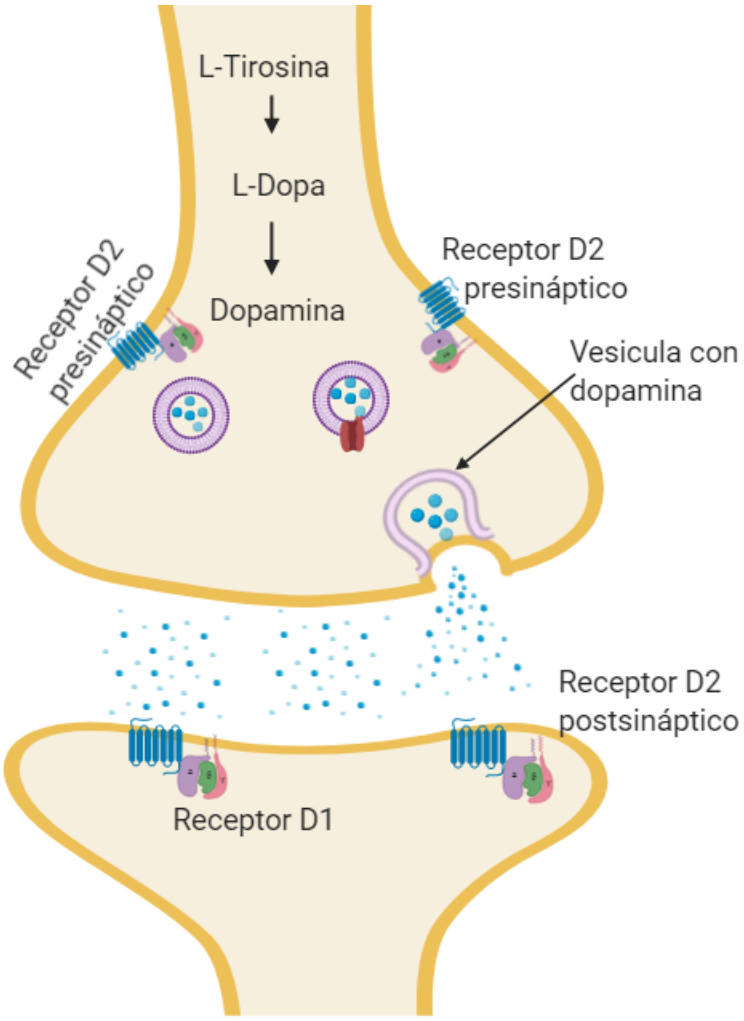

Figura 8. Esquema de una sinapsis dopaminérgica. Se ilustra una neurona presináptica, la cual sintetiza dopamina a través del aminoácido esencial L-Tirosina, la dopamina es almacenada

en vesículas. Su liberación al espacio sináptico depende de la apertura de canales de calcio y la función de las vesículas en la membrana plasmática y la liberación en la hendidura sináptica. Migra y se une a sus receptores metabotrópicos de la familia D_1 o de la familia D_2 tanto presinápticos como postsinápticos. (modificado de Barrett y cols,.2013).

La dopamina es un neurotransmisor que cumple un papel crucial en el control de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars* compacta que proyecta al caudado-putamen, regulan la iniciación y secuencia de los actos motores. La vía nigroestriatal es una de las principales vías motoras, la cual ejerce sus acciones a través de ambas familias de receptores D_1 y D_2. Dado que en la enfermedad de Parkinson se produce un deterioro de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal. Los signos motores más comunes son las alteraciones motoras como la rigidez, la discinecia y el temblor de reposo (Jaber y cols., 1997). Se ha demostrado que los ratones modificados genéticamente que presentan una alteración en los receptores D_{2L} (receptores D_2 con la isoforma larga) alterados, muestran una reducción en la actividad motora (Zang y cols., 1994). El papel de los receptores D_{2s} (receptores D_2 con la isoforma corta) modulan la función motora a través de la acción de la dopamina en la neurona presináptica, los denominados autorreceptores que se encuentran en la neurona presináptica suprimen directamente la función motora mediante la reducción de la liberación de dopamina (Wang y cols., 2000).

En el SNC las proyecciones dopaminérgicas ascendentes se dirigen al cuerpo estriado, los cuales favorecen el inicio de la locomoción mediante el aumento de la activación de los receptores a dopamina tipo D_1 expresados en neuronas espinosas medianas estriatales que participan en la vía directa (Albin y cols., 1989). Por otro lado, la dopamina disminuye la excitabilidad de las neuronas estriatales que expresan el receptor a dopamina D_2, proceso involucrado en la vía indirecta de los ganglios basales, contribuyendo a desinhibir la región mesencefálica locomotora e iniciando la marcha. (Albin y cols., 1989; Ryczko y cols., 2016). Después de la desinhibición, la región mesencefálica locomotora envía entradas glutamatérgicas excitatorias descendentes a las neuronas retículo-espinales activando el generador central de patrones para la locomoción (Jordán y cols., 1980; Grillen y cols., 1987; Briznar y cols., 2013).

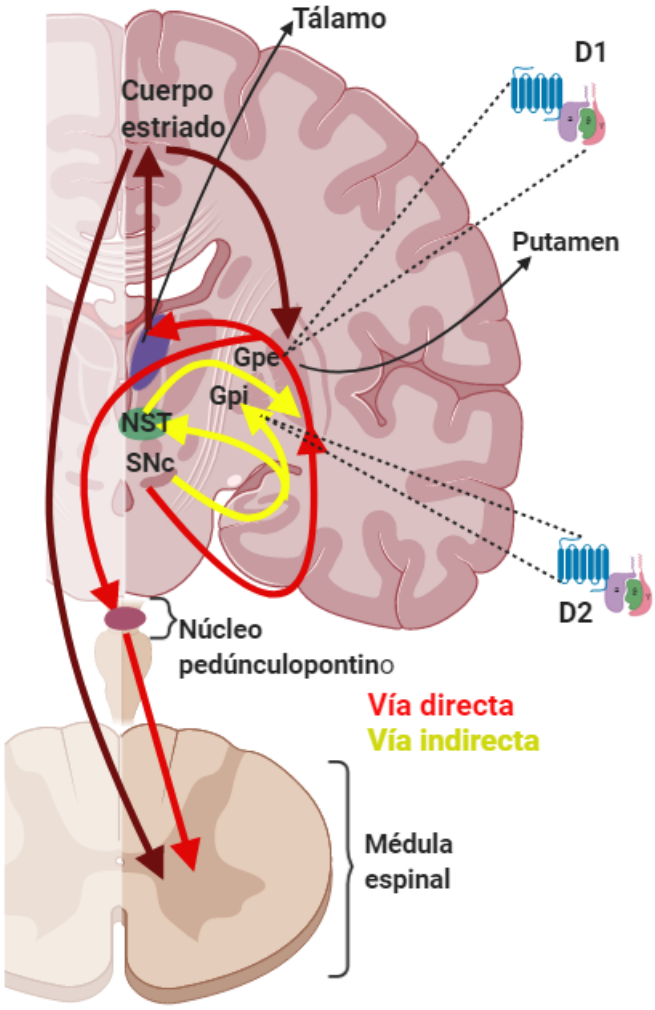

Figura 9. Circuito de redes anatómicas entre los ganglios basales, el tálamo y el cuerpo estriado, ilustrando la vía directa y la vía indirecta. Los receptores para dopamina D1 y D2 se encuentran en las neuronas de eferencia procedentes del cuerpo estriado, los cuales dan lugar a la vía directa y la vía indirecta. En amarillo se ilustran las vías inhibitorias y en rojo las vías excitatorias. SNc=sustancia *nigra* compacta; GPi= globo pálido interno; GPe= globo pálido externo; NST= núcleo subtalámico (modificado de Kandel, 2001).

La familia de receptores dopaminérgicos D2

En general todos los receptores dopaminérgicos constan de 7 dominios transmembranales y cada uno de ellos tiene de 20 a 25 residuos hidrofóbicos. Este receptor es metabotrópico, ya que está acoplado a proteínas Gi (Jaber y cols., 1997).

El receptor para la dopamina del tipo D2 fue el primer obtenido por clonación en los experimentos de Bunzow y cols. (1988); la proteína se obtuvo de las células de fibroblastos de ratones. El receptor D2 comparte homología estructural con los receptores D3 y D4, en su asa intramembranal i3 muy largo de aproximadamente 101 a 166 aminoácidos (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994).

Los receptores D2 tiene 2 morfologías procesadas por la lectura alternativa del ácido ribonucleico mensajero (ARNm), el primero es el D2S (corto) que se denomina así por su forma corta, ya que consta tan solo de 414 aminoácidos en el humano y de 415 en la rata (Kukstas y cols.,1991). El D2L (largo) posee una forma larga de 443 aminoácidos en el humano y 444 en la rata, la diferencia se observa en la región intracelular (i3) el cual es crítico para el acople a las proteínas Gi. Todos los segmentos integrales están conectados por asas, 3 intracelulares y 3 extracelulares (Missale y cols., 1998).

Los receptores D2 también funcionan como autorreceptores, y se han descrito que son los encargados de regular la producción y secreción de dopamina y son capaces de modular la liberación de otros neurotransmisores (Jackson y cols., 1994).

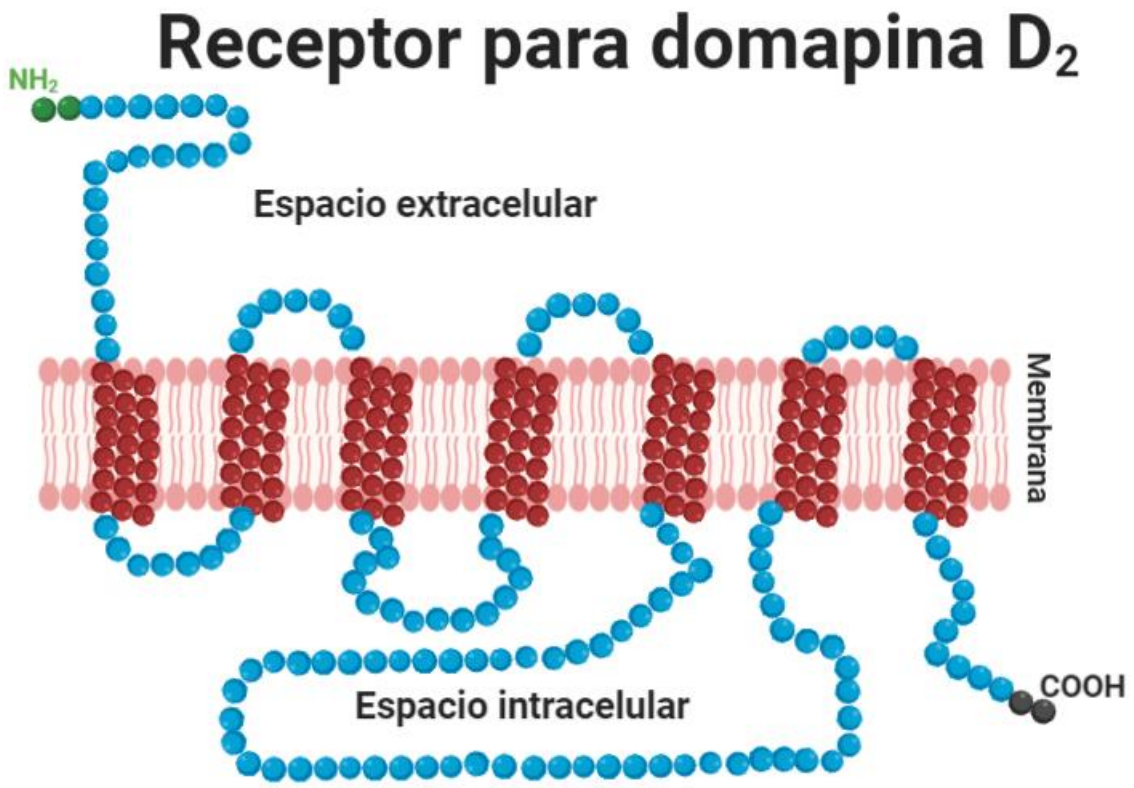

Figura 10. Estructura del receptor D2 de dopamina. Descripción gráfica de la estructura del receptor D2 para la dopamina. Se muestra la zona extracelular, la zona intramembranal en color ocre y la zona citoplasmática (modificado de Jackson y Westlind-Danielsson, 1994).

El pramipexol: como un agonista dopaminérgico específico para los receptores de la familia D2

El pramipexol ((6S) -6-N-propil-4,5,6,7-tetrahidro-1,3-benzotiazol-2,6-diamina), es un derivado de aminobenzotiazol sintético, se une a los receptores de dopamina D3 con una afinidad siete veces mayor para los receptores D2 y D4 (Watts, 1997).

Es indicado principalmente en la enfermedad de Parkinson, pero diversos estudios han mostrado que el uso del pramipexol en la encefalomielitis alérgica experimental, el modelo animal mas utilizado para el estudio de la esclerosis múltiple, y el cual regula los receptores dopaminérgicos D2 presentes en la superficie de las celulas T, en las celulas dentríticas y en otras células inmunes, el resultado es el decremento del proceso neuroinflamatorio, la pérdia de mielina y la astrogliosis reactiva en la médula espinal (Vicente Lieberknech y cols, 2016).

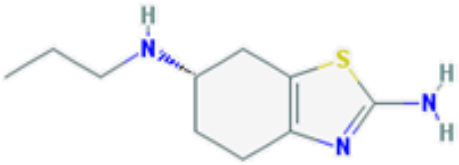

Figura 11. Estructura química del pramipexol. Se ilustra su fórmula molecular $C_{10}H_{17}N_3S$, funciona como un agonista de dopamina de la familia D2. Es utilizado como un agente antiparkinsoniano y para el síndrome de piernas inquietas un trastorno del sueño, con menos frecuencia se ha utilizado para tratar la cefalea y el trastorno bipolar (modificado de Pubchem).

Rol de la serotonina en la marcha

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5HT) es una monoamina producida a partir del L-Triptófano, un aminoácido esencial que lo obtenemos de la dieta, funge como mensajero y regulador bioquímico, su ubicación principal es en el SNC, aunque también en el tracto gastrointestinal y las plaquetas (Jacobs y cols., 1992). Entre sus funciones se describen la neurotransmisión y la neuromodulación, conducta locomoción, sueño, vigilia, respiración, alimentación entre otras (Berger y cols., 2009). Se estima que existen alrededor de 200,000 neuronas serotonérgicas tan solo en el SNC (Jacobs y cols., 1992). El L-triptófano pasa a través de la barrera hematoencefálica y es sintetizado por la enzima triptófano hidroxilasa-2 (THP2), encargada de la producción de la serotonina en el sistema nervioso central (Sablin y cols., 1998). Para la serotonina se describe una amplia clasificación de receptores tomando criterios farmacológicos y biológicos; existen siete grupos principales que se denominan desde 5HT1 hasta 5HT7 (Jacobs y cols., 1992; Wang ycols., 2013; Kandel, 2001).

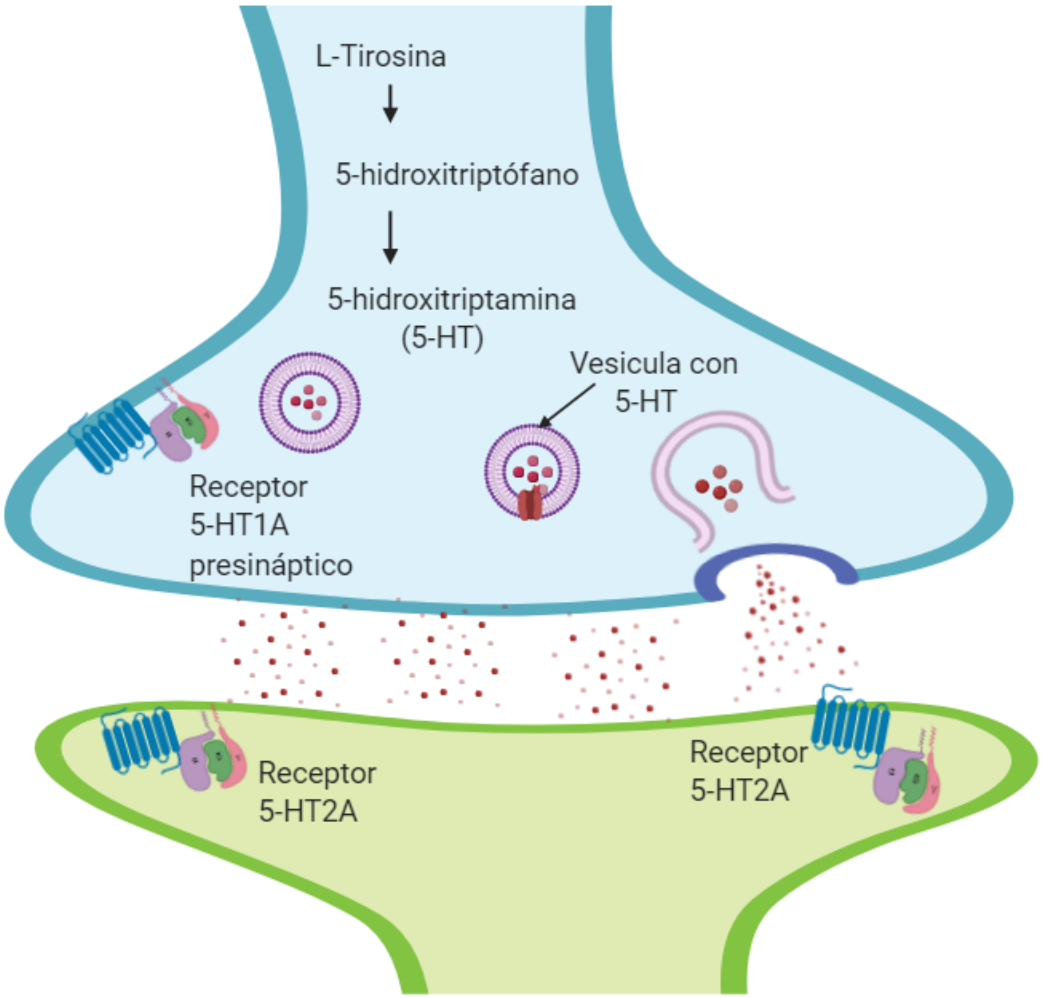

Figura 12. Esquema de una neurona serotonérgica. Se ilustra una sinapsis serotonérgica procedente del núcleo del rafé dorsal a una interneurona de las astas posteriores. La biosíntesis de la 5-HT se lleva a cabo en la neurona serotonérgica, se almacena en vesículas para poder ser liberada en la hendidura sináptica y poder interactuar con los receptores, se conocen 7 familias que van del tipo 5-HT_1 al 5-HT_7. En la figura se puden observar los receptores presinápticos 5-$HT1_A$ y los postsinápticos $5HT2_A$ (modificado de Olivier y cols., 1999).

En la literatura se ha descrito que el núcleo cuneiforme y el núcleo pedunculopontino forman parte de la región mesencefálica locomotora (RML), dichas estructuras reciben aferencias del cerebro anterior y de los ganglios basales; de dichos núcleos se proyectan las vías serotoninérgicas descendentes de la RML incluidas en la vía retículo-espinal, las cuales están involucradas en la modulación de la locomoción inducida por la estimulación eléctrica de la RML, finalmente las vías serotoninérgicas descendentes se encuentran

modulando de manera activa los generadores centrales de patrones (Gerin y cols., 1998). Diversos estudios revelan que los receptores de serotonina ubicados en la médula espinal están involucrados en la activación y modulación de los generadores centrales de patrones a través de los receptores: 5HT 1_A, $5HT2_A$ y $5HT_7$.

Tabla 1. Receptores para 5-HT con sus agonistas y antagonistas en el SNC

Receptor	*Tipo*	*Función*	*Ubicación*	*Agonista*	*Antagonista*
5-HT$_{1A}$	M	Inhibe el adenilato ciclasa, aumenta la conductancia de K+	Corteza cerebral, hipocampo, amígdala y núcleos del rafé	8-OH-DPAT Buspirona Ipsapirona Flesinoxan 5-CT Quetiapina	WAY100635 5-F8-OH-DPAT Spiperona Subutramina
5-HT$_{1B}$	M	Inhibe el adenilato ciclasa	Sustancia *nigra*	5-CT 8-OH-DPAT Sumatriptán Ergotramina	GR55562 SB224289 SB2336057 Metiotepina Cynopindolol
5-HT$_{1D}$	M	Inhibe el adenilato ciclasa	Vasos sanguíneos	Sumatriptán Zolmitriptán Nortriptán L694247 Ergotramina	Metiotepina Ergotramina BRL15572
5-HT$_{1E}$	M	Inhibe el adenilato ciclasa	Corteza	BRL-54443 5-CT	Metiotepina
5-HT$_{1F}$	M	Inhibe el adenilato ciclasa	Hipocampo y médula espinal	Desconocido	Desconocido
5-HT$_{2A}$	M	Activa la fosfolipasa C	Corteza, ganglios basales, corteza entorrinal, bulbo olfatorio,	α-metil 5-HT 5-CT Sumatriptán Quipacina LSD 8-OH-DPAT	Ketanserina Ciproheptadina Pizotifina Risperiridona Olanzapina Laclozapina RS127445 SB204741

			médula espinal		
5-HT$_{2B}$	M	Activa la fosfolipasa C	Cerebelo, hipotálamo	Sumatriptan 5-CT BW723C86	RS127445 SB204741
5-HT$_{2C}$	M	Activa la fosfolipasa C	Plexo coroideo, hipocampo, hipotálamo	α-metil 5-HT 5-CT Quipacina	Metilsergida Olanzapina Mesulergina
5-HT$_{3}$	I	Canal iónico dependiente de ligando	Área postrema	2-me5-HT 5-MeOT	Ondansetrona Tropisetrona Granisetrona
5-HT$_{4}$	M	Activa adenilato cilasa	Hipocampo	Mosaprida Cisapripa Zacoprida	GR113808 SB204070
5-HT$_{5A}$	M	Disminución del AMPc	Bulbo olfatorio, hebenula	No hay agonista selectivo	No hay antagonista selectivo
5-HT$_{5B}$	M		Bulbo olfatorio	No hay agonista selectivo	No hay antagonista selectivo
5-HT$_{6}$	M	Aumento de AMPc	Putamen, caudado, hipocampo	No hay agonista selectivo	SB271046 Metiotepina
5-HT$_{7}$	M	Aumento de AMPc	Hipotálamo, médula espinal	Sumatriptán 8-OH-DPAT	SB258719 Metiotepina

Se ilustra una tabla de las siete familias de receptores para 5-HT, describiendo el tipo de receptor, la función, la ubicación, los agonistas y los antagonistas de subtipo. M=metabotrópico, I=Ionotrópico (modificado de Hayes y cols., 2010; Pithadia y cols., 2009).

El receptor 5TH1$_A$

El receptor 5HT1$_A$ es una de las isoformas más expresadas en la médula espinal de los mamíferos, consta de siete segmentos transmembranales y está anclado a una proteína Gi (Olivier y cols.,1999). Su función principal es la de producir adenosinmonofosfato-cíclico (AMPc) atreves de la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC). Se describe que está formado por 421 aminoácidos en humanos y 422 en ratas (Chanda y cols., 1993). La activación de la proteína Gi produce la apertura de los canales de potasio (K+) y por consecuencia, repolariza a la membrana celular disminuyendo la actividad neuronal (Jacobs y cols., 1992; Wang y cols., 2013; Albert y cols., 2004).

El receptor para la serotonina tipo 5TH2$_A$

Es un receptor que pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR; de sus siglas en ingles), específicamente acoplado a una proteína Gq, denominados colectivamente como un grupo de receptores neuromoduladores que se encuentran en el tallo cerebral, la corteza, bulbo olfatorio, el núcleo del nervio hipogloso y en el asta dorsal de la médula espinal (Fonseca *y* cols., 2001). La activación de esta proteína produce un incremento de los niveles de inositol trifosfato (IP_3), por consecuencia, tiene actividad excitatoria en las neuronas que poseen este tipo de receptor (Jacobs y cols., 1992).

El 8-OH-DPAT como un agonista específico para los receptores 5HT1$_A$

El 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina; 7- (dipropilamino) -5,6,7,8-tetrahidronaftalen-1-ol (8-OH-DPAT), es un agonista para los receptores de serotonina 5HT1$_A$ y 5HT7, el cual reduce la velocidad de activación de las células del rafé al activar a los receptores presinápticos 5HT1$_A$ e inhibe la activación neuronal por la interacción directa con receptores postsinápticos. Este agonista ha sido ampliamente utilizado en los procesos de neuroinflamación, la locomoción, la depresión, la ansiedad y en el estudio de la conducta sexual (Cossio y cols., 2007).

La quipacina un agonista de los receptores postsinápticos

La quipacina es un agonista no selectivo derivado de piperazina, actúa sobre los receptores 5-HT2A y 5-HT3 y fue diseñado, en un inicio, para actuar como un analgésico con efecto antiinflamatorio (Rodriguez y cols., 1973). Pero los estudios de su farmacodinamia mostraron la capacidad de contraer el músculo liso, en especial el uterino en la rata (Peroutka y cols., 1988). En preparaciones de útero de rata se obtuvo un efecto oxitócico de la quipacina al utilizar un antagonista de serotonina, por tal motivo se realizaron estudios comparativos con la serotonina y descubrieron que este fármaco solo tiene afinidad para los receptores específicos 5-HT2A y 5-TH3 (Peroutka y cols., 1988; Cossio y cols., 2007).

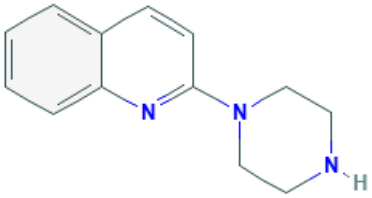

Figura 13. Estructura química de la quipacina. (2-piperazin-1-ilquinoline) La quipacina es un agonista no selectivo de los receptores de 5-HT, muestra actividades antidepresivas y oxitócicas (modificado de pubchem, 2005).

Antecedentes

La rata *taiep* es una mutante de mielina que se obtuvo a partir de una mutación espontánea de una colonia de ratas de la cepa Sprague-Dawley en el bioterio del laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y Control Motor del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (Holmgren y cols., 1989). La mutación surgió en el proceso para producir una rata con una alta frecuencia de bostezo espontáneo denominado de alto bostezo o HY (de sus siglas en ingles High-Yawning); (Urbá-Holmgren, 1990). La enfermedad se hereda como un carácter autosómico recesivo y la alteración radica en el cromosoma 9, específicamente en el gen TUBB4a que codifica para la beta tubulina (Li y cols., 2003; Duncan y cols., 2017; Garduno-Robles y cols., 2020; Hernández y cols., sometido a consideración editorial). La tubulina es una proteína necesaria para la producción de microtúbulos y la tubulina 4 se expresa exclusivamente en los oligodendrocitos. Juega un rol fundamental en la polarización del soma y los procesos, en el crecimiento de los mismos (Gonçalves y cols., 2018). Las tubulinopatías son un grupo heterogéneo de patologías recientemente descritas, asociadas a la expresión de tubulinas alfa, beta, gama y de las proteínas ligadas a los microtúbulos como son las dineínas y las kinesinas. En particular las mutaciones humanas de la TUBB4 no causan malformaciones cerebrales y están ligadas a la distonias-4 y H-ABC (Gonçalves y cols., 2018).

La rata *taiep* muestra una hipomielinización inicial en el SNC seguido de desmielinización progresiva pero el mutante sobrevive hasta los 24 meses, esto se refiere a que tiene una expectativa de vida normal, lo que es inédito entre los modelos de mielina (Duncan y cols., 1992; Lunn y cols., 1997). El nombre *taiep* es un acrónimo de los principales signos motores que se observan en el trascurso de su vida, los cuales son: temblor, ataxia, inmovilidad , epilepsia y parálisis del tren posterior (Holmgren y cols., 1989; Cortés y cols., 2005).

En varios estudios se ha reportado que el mutante de mielina puede vivir hasta los 24 meses con cuidados especiales (Cortes y cols., 2010; Duncan y cols., 2017; Blakemore y cols., 2005), este hallazgo es relevante ya que otro tipo de mutantes de mielina como la rata md (deficiente de mielina de sus siglas en inglés), vive tan solo un promedio de 28

días (Duncan y cols., 1992). Por lo antes mencionado la rata *taiep* es el mutante de mielina con mayor longevidad descrito a la fecha (Eguibar y cols., aceptado para su publicación 2020).

Se ha reportado que la desmielinización progresiva produce alteraciones en los tractos cortico-espinales encargados de las funciones motoras y se ve reflejado en conductas como la marcha. En un estudio preliminar en nuestro laboratorio Rocha (2013) mostró que el ciclo de la marcha de la rata *taiep* es más lento que el de la cepa Sprague-Dawley.

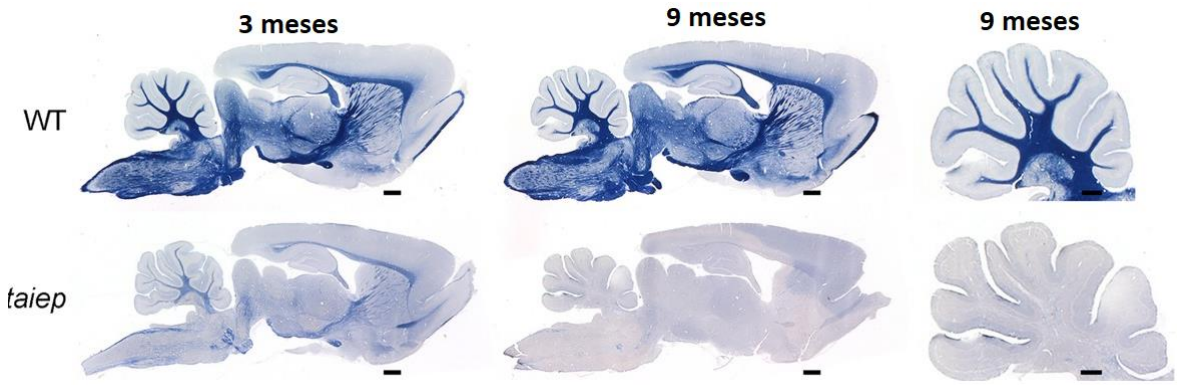

Figura 14. Corte transversal de cerebro de una rata *taiep* y de una rata de la cepa Sprague-Dawley. Se observa hipomielinización inicial en la rata *taiep* en comparación de la rata Sprague-Dawley (SD) y un proceso de desmielinización progresiva a los tres meses que se exacerba a los nueve meses de vida. En azul oscuro se muestra la concentración de mielina utilizando la técnica de azul de nitro-tetrasolio y diaminobenzamida (modificado de Duncan y cols., 2017).

En condiciones fisiológicas la producción de la mielina requiere de los oligodendrocitos para sintetizar distintas proteínas para la correcta formación de la vaina de mielina (Eguibar y cols., aceptado para su publicación, 2020). En la rata *taiep* todas las proteínas necesarias para la formación de la mielina se encuentran disminuidas como son la proteína básica de la mielina (PBM), la proteína proteolípidica (PLP), la glicoproteína asociada a la mielina (GAM), la proteína básica de la mielina (PBM), y la enzima 2,3-nucleótido cíclico 3 fosfodiesterasa (CNP); (Möller y cols., 1997). En estudios previos se ha reportado que las proteínas asociadas a la producción y mantenimiento de la mielina se encuentran disminuidos en la rata *taiep* con relación a la rata Sprague-Dawley, aunado

a esto, el nivel de proteínas y de lípidos disminuyen con la edad (Möller y cols., 1997; O'Connor y cols., 2000; Eguibar y cols., 2014).

La alteración de la mielina se debe a una acumulación anormal de microtúbulos en el retículo endoplásmico rugoso de los oligodendrocitos, evento que interrumpe el transporte de las proteínas desde del retículo endoplásmico hacia la porción Cis del aparato de Golgi. La PLP es sintetizada en el retículo endoplásmico y posterioremente en el aparato de Golgi, sin embargo, la PBM es sintetizada por ribosomas libres para después llegar a la membrana y se alinearse en forma de gránulos a los microtúbulos en la membrana (Ainger y cols., 1993). El uso de nocodazol o colchicina compromete el transporte del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) de la MBP interrumpiendo la incorporación de la PLP a la membrana de la mielina, estos estudios indican que la estructura normal de los microtúbulos en los oligodendrocitos es esencial para el transporte adecuado de las proteínas esenciales para la producción y mantenimiento de las vainas de mielina en los axones. De tal forma que en los oligodendrocitos de la rata *taiep* el transporte es anormal, esto fue mostrado por Song y cols., realizando un experimento en un cultivo de oligodendrocitos en ratas Sprague-Dawley y ratas *taeip,* observaron que el movimiento de la PLP es hacia delante, caso no sucedido en la rata *taiep* ya que el movimiento inicial es hacia adelante, pero las redes exacerbadas de los microtúbulos provocan que el movimiento de esta proteína sea hacia atrás. De tal forma que, los oligodendrocitos de la rata *taiep* liberan una menor cantidad las proteínas asociadas a la producción y el mantenimiento de la mielina (Lunn y cols., 1997; Song y cols 1999).

A nivel ultraestructural existe una acumulación de microtúbulos (MT) unida al retículo endoplásmico (ER) formando el denominado complejo MT-ER. Couve y cols; en 1997 propuso que el complejo MT-ER son los responsables del bloqueo del transporte intracelular de las proteínas y lípidos necesarios para la producción y el mantenimiento de la mielina (Couve y cols., 1997). Adicionalmente, los oligodendrocitos de la rata *taiep* muestran niveles altos de microtúbulos y de la proteína asociada a microtúbulos (MAP1b), respecto a las ratas Sprague-Dawley (Song y cols., 1999; O'Connor y cols., 2000)

Todas las vías que tienen un proceso de mielinización tardía, esto es que se dan después del nacimiento son más afectadas en la rata *taeip*, dentro de las cuales encontramos la

vía cortico-espinal, las columnas dorsales de la médula espinal y el nervio óptico (Lunn y cols., 1997). En comparación con las vías que ya están mielinizadas al momento de nacer como son las columnas ventrales que están menos afectadas, lo que describe que no existe una homogeneidad en cómo se afectan los distintos haces del SNC (Lunn y cols., 1997).

La Dra. León Chávez y cols., (2001) han demostrado que en el SNC de la rata *taiep* existe una astrocitosis reactiva desde los quince días de edad en el tronco encefálico, la cual es progresiva hasta los seis meses de edad afectando a todas las regiones del cerebro. Por otra parte, existe un aumento en algunas citoquinas pro-inflamatorias por lo que se puede atribuir que existe una neuroinflamación crónica en el mutante de mielina *taiep* (León Chávez y cols., 2001; Soto-Rodriguez y cols., 2015).

En el caso de la esclerosis múltiple datos epidemiológicos han demostrado que existe una uniformidad en las fases progresivas de la esclerosis múltiple, y se ha propuesto que sea independiente de la inflamación lo que ocasiona distintos grados de discapacidad. Por tal motivo la degeneración crónica del axón está relacionada a la disfunción crónica de los oligodendrocitos produciendo desmielinización, de tal manera que esto se ve reflejado el grado de discapacidad en los pacientes con esclerosis múltiple primaria progresiva (Wilkins y cols., 2010). Otra hipótesis es que los oligodendrocitos presentan apoptosis por una interacción con las citocinas proinflamatorias a través del receptor fas, este receptor está involucrado en procesos apoptóticos (D’Souza y cols., 1996).

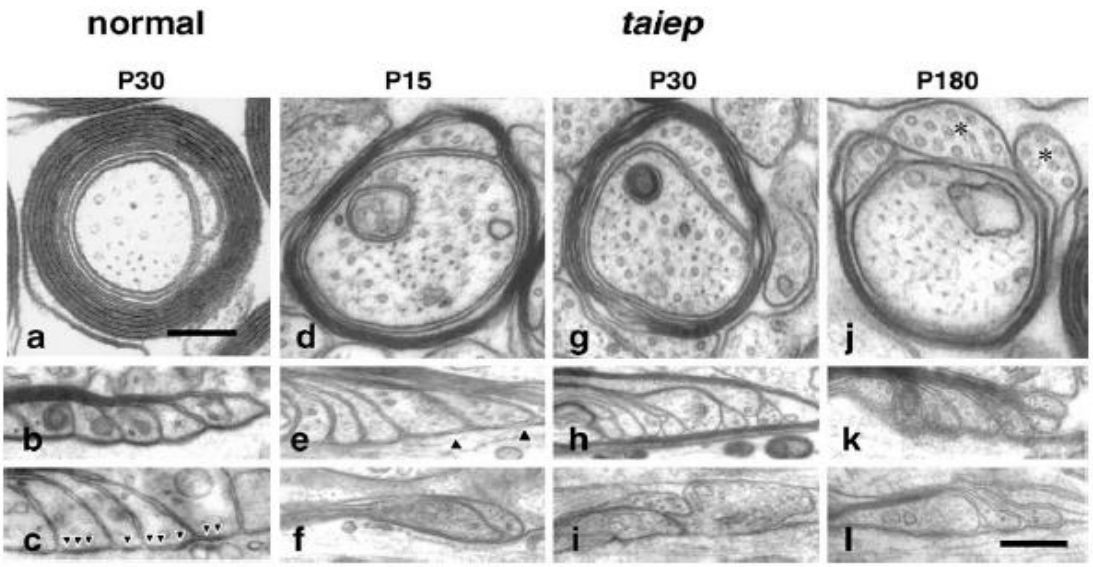

Figura 15. Microscopía electrónica de transmisión representativa de la alteración en oligodendrocitos y daño axonal en la rata *taiep*. Hipomielinización seguida de desmielinización en la rata *taiep*(g,j) respecto a las ratas Sprague-Dawley (a,d) y se muestra la acumulación de microtúbulos en los oligodendrocitos de la rata *taiep* (Roncagliolo y cols., 2000).

La proteína básica de la mielina (PBM) es el componente proteico mayoritario de la mielina y fue el primer autoantígeno descrito en la esclerosis múltiple, basado en los resultados obtenidos con el modelo de encefalomielitis alérgica experimental (EAE), las respuestas en las células T, presentan un patrón de reconocimiento hacia la proteína básica de la mielina, la que desencadena una reacción inmune inflamatoria (Zhang y cols., 2004).

La esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson, la encefalomielitis alérgica experimental, así como la depresión presentan un componente neuroinflamatorio, en la bibliografía se han descrito que los receptores para dopamina D_2 y D_3 modulan la inflamación (Madden y cols., 1985). El pramipexol podría modular los efectos inflamatorios, como se ha investigado en la enfermedad de Parkinson y en la esclerosis múltiple (Mierau y cols., 1992; Deutschländer *y* cols., 2016).

La serotonina es el principal neurotransmisor en la activación de los GPCs (Cazalets y cols., 1990; Harris-Warrick y cols., 1985). Se ha descrito que el uso crónico de agonistas de receptores $5TH1_A$, $5TH2_A$ y 5HT7 para la serotonina, mejoran el ritmo de los CPGs de

la marcha tanto en ratas como en ratones con lesión medular por contusión (Antri, Orsal y Barthe, 2002; Antri *y* cols., 2003; Landry y cols., 2004).

La dopamina también tiene un rol importante en la modulación de los movimientos, está presente en los ganglios basales y en la sustancia *nigra pars* compacta coordinando la vía directa e indirecta de los ganglios basales mediante la activación de los receptores para la dopamina D_1 y D_2 respectivamente (Carlsson y cols., 1958, 1959; Kravitz y cols., 2010). Las neuronas dopaminérgicas envían conexiones a la región locomotora mesencefálica del tronco encefálico para controlar la velocidad de la locomoción y su intensidad, la cual comprende el núcleo pedúnculopontino, el núcleo cuneiforme y las estructuras circundantes (Shik y cols., 1996, Ryzcko y cols., 2013). En las ratas se ha reportado que las neuronas dopaminérgicas en los núcleos pedúnculopontio y cuneiforme están involucrados en los procesos locomotores, estos experimentos de realizaron mediante estudios radiométricos y de microdiálisis (Saavedra y cols., Steiniger y cols., 2003).

Justificación

La organización mundial de la salud clasifica a la esclerosis múltiple primaria progresiva como una patología de alta incidencia, se ha reportado que el 15% de los pacientes con esclerosis múltiple remitente-recurrente evolucionan a dicha clasificación. Es importante conocer e indagar recursos farmacológicos para disminuir el cuadro clínico y mejorar la calidad de vida del paciente.

La rata *taiep* comparte características en transcurso de la patología de la esclerosis múltiple primaria progresiva, aunque con diferente etiología. Mejorar mediante serotonérgicos o dopaminérgicos el patrón de la marcha, puede proveer de herramientas para la investigación de futuros tratamientos para mejorar la marcha.

En el transcurso del desarrollo de esta tesis se reportó que la rata *taiep* es un modelo de tubulinopatía ya que tiene una mutación puntual en el gen de la tubulina 4-A con un cambio de una aspargina por lisina (Duncan y cols., 2017; Hernández-Gonzáles y cols., aceptado para su publicación 2020 Frontier in Neuroscience).

Esto en la rata *taiep* es un modelo de hipomielinización con atrofia de los ganglios basales (H-ABC, de sus siglas en inglés). Reciente mente hemos podido mostrar empleando resonancia magnética funcional las similitudes entre la H-ABC y la rata *taiep* (Garduño-Robles cols., 2020; Eguibar y cols., aceptado para su publicación 2020, Elservier LTD).

Hipótesis

Los agonistas específicos para los receptores dopaminérgicos de la familia D_2 o para la serotonina subtipos 5-$HT1_A$ y 5-$HT2_A$ mejorarán la velocidad, la cadencia y la coordinación del ciclo de la marcha en el mutante de mielina *taiep*.

Objetivo General

Determinar los parámetros de la marcha antes y después de la administración sistémica de las drogas pramipexol, 8-OH-DPAT y quipacina.

Objetivos específicos

1. Evaluar los efectos con diferentes dosis en los parámetros de la marcha en la rata *taiep* después de la administración sistémica del agonista D2 pramipexol.
2. Evaluar los efectos con diferentes dosis en los parámetros de la marcha en la rata *taiep* con el agonista para el receptor 5-$HT1_A$ empleando el 8-OH-DPAT.
3. Evaluar los efectos con diferentes dosis en los sobre los parámetros de la marcha en la rata *taiep* con el agonista de 5-$HT2_A$ a través de la quipacina.

Metodología

Animales

Los sujetos de experimentación (Ss) fueron ratas *taiep* macho de tres meses de edad $\bar{x} \pm SEM$ de los meses. Los cuales se obtuvieron del bioterio del Laboratorio Neurofisiología de la Conducta y Control Motor del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los Ss permanecieron en un ciclo luz-oscuridad 12:12 (las luces se encienden a las 1900), en condiciones ambientales controladas 22 ± 2 ° C y humedad de 35-40%. Permanecieron 2 o 3 Ss por jaula de acrílico de 6mm con medidas de 32 cm de ancho, 47 cm de largo y 20 cm de alto y acceso libre agua purificada (Ciel, Coca Cola Co., México) y alimento balanceado para roedores (Purina Mills, EUA). Los procedimientos descritos se realizaron conforme a las leyes y códigos aprobados en el Título Séptimo del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación en Salud del gobierno mexicano (NOM-062-ZOO-1999), y que se apega a la guía de los Institutos Nacionales de Salud de los EUA NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio (85-23, revisado en 1985), el protocolo ha sido aprobado en el CICUAL-BUAP No 100157552018-G.

Drogas

Se emplearon: dihidrocloruro de pramiprexol, (un agonista para el receptor de dopamina D2), a dos diferentes dosis de 0.5 y 1 mg/Kg por vía intraperitoneal (i.p.), hidrobromuro de 8-OH-DPAT, (un agonista para el receptor de serotonina 5-HT_{1A}, con tres dosis 0.0825, 0.125 y 0.25 mg/Kg por vía subcutánea (s.c.) y quipacina maleato, (un agonista para el receptor de serotonina 5-HT_{2A}, a las dosis de 0.5 y 1 mg/Kg por vía i.p. Todas las drogas fueron disueltas en solución salina isotónica (NaCL 0.9%, PISA laboratorios) para su administración. (Schepisi y cols., 2013; Chang y cols., 2011; Hjorth y cols., 1988; Antri y cols., 2003; Landry y cols., 2004; Fone y cols., 1991; Gerasimenko y cols., 2007; Leon y cols., 2006). Las drogas fueron obtenidas de Sigma-Aldrich (EUA).

Equipo para el análisis de la marcha en la rata *taiep*

Se empleó un equipo tipo pasarela CatWalk™ (Noldus Technologies, Países Bajos) para medir la velocidad, coordinación y los patrones de la marcha cuadrúpeda en la rata *taiep*. El equipo consta de una pasarela con un extremo abierto y las paredes delimitadas por paneles de Plexiglás negro, el techo que cubre la pasarela es una lámpara de diodos emisores de luz de color rojo; el piso es un vidrio de 6mm de espesor, de 120 cm de largo y 21 cm de ancho iluminado por el medio de una luz verde, la cual se difracta al contacto de cada una de las extremidades de la rata y es proporcional a la fuerza de presión que ejerce sobre el vidrio. El patrón de la marcha se obtiene mediante una cámara de alta velocidad (Gevicam modelo GP-2360C) ubicada en un ángulo perpendicular debajo de la pasarela la cual detecta la luz de las huellas de la rata y es enviado a un servidor modelo Dell precisión T3500 (Figura 14).

Para el análisis del video es empleado el programa CatWalk ™ versión 9.1 bajo el sistema operativo Windows 7, se determinaron la velocidad de la marcha, la duración de la fase de soporte de las extremidades anteriores y las posteriores, la fase de soportes de las extremidades anteriores y las posteriores, la longitud de la zancada de las extremidades anteriores y de las posteriores, la cadencia y el índice de regularidad de la marcha.

Los Ss son entrenados para que deambulen tres veces por siete días consecutivos sobre la pasarela se empleó cereal Frut Loops™ de Kellogg's para incentivar el aprendizaje durante la fase de entrenamiento. Posteriormente se deja deambular libremente por la pasarela, al concluir el sujeto se introducirá en una caja de madera que simula un túnel y desemboca en una caja de acrílico con medidas de 8 X 24.5 X 15 cm, ya que los roedores prefieren los espacios oscuros y cerrados (Rene y cols., 2014) (véase Figura 14).

Figura 16. Equipo de análisis tipo pasarela Catwalk XT. Vista anterior de la pasarela Catwalk XT con la cámara Gevicam colocada en el ángulo inferior para registrar la marcha de la rata. En la parte superior se observa la pasarela con piso de cristal iluminado en color verde, en donde deambula la rata para el registro del patrón de la marcha (Ahumada, 2018).

Los parámetros para el análisis de la marcha en la rata *taiep*

El análisis de los datos consta de los siguientes parámetros: duración de la fase de soporte, duración de la fase de balanceo, longitud de zancada, velocidad, cadencia e índice de regularidad de la marcha. La mayoría de los parámetros se expresan por separado para las patas delanteras y para las traseras. El programa de cómputo CatWalk 9.1 proporciona los valores para cada una de las cuatro patas. Por lo tanto, estos fueron promediados.

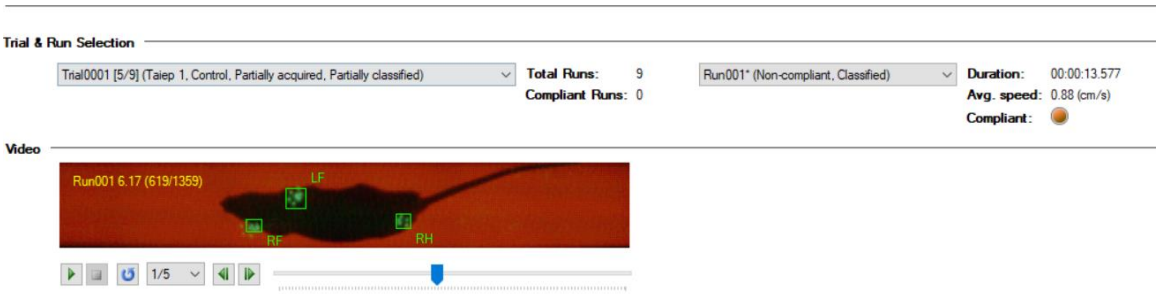

Figura 17. Análisis de la marcha e impresión de las huellas. El registro de los patrones temporo-espaciales de la marcha en la rata. El video presenta a una rata deambulando y lo que

proporciona cada uno de sus pasos, permitiendo analizar el patrón de la marcha, su secuencia y regularidad (Ahumada, 2018).

Tabla 2. Parámetros a evaluar en la rata *taiep*

Parámetro a evaluar	Descripción	Interpretación
Duración de la fase de soporte.	Duración en segundos del contacto de las patas en el piso de cristal.	El aumento de la duración de la fase de soporte sugiere un mecanismo compensatorio en alteraciones motoras, sin embargo, una disminución puede implicar otras alteraciones como dolor.
Duración de la fase de balanceo.	Duración en segundo del no contacto de la pata con el piso de cristal.	La disminución del balanceo puede verse involucrada en desequilibrio y problemas para soportar el peso corporal.
Longitud de zancada	Distancia entre ubicaciones sucesivas de la misma pata.	La disminución de la zancada puede indicar una marcha alterada.
Velocidad de la marcha	Recorrido de la distancia en segundos de la marcha.	La disminución de la velocidad puede relacionarse con trastornos en la coordinación entre las extremidades, alteraciones motoras o del SNC.
Índice de regularidad (RI)(%)	El porcentaje del número de patrones de secuencia de pasos normales, multiplicado por el número de ubicaciones de patas y dividido por el número total de ubicaciones de patas dentro de una ejecución. Se utiliza como medida para la coordinación entre patas.	Una disminución en el IR indicó un patrón de caminata irregular.
Cadencia	Se refiere al número de pasos en un minuto.	La disminución de la cadencia puede mostrar alteraciones de la marcha y está relacionado con la longitud de zancada.

Definiciones de los parámetros de la marcha en la pasarela tomados del manual de usuario del equipo para cómputo CatWalk 9.1 (Noldus information technology, 2013).

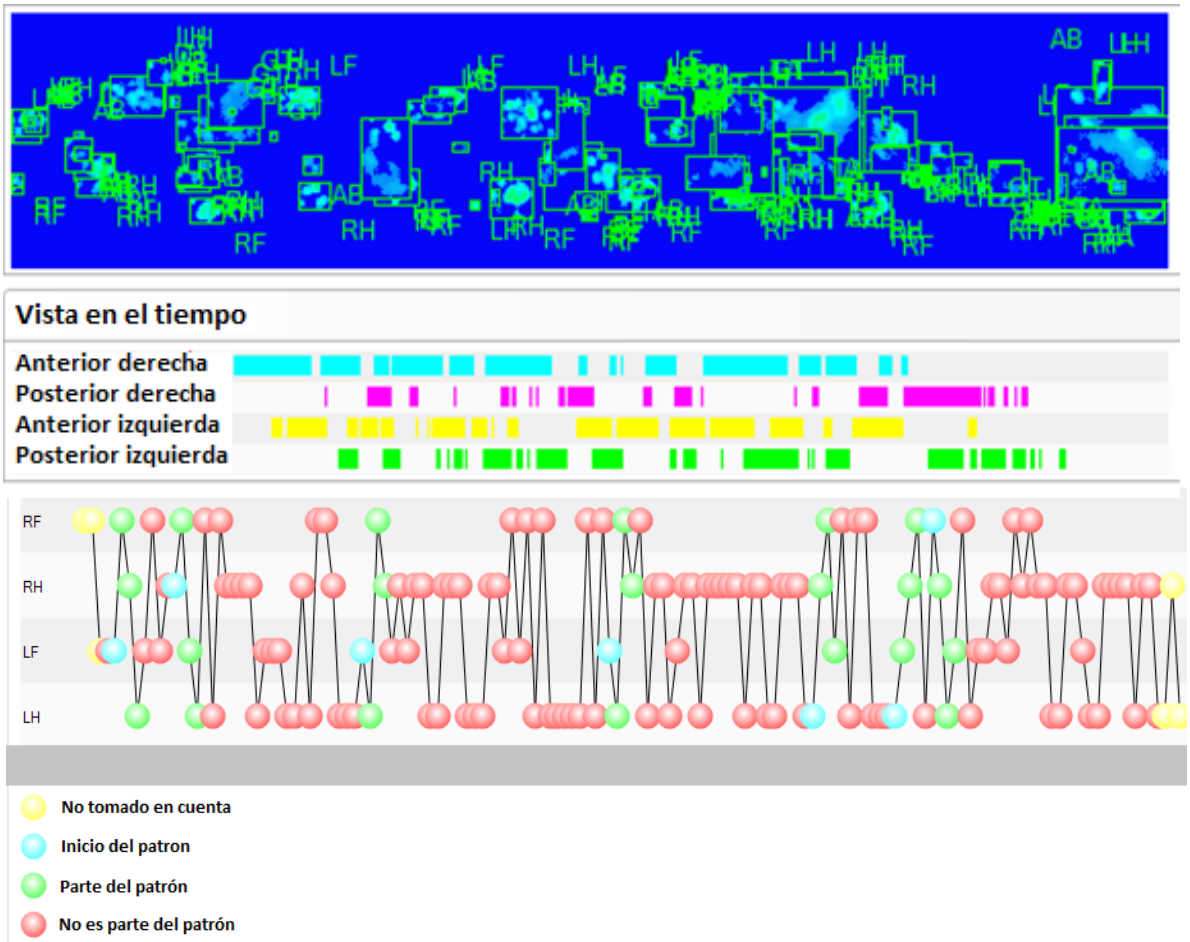

Figura 18. Registro del patrón de la marcha en la rata *taiep* macho de tres meses de edad. Las imágenes corresponden a la impresión de las huellas en el piso de cristal de la pasarela, el color azul corresponde a la extremidad anterior derecha, en color rosa a la extremidad posterior derecha, el color amarillo a la extremidad anterior izquierda y el color verde a la extremidad posterior izquierda. El programa de cómputo reconstruye el patrón de la marcha conforme la rata pasa a través de la pasarela, los círculos en rojo indican cada pata que se sale del ciclo de la marcha normal (Ahumada, 2018).

Estadística

Para el análisis de datos de todos los grupos se utilizó el programa de computo Sigma-Plot versión 11, y se comparó usando un análisis de varianza (ANOVA) de un factor con medidas repetidas seguido de la prueba de Dunn. Se considerará una significancia con $P < 0.05$.

Resultados

Todos los resultados experimentales obtenidos muestran a la media ± el error estándar de la media para 6 ratas *taiep* de tres meses de edad para el grupo control y para cada una de las dosis ocupadas.

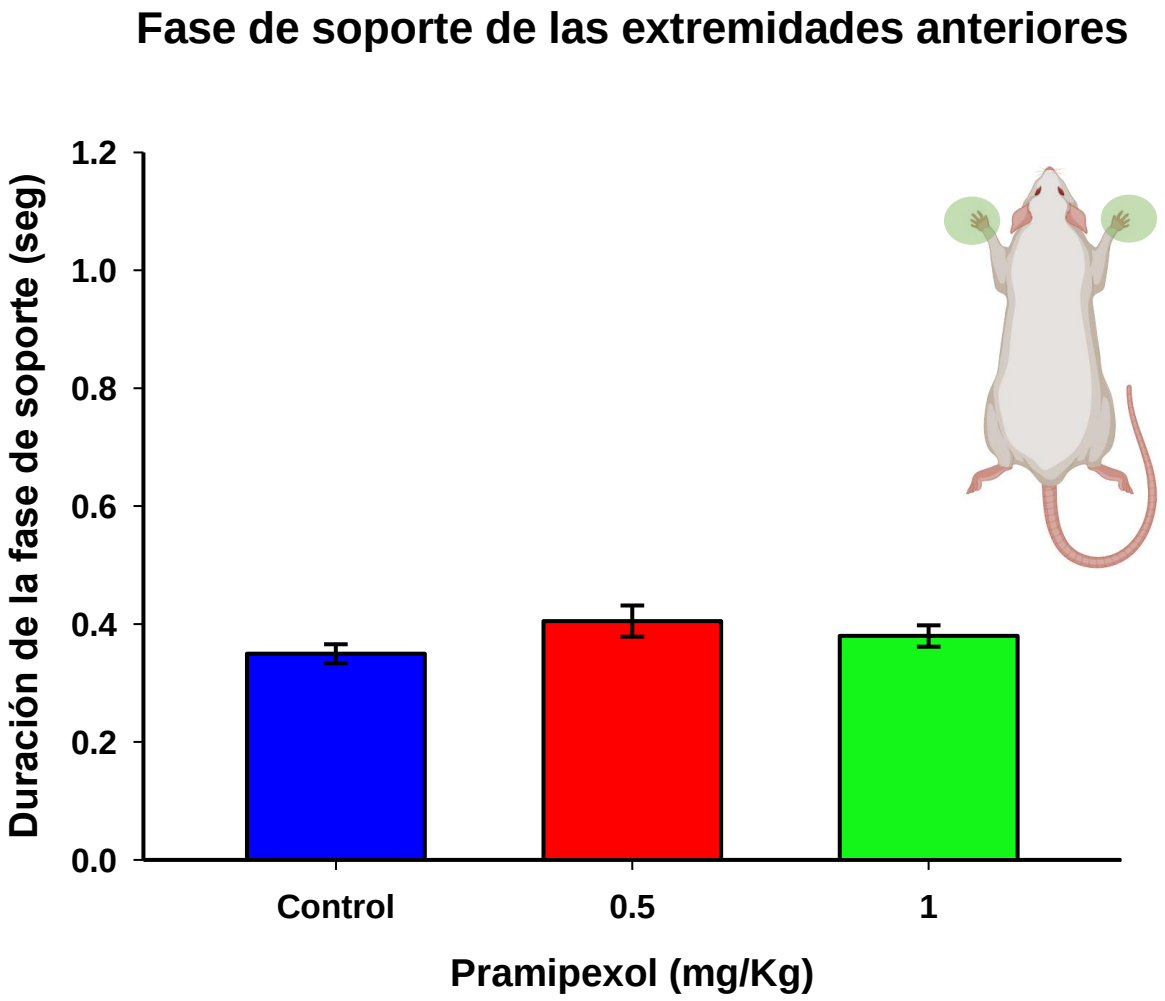

Figura 19. Fase de soporte de las extremidades anteriores. La administración de pramipexol no produce diferencias significativas respecto al grupo control el cual recibió solución salina isotónica.

Como se observa en la Figura 19, la administración de pramipexol a las dosis de 0.5 y 1 mg/Kg no produjo cambios significativos respecto al grupo control en la duración de la fase de soporte en las extremidades anteriores de la rata *taiep.*

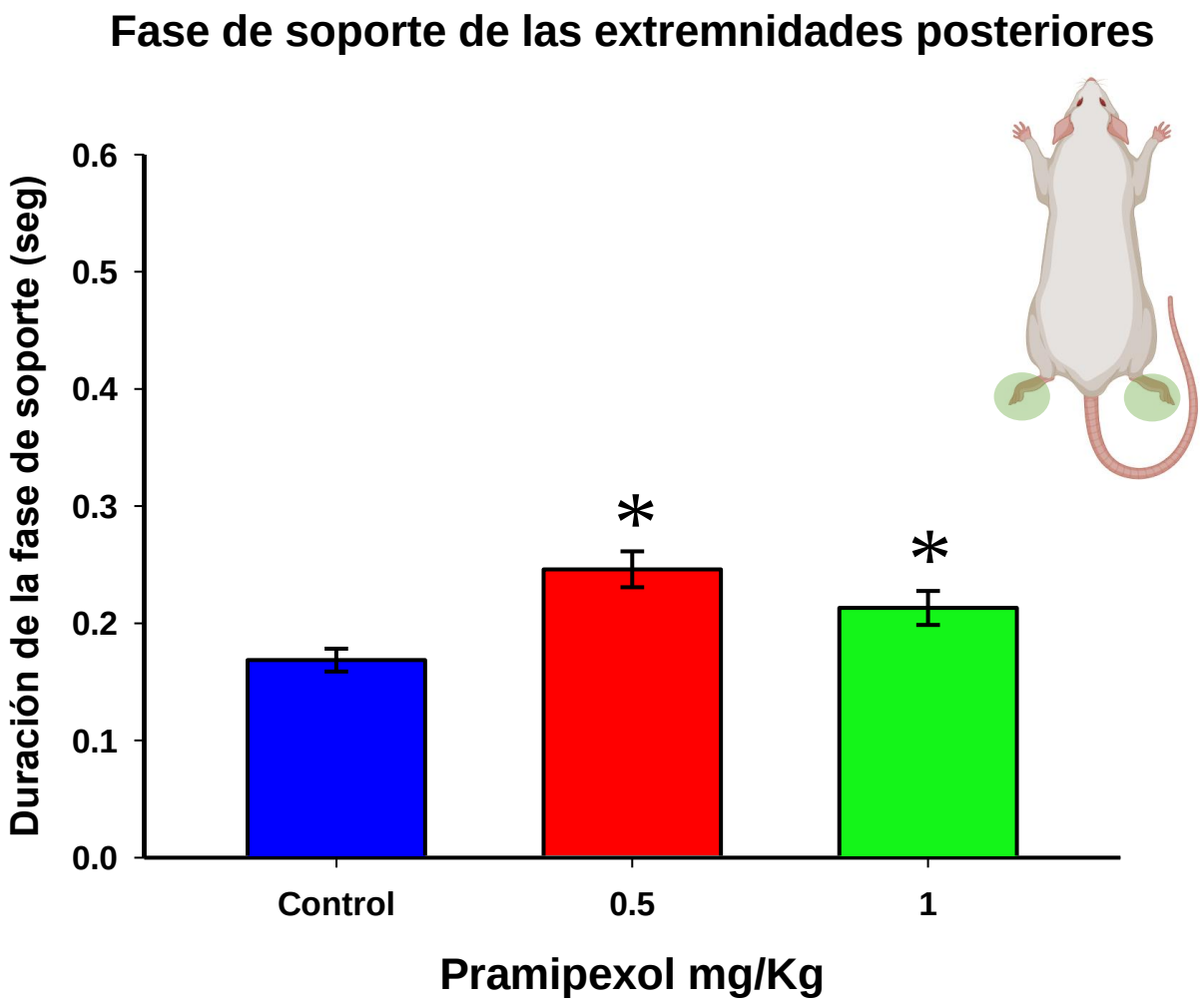

Figura 20. Fase de soporte de las extremidades posteriores. La administración de pramipexol a las dosis de 0.5 y 1 mg/Kg en las ratas *taiep* de 3 meses aumento significativamente la duración de la fase de soporte de las extremidades posteriores (ANOVA, H=15.73; gl=2, P<0.001, seguido de una prueba de Dunn, *P<0.05).

En la Figura 20, se muestran los resultados obtenidos tras la administración de pramipexol (0.05 y 1 mg/Kg) las cuales aumentaron significativamente la duración de la fase de soporte de las extremidades posteriores en relación a lo obtenido en el grupo control (ANOVA, H=15.73; gl=2, P<0.001, seguido de la prueba de Dunn, *P<0.05). A diferencia de las extremidades posteriores, las patas traseras tienden a permanecer más en la fase de soporte previo a cada zancada, con la dosis de 0.5 mg/Kg, y alcanza hasta un 24% más con la dosis de 1mg/Kg.

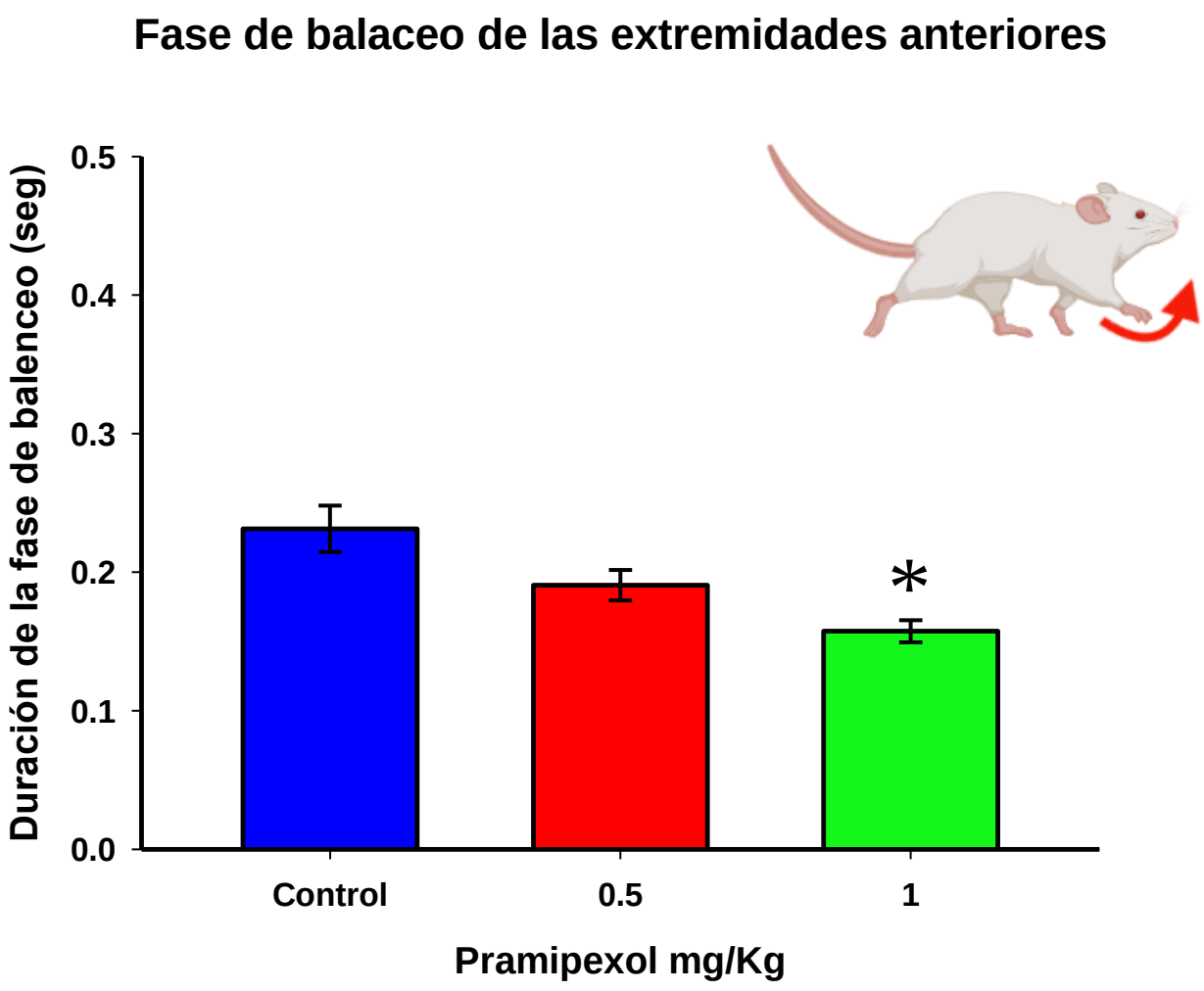

Figura 21. Fase de balanceo de las extremidades anteriores. La administración de pramipexol a la dosis de 1 mg/Kg disminuye la duración de la fase de balanceo de las extremidades anteriores en las ratas *taiep* de tres meses de edad (ANOVA, H=11.12, gl=2, $P<0.05$, seguido de una prueba de Dunn, *$P<0.05$).

En la Figura 21 se muestran los resultados obtenidos tras la administración del pramipexol, el cual redujo significativamente la duración de la fase de balanceo en las extremidades anteriores (ANOVA, H=11.12, gl=2, $P<0.05$, seguido de una prueba de Dunn, *$P<0.05$). Sin embargo, con la dosis de 0.5 mg/Kg no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

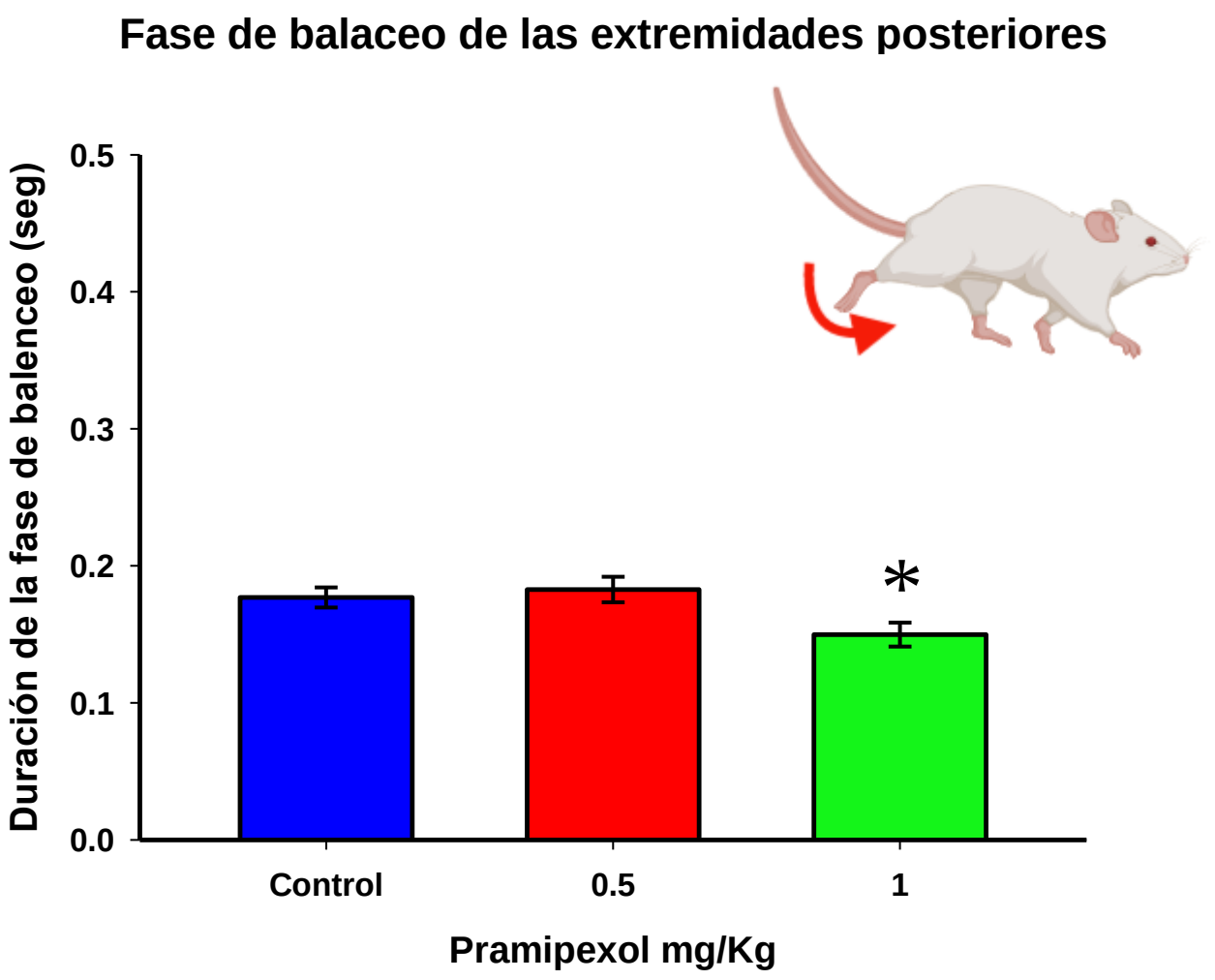

Figura 22. Fase de balanceo de las extremidades posteriores. La administración de pramipexol de 1 mg/Kg disminuye significativamente la duración de la fase de balanceo de las extremidades posteriores de las ratas *taiep* adultas ((ANOVA, H=13.48, gl=2, *P*<0.05, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05).

En la Figura 22 se muestra que el pramipexol a la dosis de 1 mg/Kg, disminuyó significativamente la duración de la fase de balanceo en las extremidades posteriores (ANOVA, H=13.48, gl=2, *P*<0.05, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05), lo que concuerda con los resultados mostrados en la Figura 19, de tal forma que con la administración de pramipexol se disminuyó la fase de balanceo tanto en las patas anteriores, como en las patas posteriores.

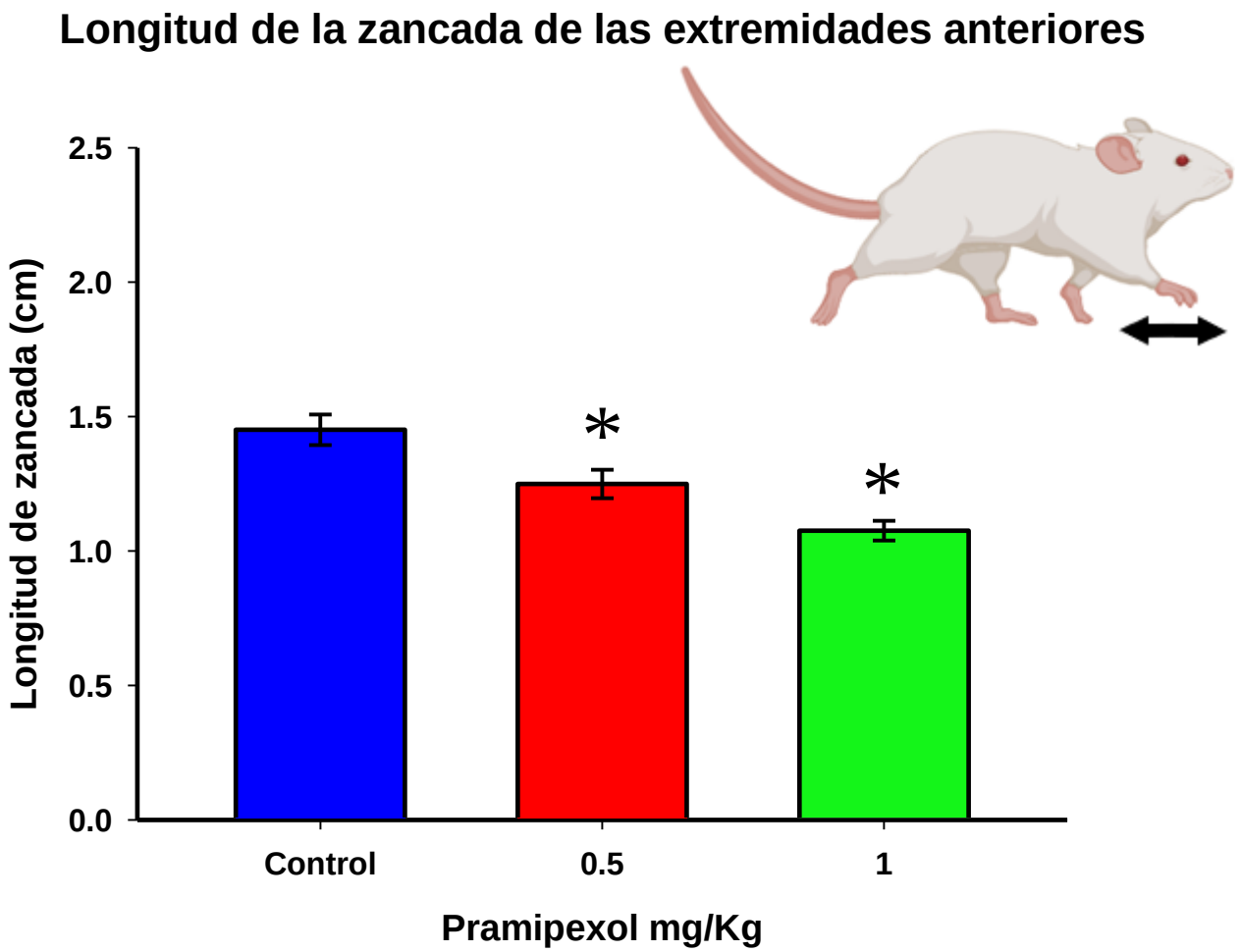

Figura 23. La longitud de zancada de las extremidades anteriores. Se observa una disminución en la longitud de la zancada en centímetros de las extremidades anteriores en ratas *taiep* macho adultas después de la administración del pramipexol con una dosis de 0.5 y 1 mg/Kg (ANOVA, H=26, gl=2, $P<0.05$, seguido de una prueba de Dunn, *$P<0.05$).

En la Figura 23 se muestra que la distancia recorrida por las extremidades anteriores disminuye después de administrar pramipexol a la dosis de 1 mg/Kg (ANOVA, H=26, gl=2, $P<0.05$, seguido de una prueba de Dunn *$P<0.05$). Con ambas dosis se observa una disminución en la fase de flexión de las patas delanteras con cada zancada.

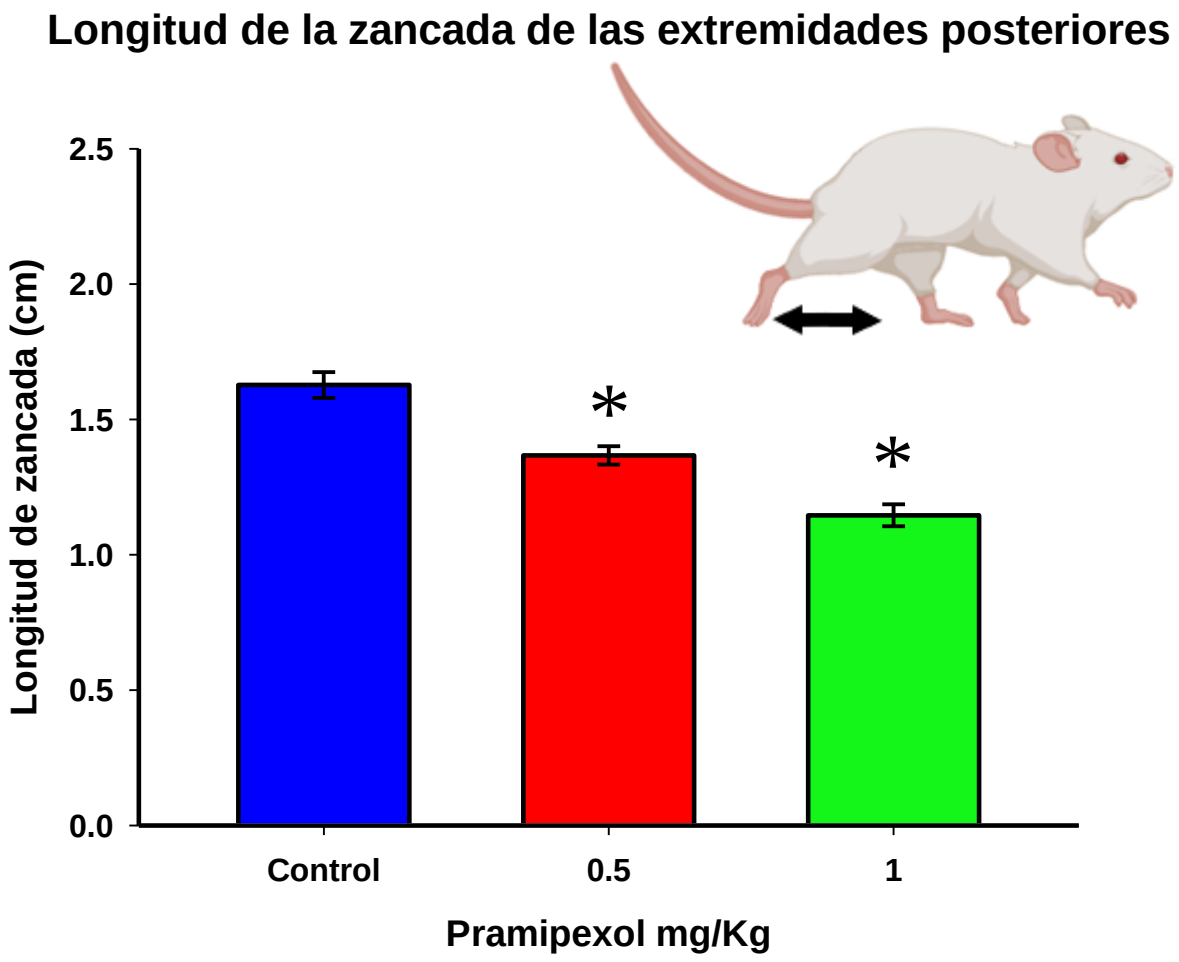

Figura 24. Longitud de la zancada en las extremidades posteriores. La administración de pramipexol a las dosis de 0.5 y de 1 mg/Kg, disminuye la longitud de la zancada en las extremidades posteriores en ratas *taiep* macho de tres meses de edad (ANOVA, H=53.4, gl=2, *P*<0.001, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05).

En la Figura 24 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la zancada en las extremidades posteriores. Note que existe desplazamiento anterior de las patas posteriores de cada zancada, ya que disminuyó tras la administración de pramipexol a las dosis 0.5 y 1 mg/Kg (ANOVA, H=53.4, gl=2, *P*<0.001, seguido de una prueba de Dunn **P*<0.05).

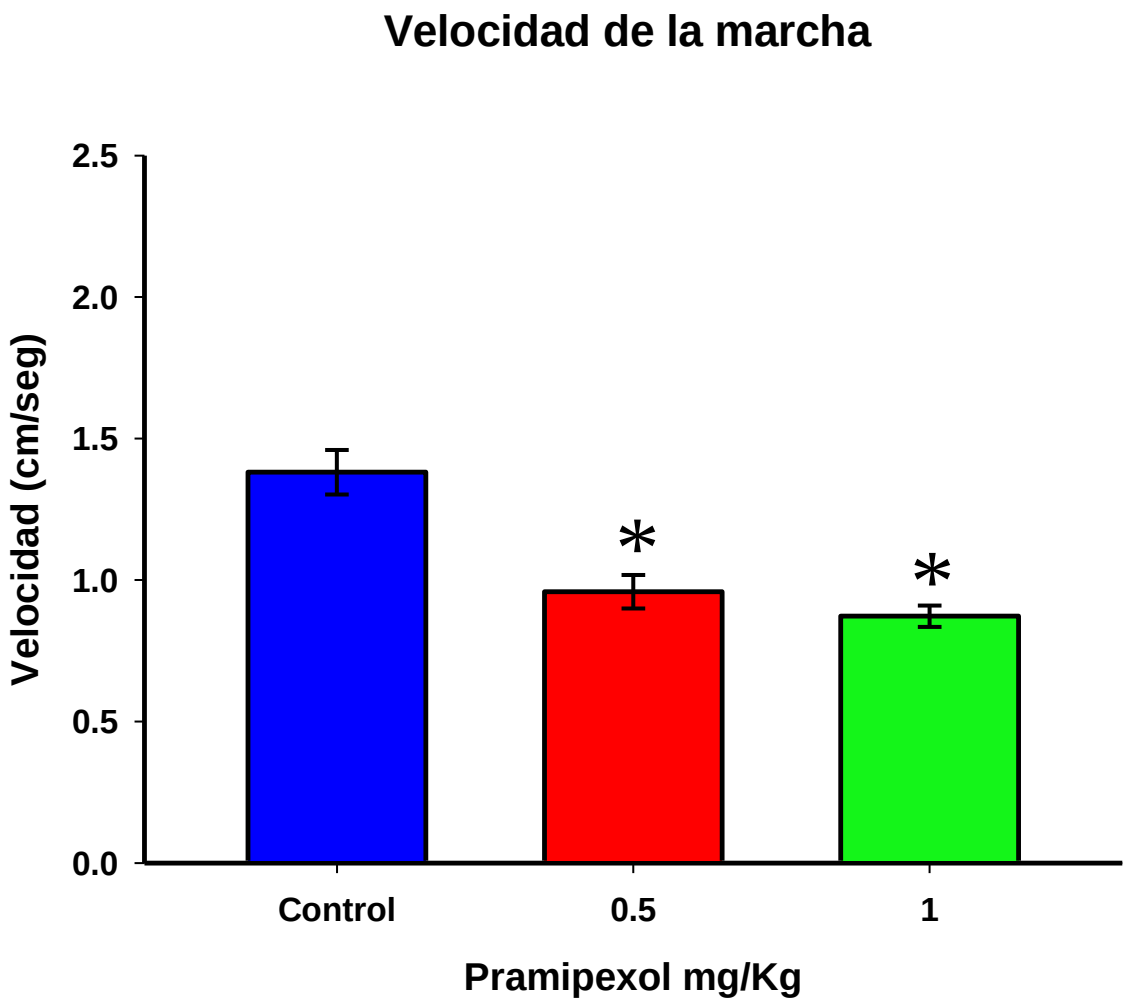

Figura 25. La velocidad de la marcha disminuye después de la administración de pramipexol. El agonista dopaminérgico pramipexol a las dosis 0.5 y 1 mg/Kg disminuye la velocidad de la marcha en las ratas *taiep* macho adultas (ANOVA, H=23.2, gl=2, $P < 0.001$, seguido de una prueba de Dunn, *$P<0.05$).

La velocidad promedio de la marcha de los sujetos control y después de la administración de pramipexol se muestra en la Figura 25. Note que existe un decremento significativo de la velocidad a la que se desplazan las ratas tratadas con respecto al grupo control (ANOVA, H=23.2, gl=2, $P < 0.001$, seguido de una prueba de Dunn, *$P=0.05$).

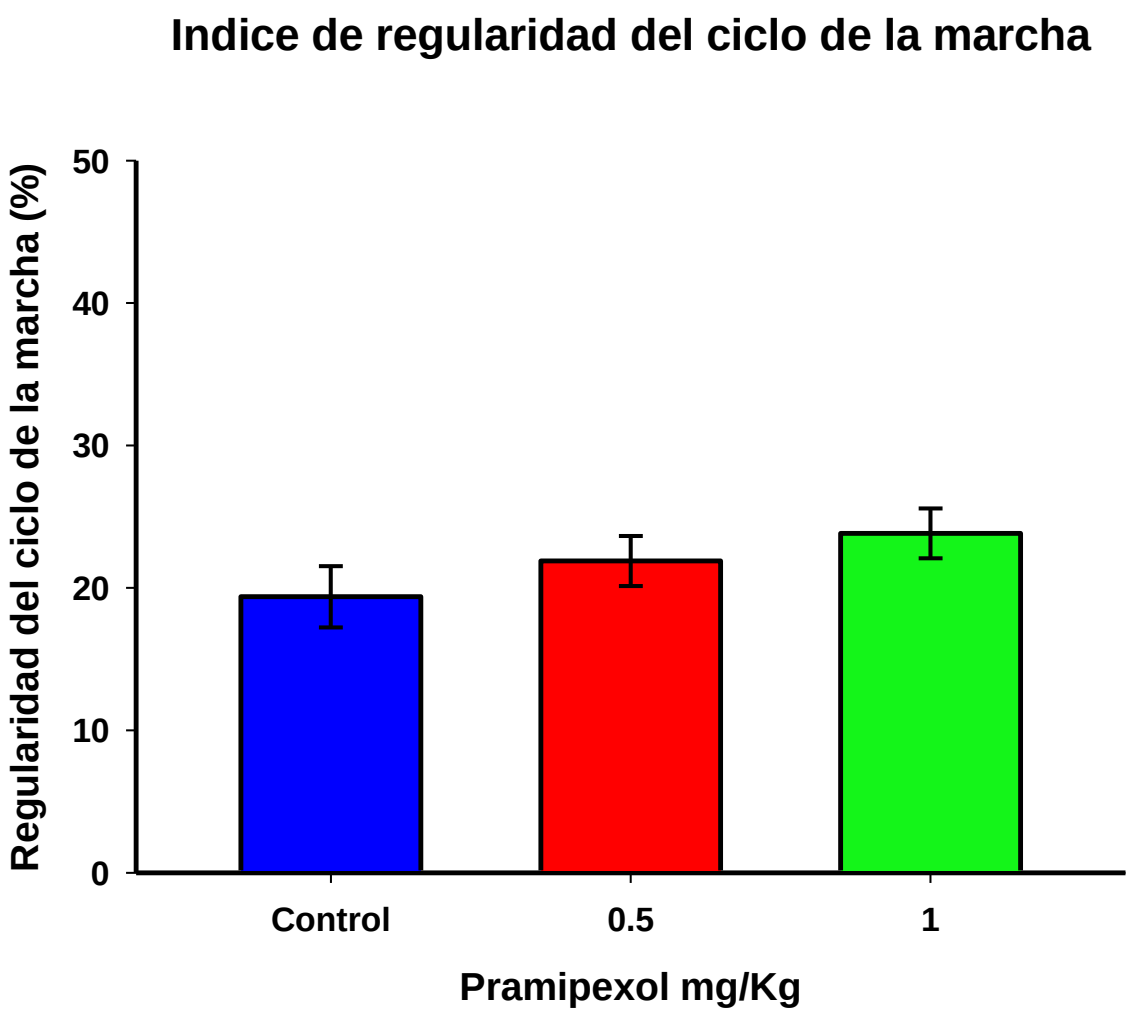

Figura 26. El índice de regularidad del ciclo de la marcha. El porcentaje de regularidad de la marcha en las ratas *taiep* macho adultas no se modifica con la administración de pramipexol (ANOVA, H=4.33, gl=2, *P*=0.11).

En la Figura 26 se muestra un que no se incrementó la regularidad del patrón de la marcha después de la administración con ambas dosis de pramipexol. Sin embargo, la coordinación entre las extremidades mejora un 15% tras la administración del agonista dopaminérgico D_2 a la dosis de 1mg/Kg, aunque no resulte ser significativo (ANOVA, H=4.33, gl=2, *P*=0.11).

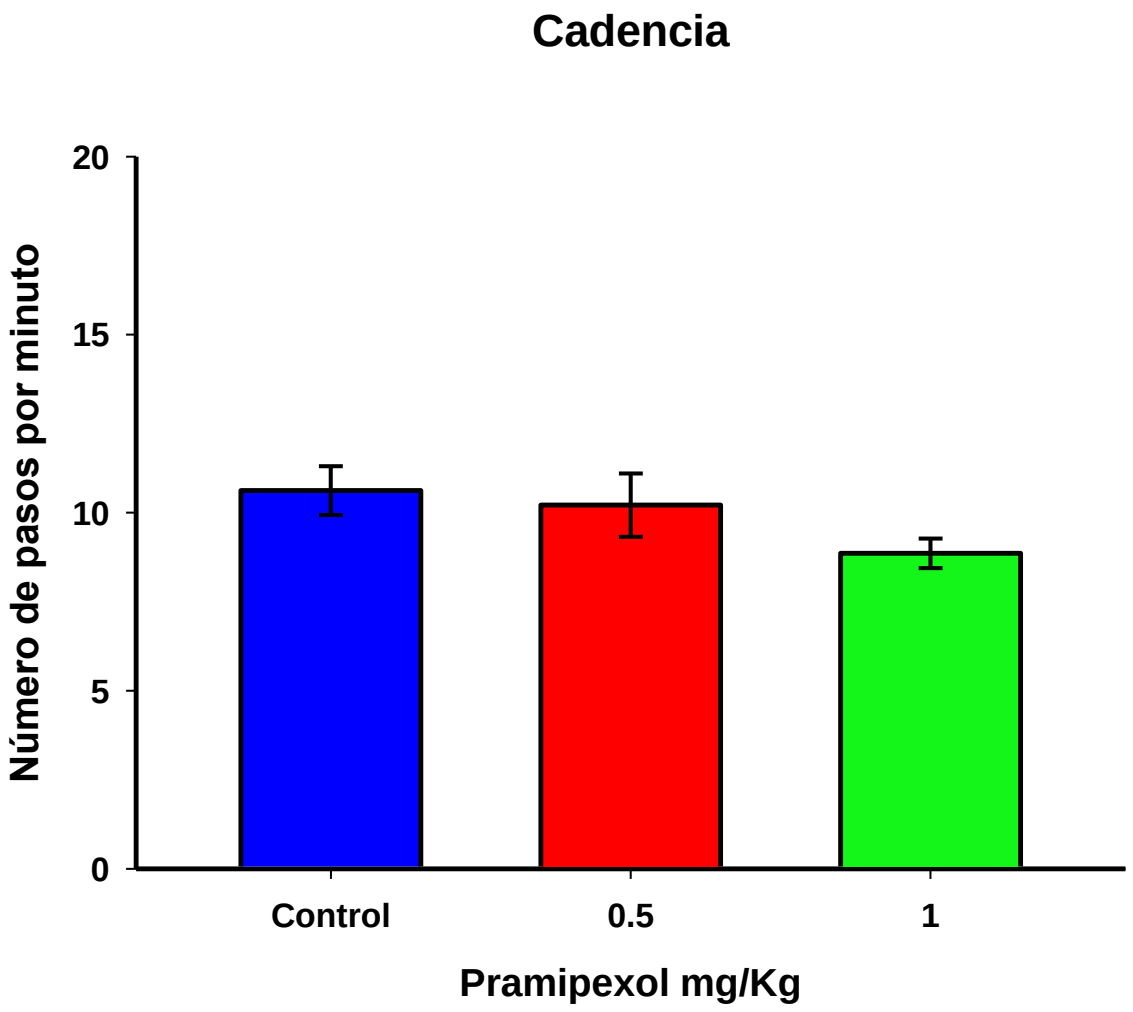

Figura 27. El número de pasos por minuto del patrón de la marcha después de la administración de pramipexol. La administración de pramipexol en ratas *taiep* machos de 3 meses de edad no se obtuvieron cambios significativos.

En la Figura 27 se muestra que la administración de pramipexol no produjo un cambio en el número de pasos por minuto en la marcha de la rata *taiep*. Cabe la pena destacar que a la dosis de 1 mg/Kg se obtuvo una disminución, que no es estadísticamente significativa, pero que concuerda con la disminución en la velocidad a la cual se desplaza el mutante en la pasarela (véase Figura 23).

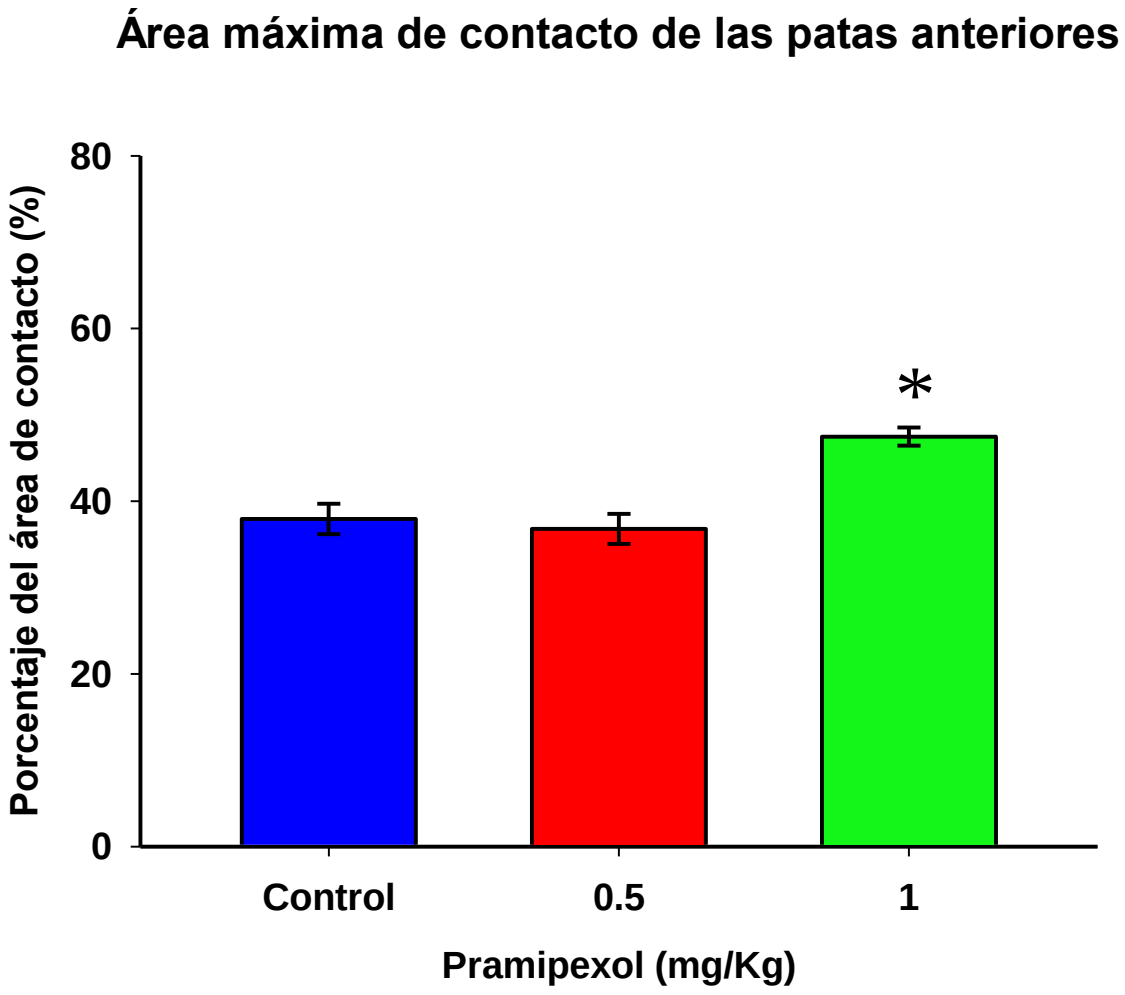

Figura 28. El área máxima de contacto de las patas anteriores tras la administración de pramipexol en la rata *taiep* macho. La administración de pramipexol a la dosis de 0.5 mg/Kg no aumenta el área de contacto con el piso, de las patas anteriores en relación con el grupo control, pero si incrementa a la dosis de 1 mg/Kg. Esto implica una mejora en la fase de soporte (ANOVA, H=23.29, gl=2, $P<0.001$, seguido de una prueba de Dunn, $*P<0.05$).

En la Figura 28 se muestra que el agonista dopaminérgico de la familia D2 el pramipexol, es capaz de aumentar el área máxima de contacto de las patas delanteras en la rata *taiep* macho de tres meses de edad, solo tras la administración a la dosis de 1 mg/Kg, con respecto al grupo tratado con solución salina (ANOVA, H=23.29, gl=2, $P<0.001$, seguido de una prueba de Dunn, $*P<0.05$).

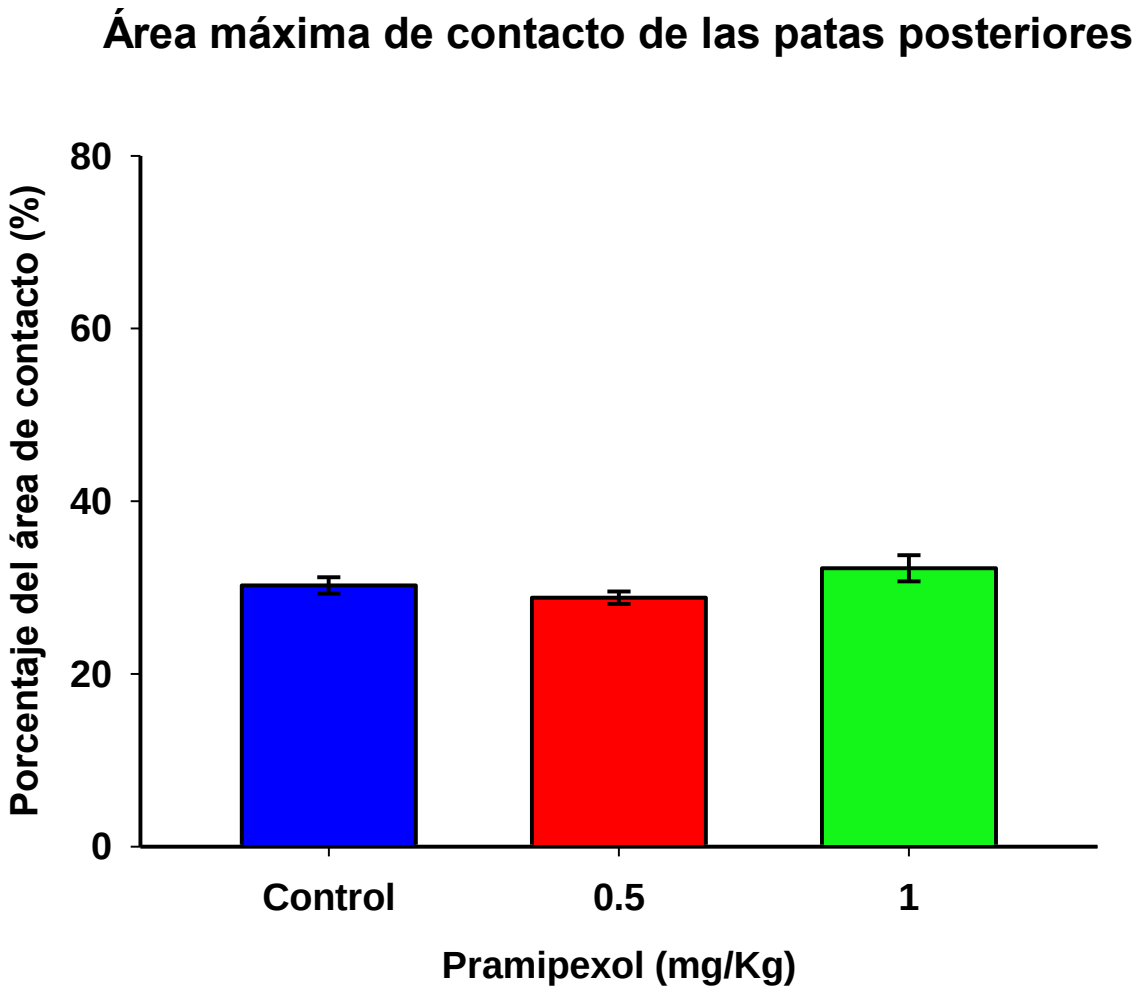

Figura 29. Área máxima de contacto medida en porcentaje que las patas posteriores del mutante de mielina *taiep* tras la administración de pramipexol. El pramipexol no modifica el área de contacto de las patas traseras de la rata *taiep* macho adulta en ninguna de las dosis empleadas (ANOVA, H= 3.43, gl=2, *P*=0.18).

En la Figura 29 se ilustran los resultados obtenidos tras la administración de pramipexol en el mutante de mielina *taiep* macho a los tres meses de edad. Note que ninguna de las dosis empleadas del agonista dopaminérgico D2 administrado por vía i.p., fue capaz de modificar el área de contacto de las patas (ANOVA, H= 3.43, gl=2, *P*=0.18).

Resultados. Efectos del agonista 5HT1$_A$ el 8-OH-DPAT sobre los parámetros locomotores en la rata *taiep* adulta

Todos los resultados son la media más menos el error estándar de la media de 7 ratas *taiep* de tres meses de edad. Las dosis de 8-OH-DPAT administradas fueron 0.0825, 0.125 y 0.25 mg/Kg el cual se administró por vía s.c.. Se empleó solución salina como tratamiento control.

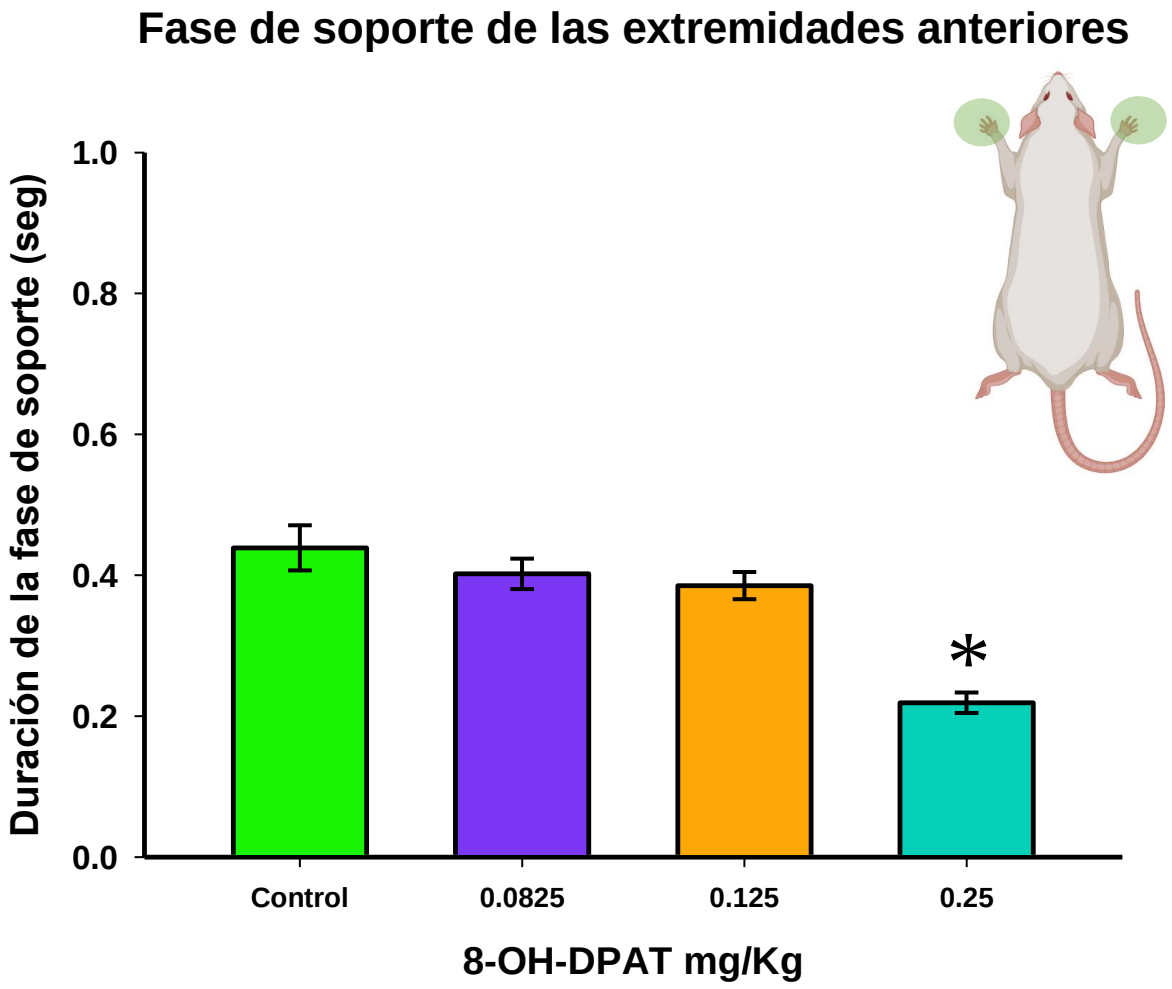

Figura 30. La fase de soporte de las extremidades anteriores. La administración de 8-OH-DPAT disminuye la duración de la fase de soporte a la dosis de 0.25 mg/Kg en ratas *taiep* macho adultas (ANOVA, H=39.25, gl=3, P< 0.001, seguido de una prueba de Dunn, *P<0.05).

En la Figura 30 se muestra que la duración en la fase de soporte de las extremidades anteriores disminuyó después de la administración de 8-OH-DPAT a la dosis de 0.25 mg/Kg (ANOVA, H=39.25, gl=3, *P*< 0.001, seguido de la prueba de Dunn, **P*<0.05). A las dosis de 0.0825 y 0.125 no se obtuvieron diferencias significativas respecto al grupo control tratado con solución salina.

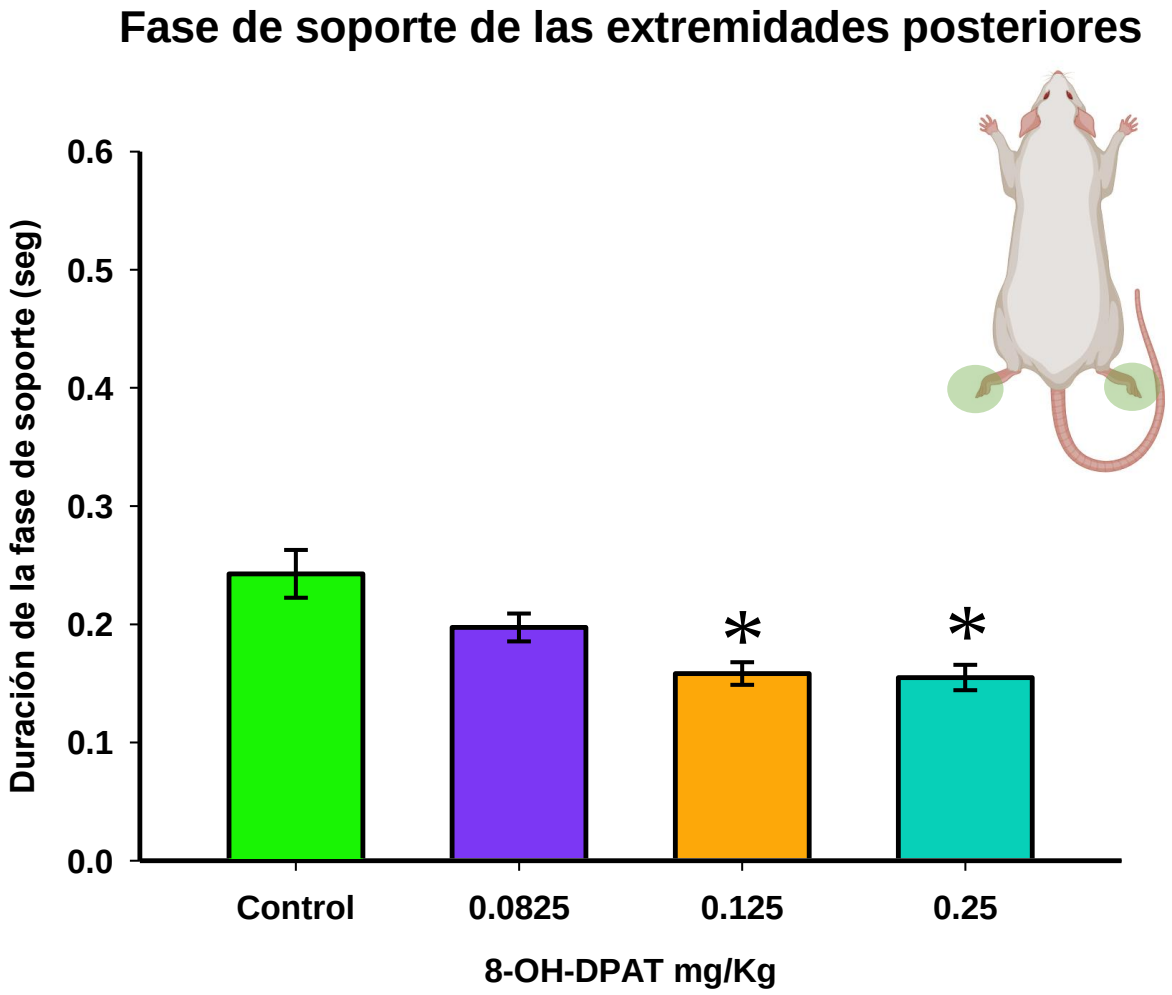

Figura 31. Fase de soporte de las extremidades posteriores. El 8-OH-DPAT a las dosis 0.125 y 0.25 mg/disminuye la duración de la fase de soporte en las extremidades posteriores en ratas *taiep* macho adultas (ANOVA, H=16.38, gl=3, *P*< 0.001, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05).

En la Figura 31 se muestran los resultados obtenidos tras la administración de 8-OH-DPAT a las dosis de 0.0825, 0.125 y 0.25 mg/Kg. Note que la duración de la fase de soporte de las extremidades posteriores disminuyó significativamente tras la administración de 8-OH-DPAT a las dosis de 0.125 y 0.25 mg/Kg, (ANOVA, H=16.38, gl=3, *P*< 0.001, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05) de tal modo que, las ratas *taiep*

tratadas con la droga mantienen las patas traseras un menor tiempo en el piso que las tratadas con solución salina.

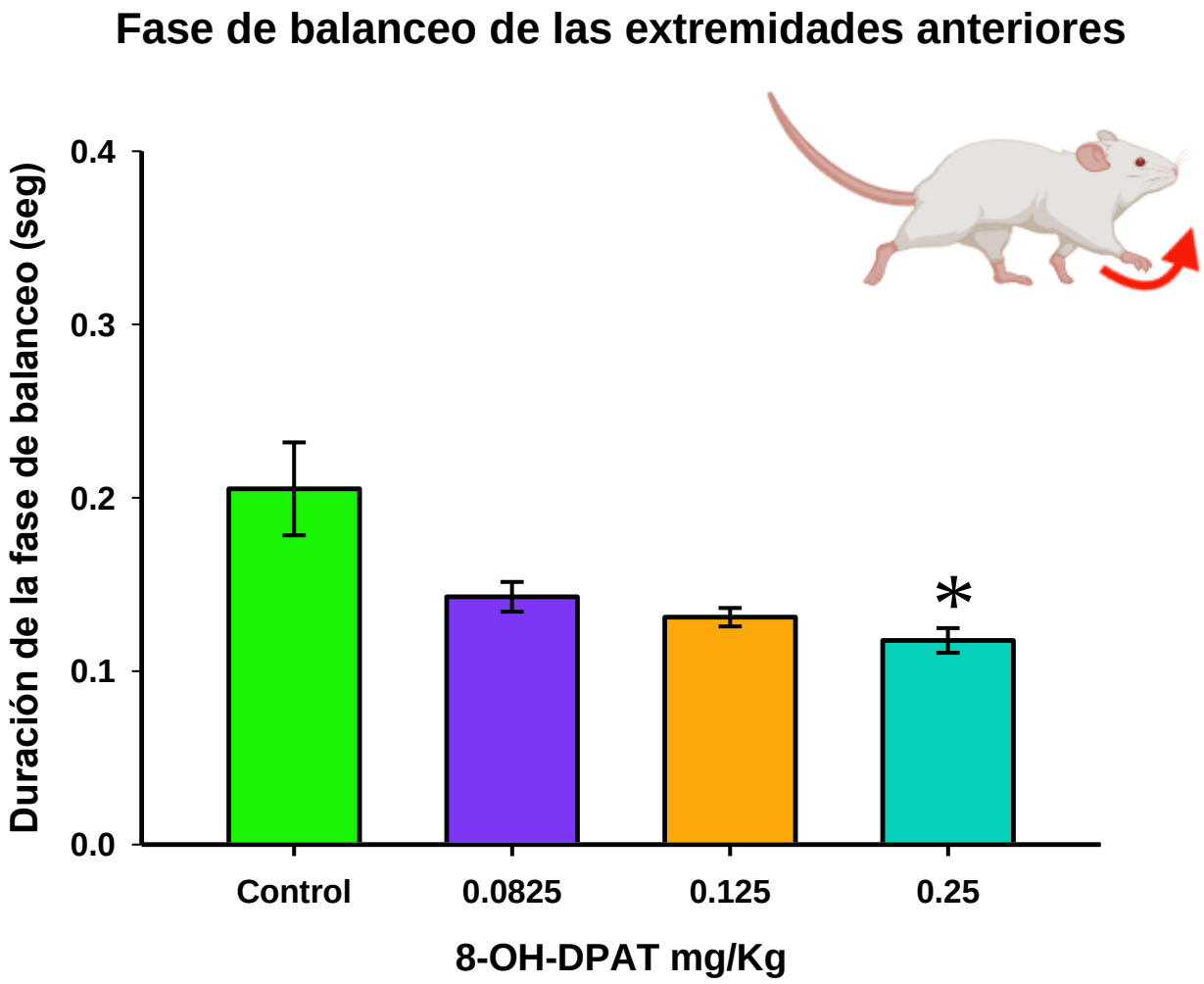

Figura 32. Fase de balanceo de las extremidades anteriores en la rata *taiep* macho. El 8-OH-DPAT a la dosis de 0.25 mg/Kg disminuye el tiempo de la fase de balanceo en extremidades anteriores de ratas *taiep* adultas (ANOVA, H=15.03, gl=3, P< 0.002, seguido de una prueba de Dunn, *P<0.05).

En la Figura 32 se muestra una disminución significativa en la duración de la fase de balanceo de las extremidades anteriores tras la administración de 8-OH-DPAT a la dosis de 0.25 mg/Kg respecto al grupo control tratado con solución salina (ANOVA, H=15.03, gl=3, P< 0.002, seguido de una prueba de Dunn, *P<0.05).

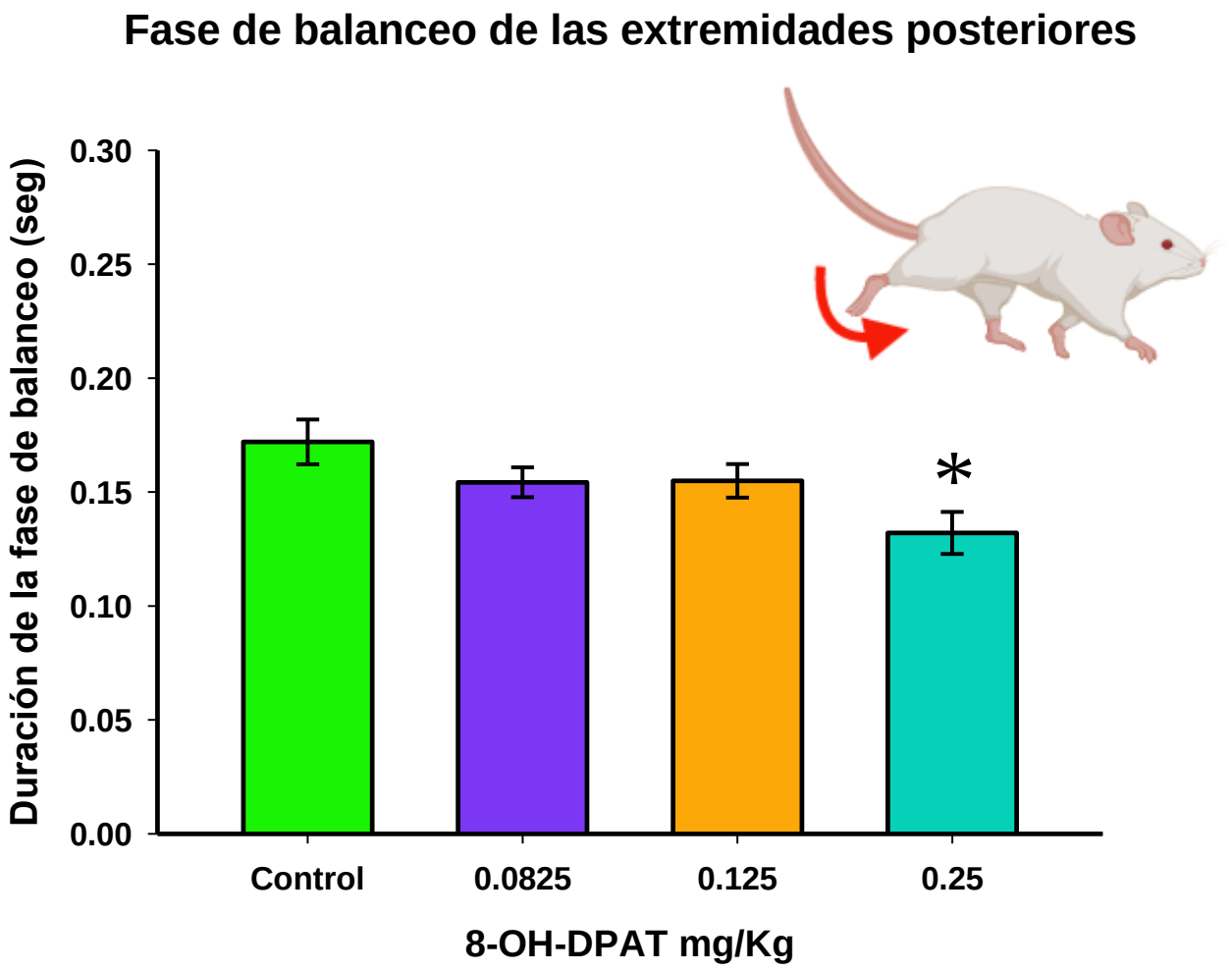

Figura 33. Fase de balanceo de las extremidades posteriores en rata *taiep* macho tratadas con 8-OH-DPAT. El 8-OH-DPAT a la dosis de 0.25 mg/Kg disminuye el tiempo de la fase de balanceo de las extremidades anteriores de ratas *taiep* adultas (ANOVA, H=12.71, gl=3, $P< 0.005$, seguido de una prueba de Dunn, *$P<0.05$).

En la Figura 33 se muestra que la duración de la fase de balanceo de las extremidades posteriores en las ratas *taiep* disminuyó significativamente después de administrar 8-OH-DPAT a la dosis de 0.25 mg/Kg respecto del grupo control (ANOVA, H=12.71, gl=3, $P< 0.005$, seguido de una prueba de Dunn, *$P<0.05$). Este resultado muestra que el uso de 8-OH-DPAT disminuye el tiempo en el que las patas están en el aire durante el ciclo de la marcha en la rata *taiep* bajo la acción de este agonista serotonérgico 5-HT_{1A}.

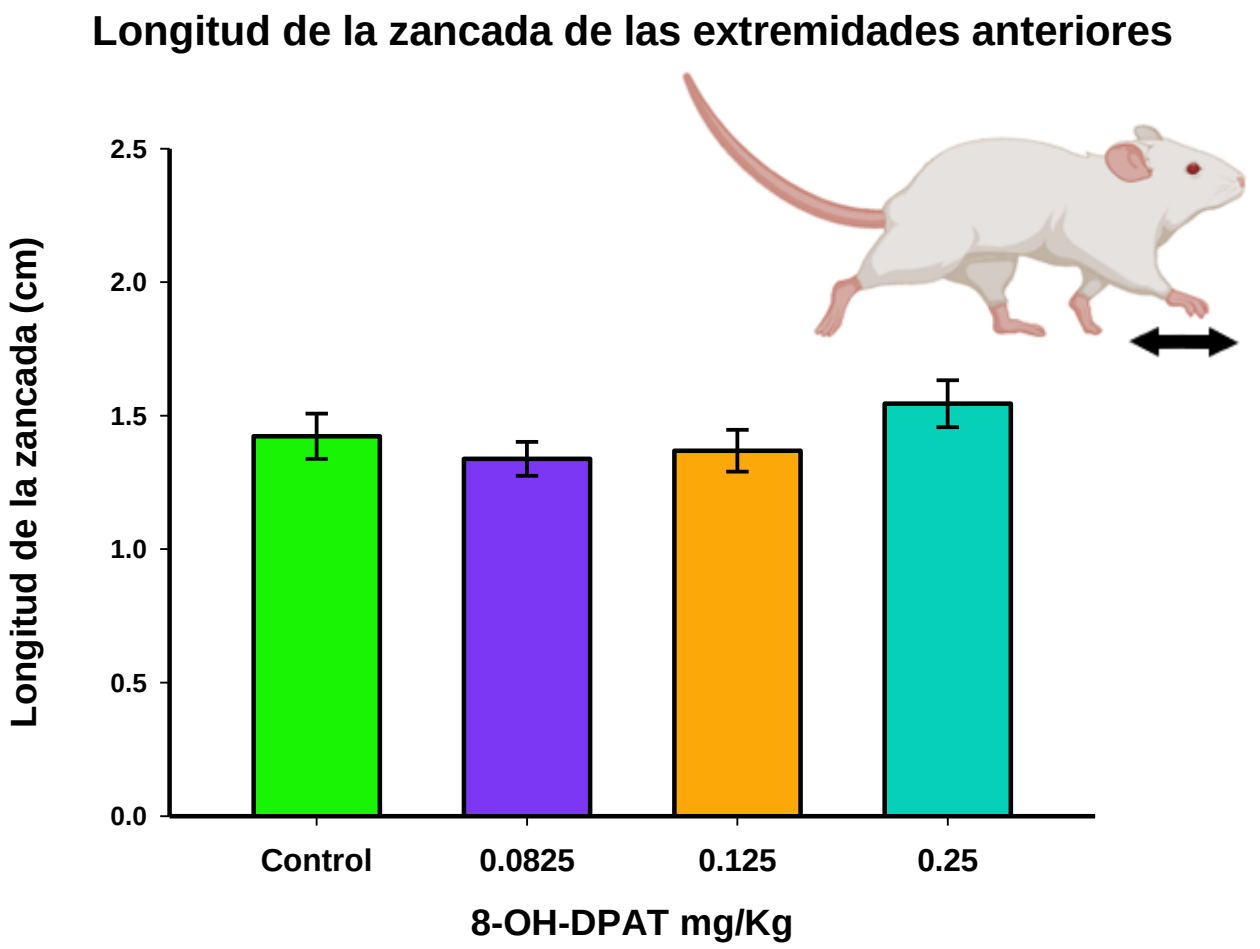

Figura 34. Longitud de zancada de las extremidades anteriores. El 8-OH-DPAT no produce cambios significativos en la longitud de la zancada de las patas anteriores en las ratas *taiep* macho a los tres meses de edad (ANOVA, H=3.33, gl=3, *P*=0.34).

En la Figura 34 se muestran los resultados obtenidos tras la administración del agonista serotonérgico de los receptores 5-HT_{1A}, el 8-OH-DPAT, el cual no fue capaz de modificar la longitud de la zancada con ninguna de las dosis empleadas (ANOVA, H=3.33, gl=3, *P*=0.34).

.

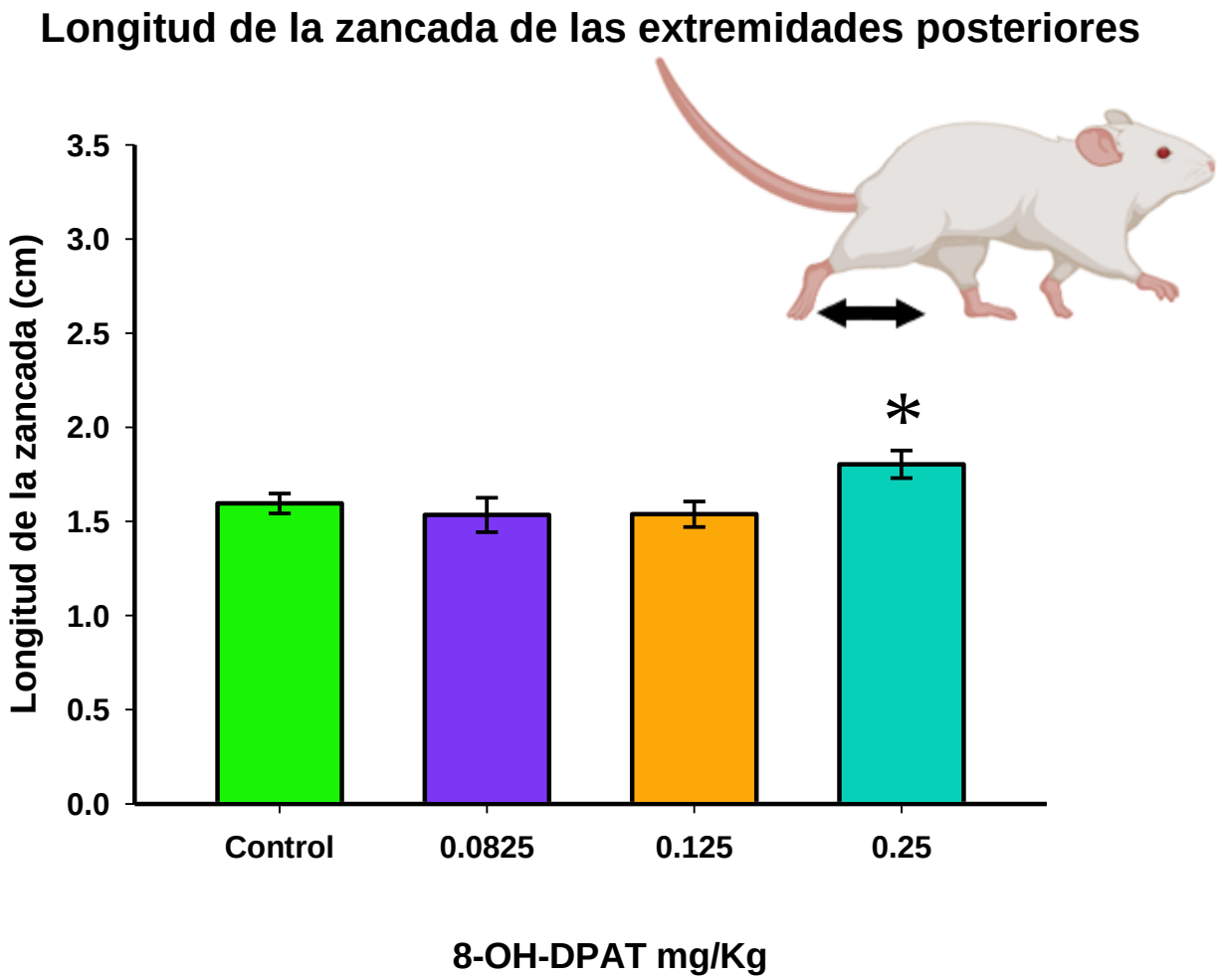

Figura 35. Determinación de la longitud de la zancada de las extremidades posteriores. El 8-OH-DPAT incrementa la longitud de la zancada de las patas posteriores en las ratas *taiep* macho de tres meses de edad (ANOVA, H=5.04, gl=3, *P*=0.025, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05)

La longitud de la zancada de las extremidades posteriores se incrementó tras la administración del agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT a la dosis de 0.25 mg/Kg con respecto al grupo control (véase Figura 35; ANOVA, H=5.04, gl=3, *P*=0.025, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05). Note que el uso de este serotonérgico permite que la rata *taiep* avance una mayor distancia con cada paso.

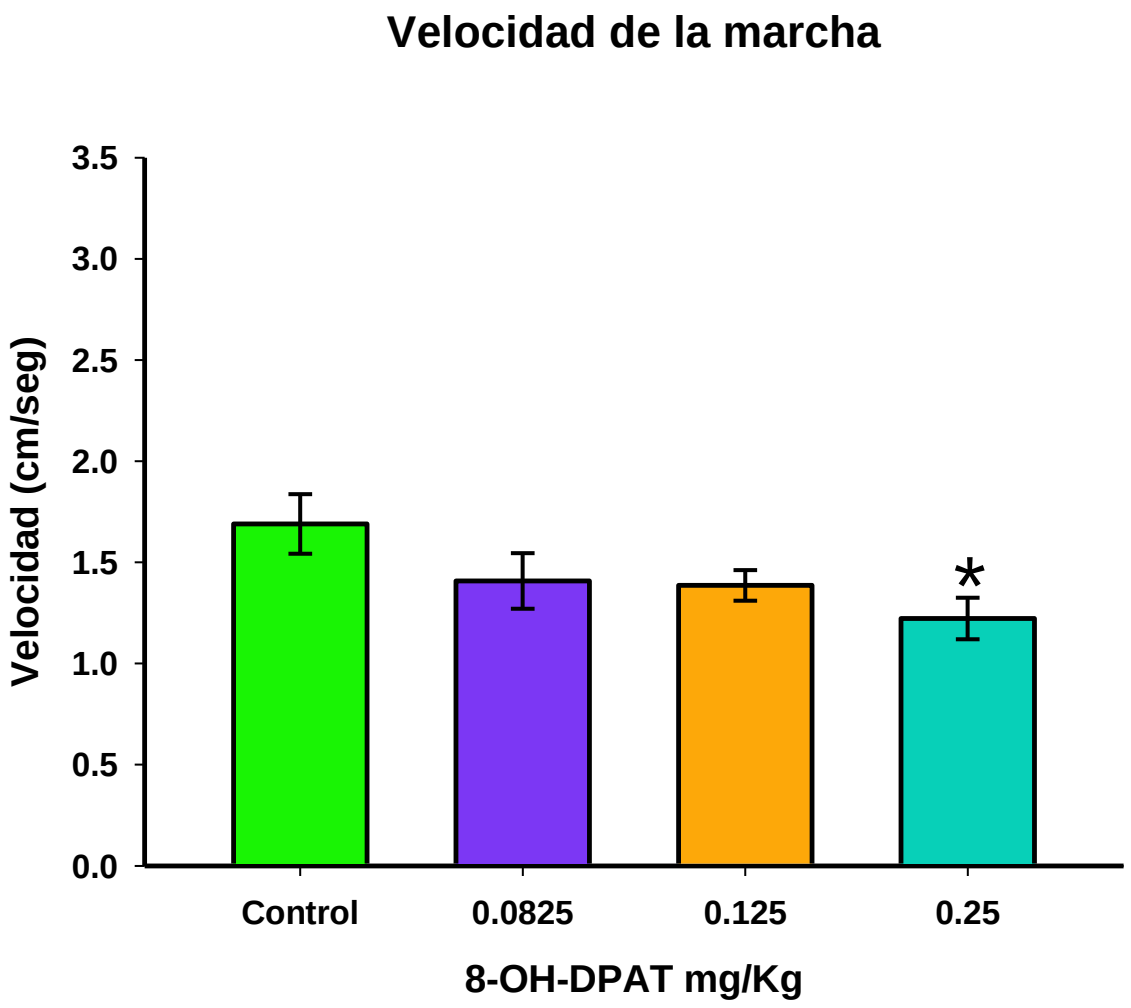

Figura 36. La velocidad de la marcha en la rata *taiep* macho adulta mejora con el 8-OH-DPAT. El 8-OH-DPAT a la dosis de 0.25 mg/Kg disminuye la velocidad de la marcha en las ratas *taiep* macho de tres meses de edad (ANOVA, H=8.97, gl= 3, *P*=0.03, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05).

En la Figura 36 se muestran los resultados obtenidos tras la administración de 8-OH-DPAT en la rata *taiep*. El serotonérgico 5-HT_{1A} disminuyó la velocidad de la marcha cuando se administró la dosis más alta 0.025 mg/Kg respecto al grupo control tratado con solución salina (ANOVA, H=8.97, gl= 3, *P*=0.03, seguido de una prueba de Dunn, **P<0.05*).

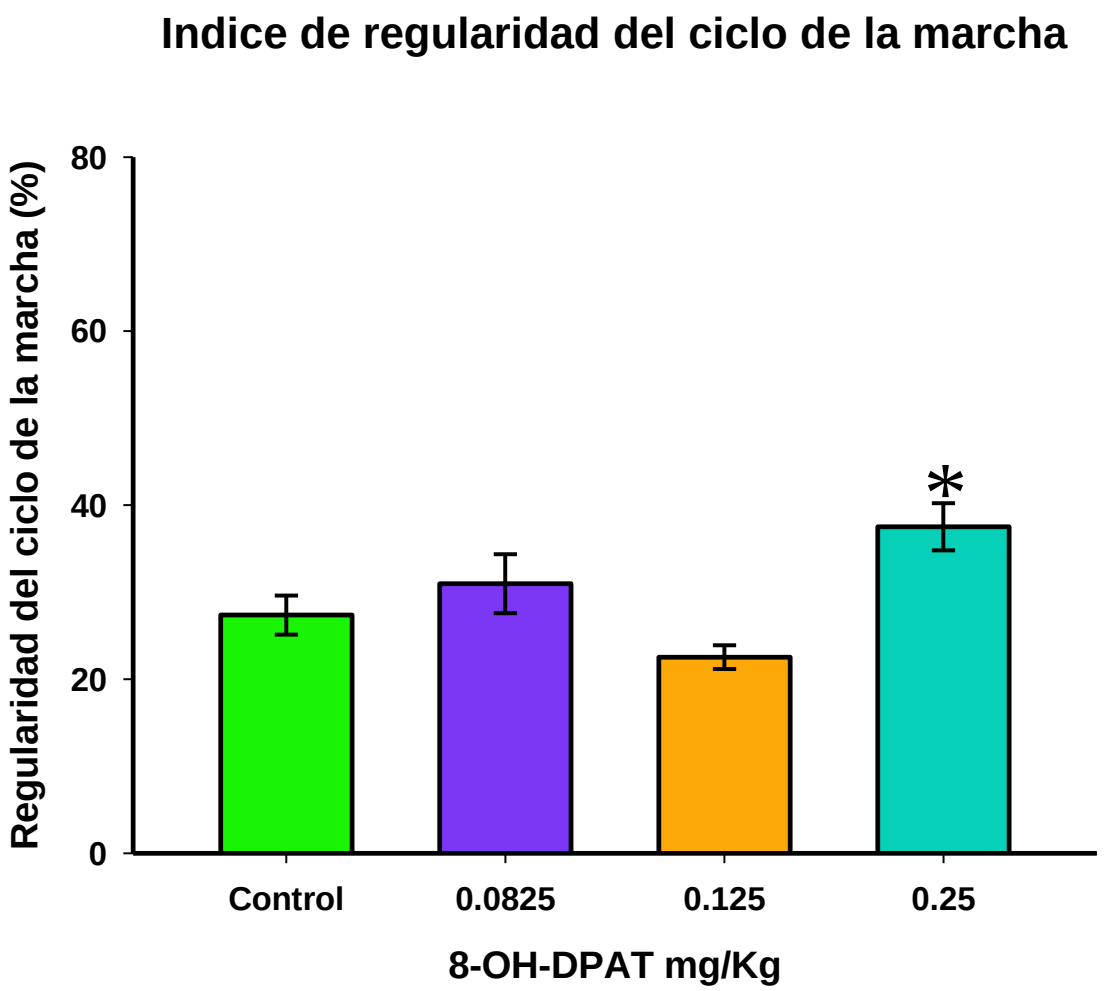

Figura 37. Índice de regularidad en el ciclo de la marcha. El 8-OH-DPAT a la dosis de 0.25 mg/Kg aumenta la regularidad del ciclo de la marcha en ratas *taiep* machos a los tres meses de edad (ANOVA, H=15.949, gl=3, *P*< 0.001, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05).

En la Figura 37 se muestran los resultados obtenidos tras la administración de 8-OH-DPAT. Note que la coordinación entre las extremidades aumentó tras la administración de 8-OH-DPAT a la dosis de 0.25 mg/Kg respecto a los sujetos tratados con solución salina (ANOVA, H=15.949, gl=3, *P< 0.001, seguido de la prueba de Dunn, **P*<0.05).

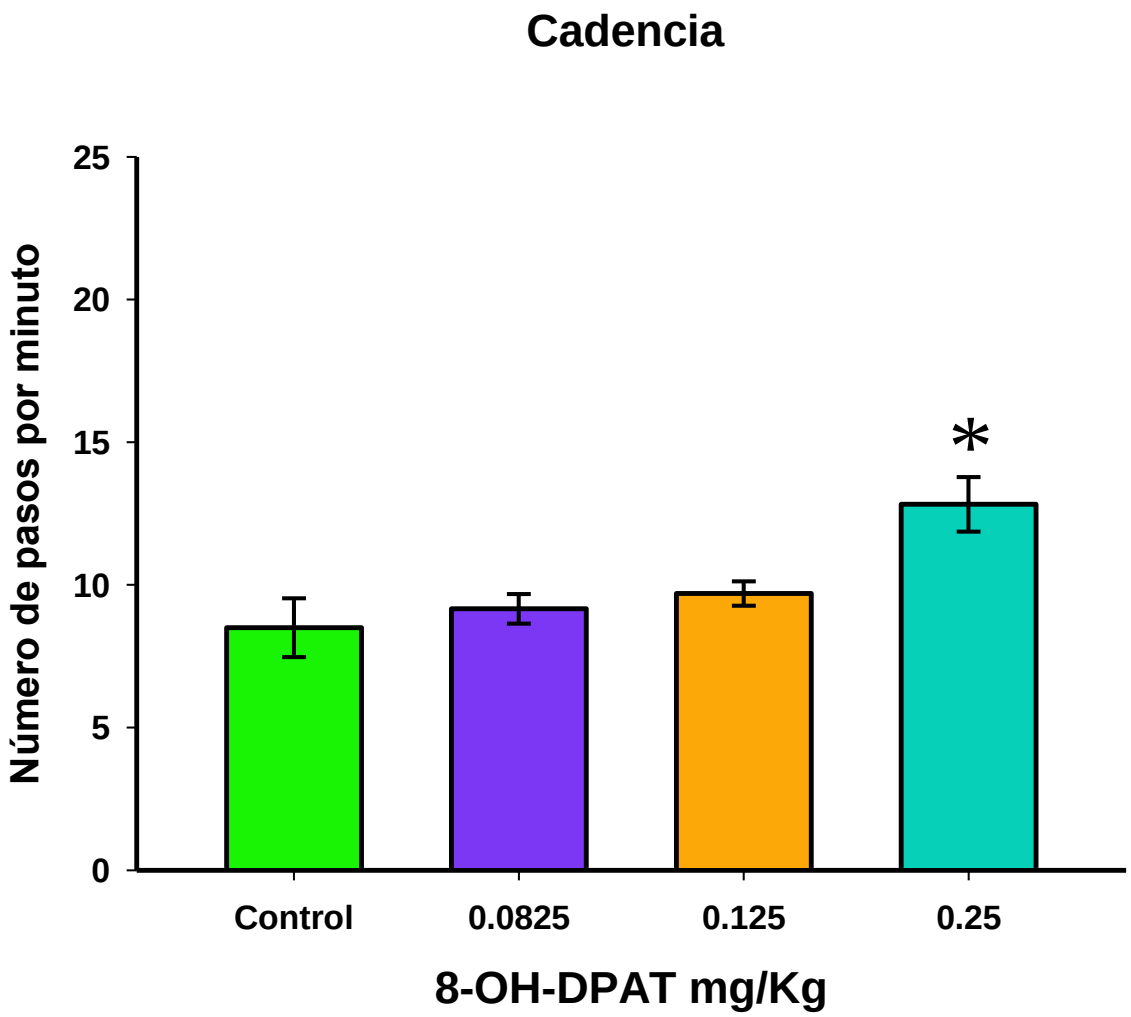

Figura 38. Cadencia de la marcha en la rata *taiep* macho adulta. El 8-OH-DPAT a la dosis de 0.25 mg/Kg aumenta el número de pasos por minuto de la marcha en ratas *taiep* machos de tres meses de edad (ANOVA, H=17.13, gl=3, $P< 0.001$, seguido de una prueba de Dunn, *$P<0.05$).

En la Figura 38 se muestra que la administración de 8-OH-DPAT a la dosis de 0.25 mg/Kg aumenta el número de pasos por minuto respecto a los sujetos tratados con solución salina (ANOVA, H=17.13, gl=3, $P< 0.001$, seguido de la prueba de Dunn, *$P<0.05$). Este agonista serotonérgico en dosis altas incrementa el número de pasos que ejecuta la rata *taiep*, siendo solo la dosis más alta la que produjo un incremento significativo en el número de pasos.

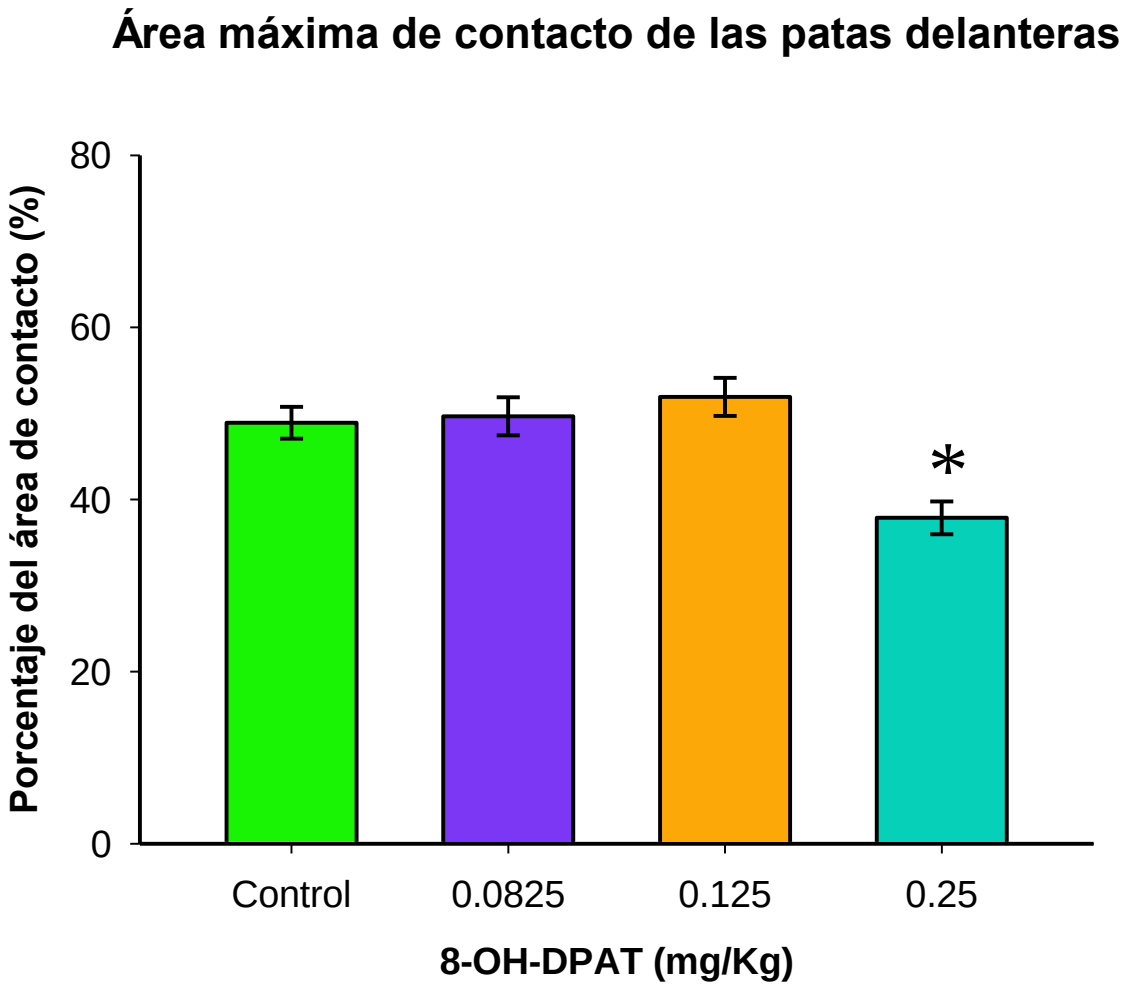

Figura 39. El área máxima de contacto de las patas delanteras tras la administración del serotonérgico 5-HT1$_A$, el 8-OH-DPAT, en la rata taiep macho. El 8-OH-DPAT disminuye el área de contacto de las patas anteriores cuando se administra a la dosis de 0.25 mg/Kg en la rata *taiep* en relación al grupo control (ANOVA, H=21.28, gl=3, *P*<0.001, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05).

La dosis más alta empleada en este estudio del serotonérgico específico de los receptores 5-HT$_{1A}$ el 8-OH-DPAT (0.25 mg/Kg), fue capaz de disminuir el área máxima de la pata al tocar el piso del cristal en la pasarela, con respecto al grupo tratado con solución salina (véase la Figura 39; ANOVA, H=21.28, gl=3, *P*<0.001, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05). Note que el 8-OH-DPAT utilizado a dosis altas puede disminuir el contacto de las patas delanteras durante la fase de soporte.

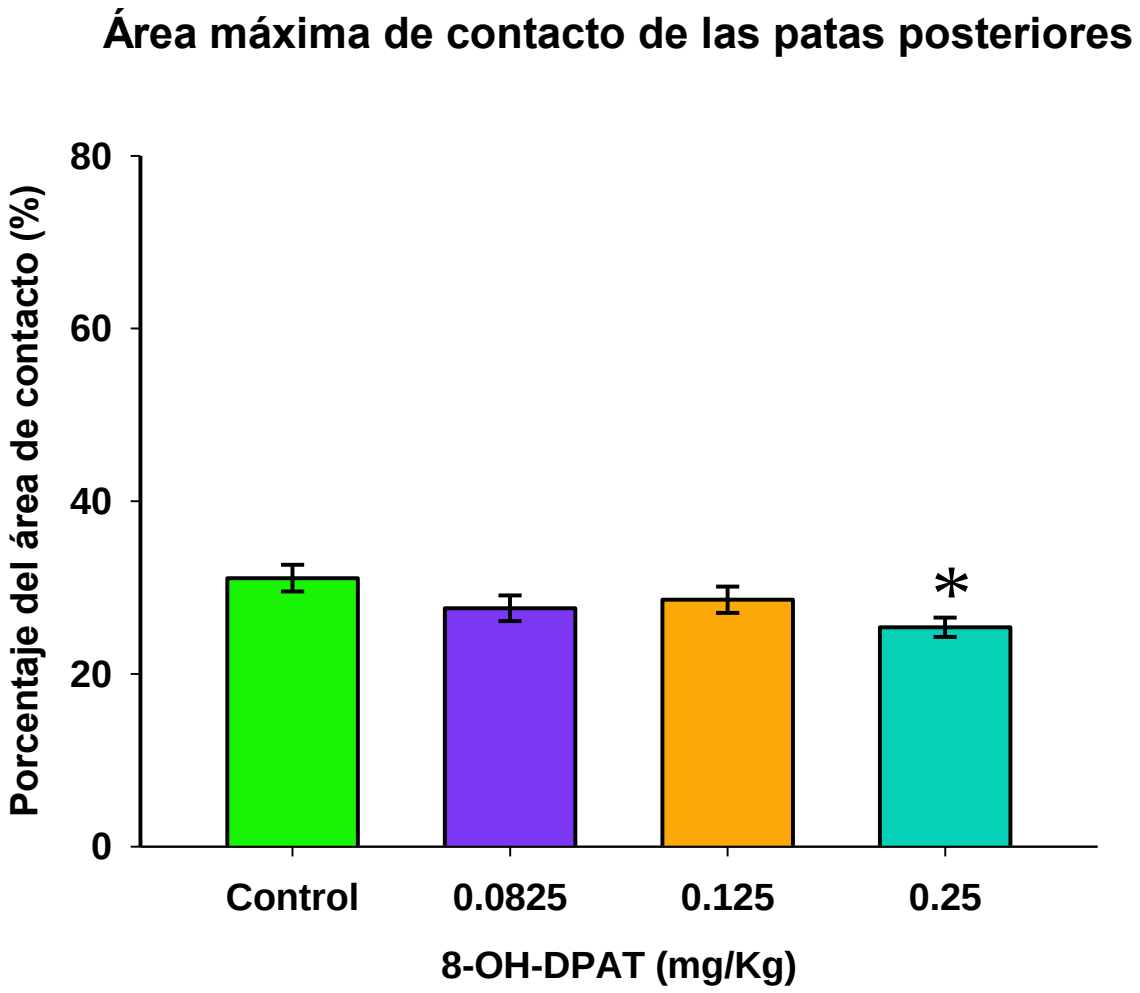

Figura 40. El área de contacto de las patas traseras evaluadas tras la administración de 8-OH-DPAT en la rata taiep macho de tres meses de edad. El agonista serotonérgico disminuye el área de contacto de las patas traseras después de la administración a la dosis de 0.25 mg/Kg en la rata *taiep* respecto al grupo tratado con solución salina (ANOVA, H=21.28, gl=3, *P*>0.001, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05).

En la Figura 40 se ilustran los resultados obtenidos tras la administración del agonista serotonérgico 8-OH-DPAT en el mutante de mielina *taiep*. Note que la dosis empleada más alta de 0.25 mg/Kg, disminuyó el área de contacto de las patas traseras con relación al grupo control (ANOVA, H=21.28, gl=3, *P*>0.001, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05). Este agonista utilizado en dosis altas permite que las patas traseras realicen menor contacto con la base de la pasarela durante la fase de soporte.

Efectos de la quipacina sobre los parámetros de la marcha en ratas *taiep* macho adultas.

Todos los resultados obtenidos pertenecen a la media más menos el error estándar de la media de 6 ratas *taiep*. Las dosis empleadas fueron quipacina empleadas fueron 0.125, 0.25 y 0.5 mg/Kg administrada por vías i.p..

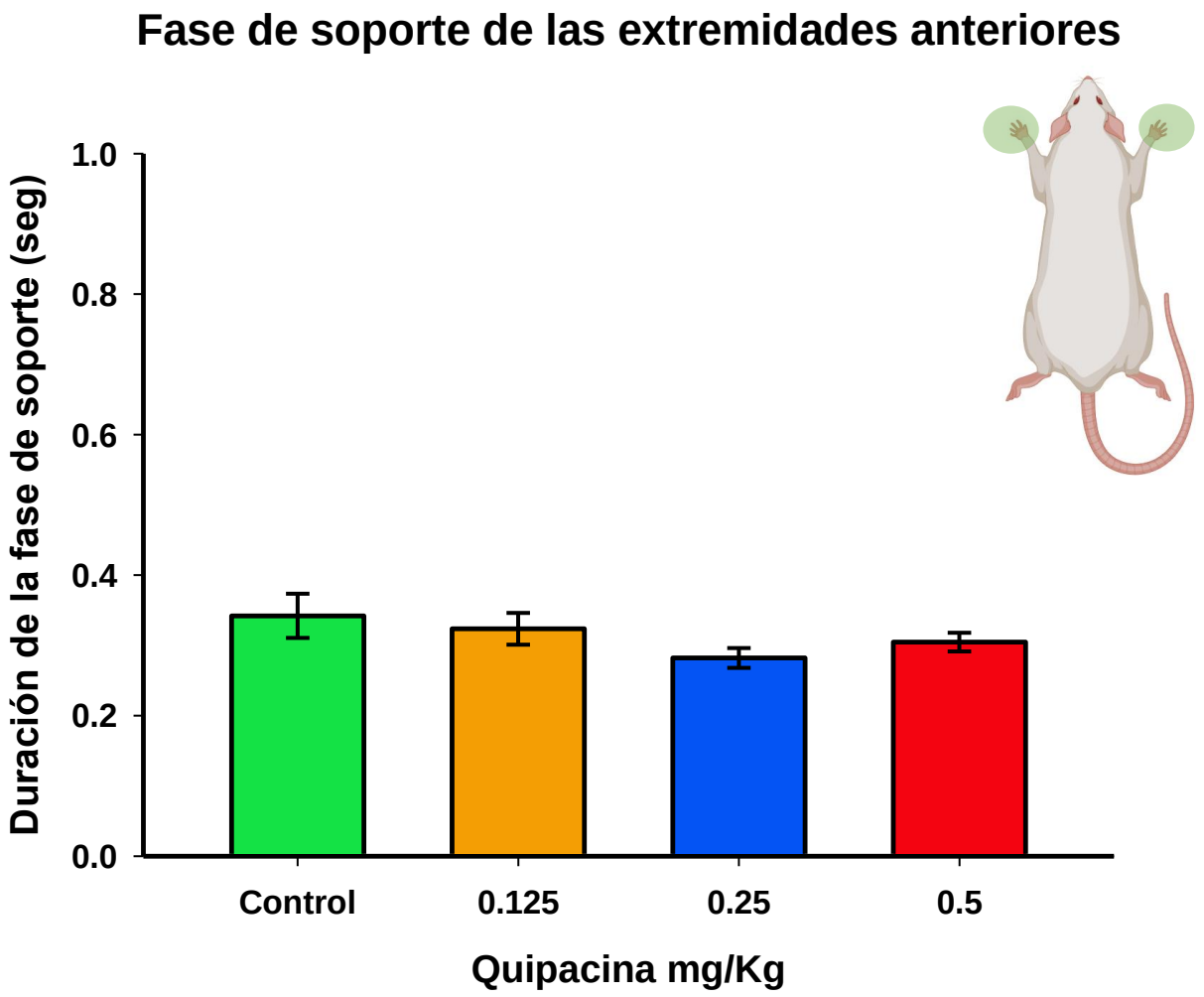

Figura 41. Fase de soporte de las extremidades anteriores. La quipacina no modifica la fase de soporte en ratas *taiep* machos de tres meses de edad (ANOVA, H=0.894, gl=3, *P*=0.82).

En la Figura 41 se muestra la duración de la fase de soporte de las extremidades anteriores en ratas *taiep* tratadas con quipacina a las dosis de 0.125, 0.25 y 0.5 mg/Kg. Con ninguna de las dosis empleadas de este agonista serotonérgico de los receptores 5-

HT_{2A} se obtuvieron efectos significativos sobre la fase de soporte (ANOVA, H=0.894, gl=3, *P*=0.82).

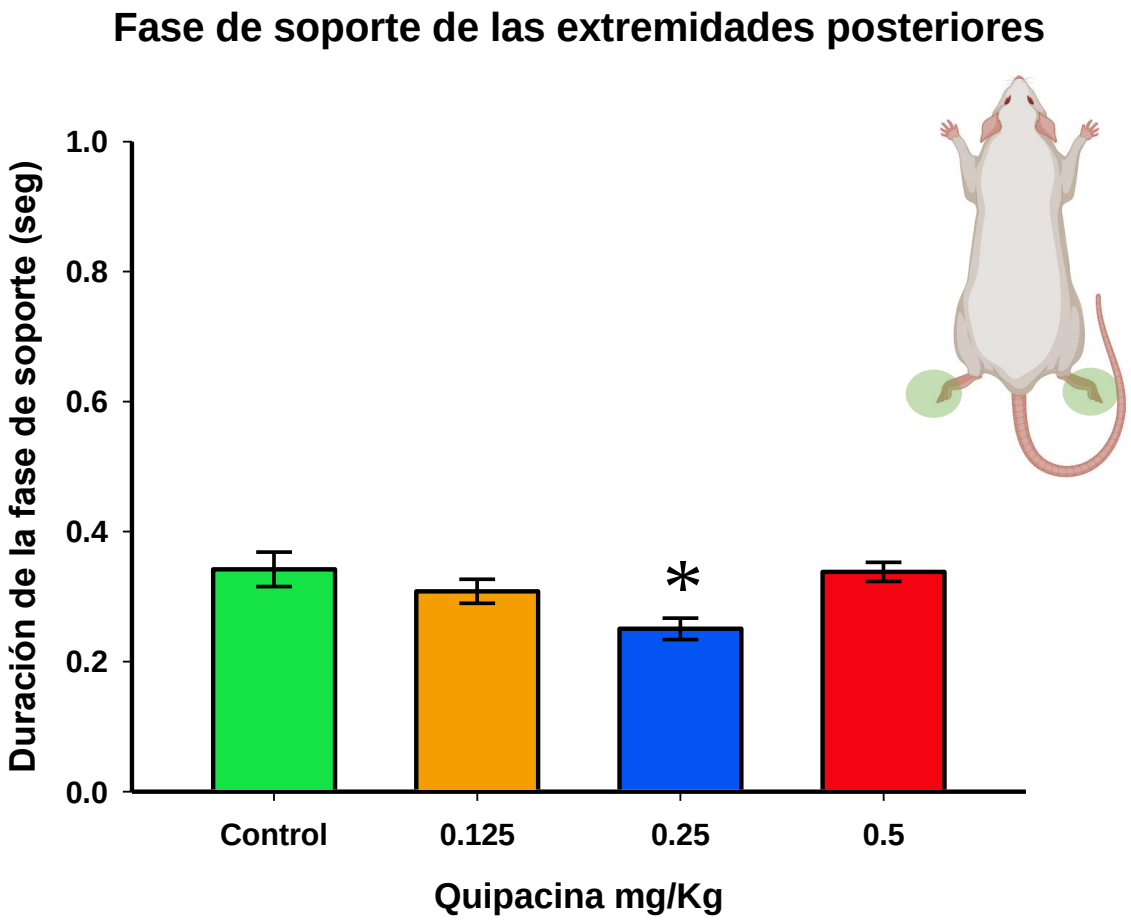

Figura 42. La fase de soporte de las extremidades posteriores. La quipacina a la dosis de 0.25 mg/Kg disminuye la fase de soporte de las extremidades posteriores en ratas macho *taiep* adultas (H=17.42, gl=3, *P*< 0.05, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05).

En la Figura 42 se muestra que la quipacina (0.25 mg/Kg) disminuyó la duración de la fase de soporte respecto a los sujetos tratados con solución salina (H=17.42, gl=3, *P*< 0.05, seguido de la prueba de Dunn, **P*<0.05). Cabe la pena destacar que solo con esta dosis intermedia fue con la que se obtuvieron efectos significativos.

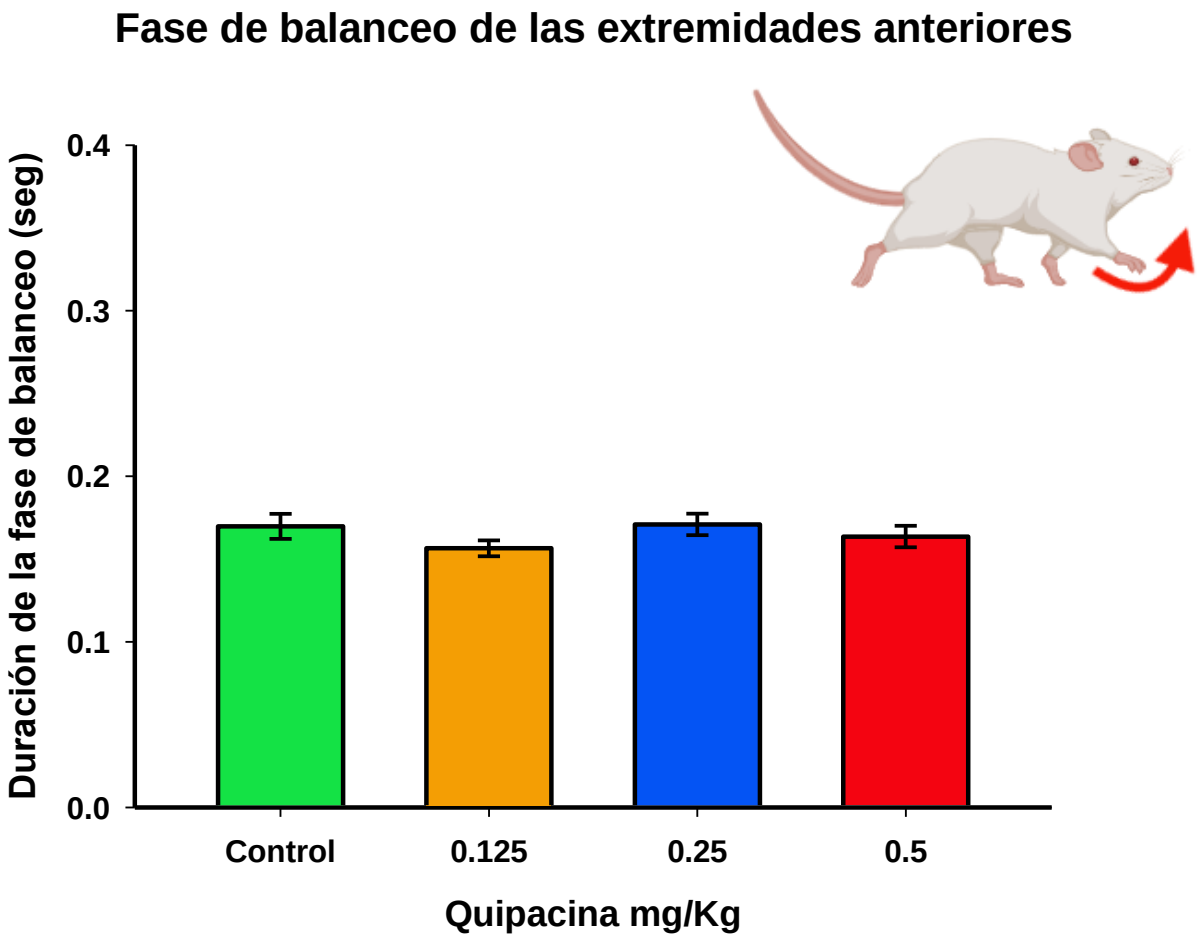

Figura 43. La fase de balanceo de las extremidades anteriores en ratas macho *taiep* adultas. La quipacina no modifica la fase de balanceo en las extremidades anteriores de ratas *taiep* adultas (ANOVA, H=3.98, gl=3, *P*=0.26).

En la Figura 43 se muestran los resultados tras la administración de quipacina en ratas *taiep*. La quipacina a las dosis de 0.125, 0.25 y 0.5 mg/Kg no modificó la duración de la fase de balanceo de manera significativa respecto al grupo tratado con solución salina (ANOVA, H=3.98, gl=3, *P*=0.26).

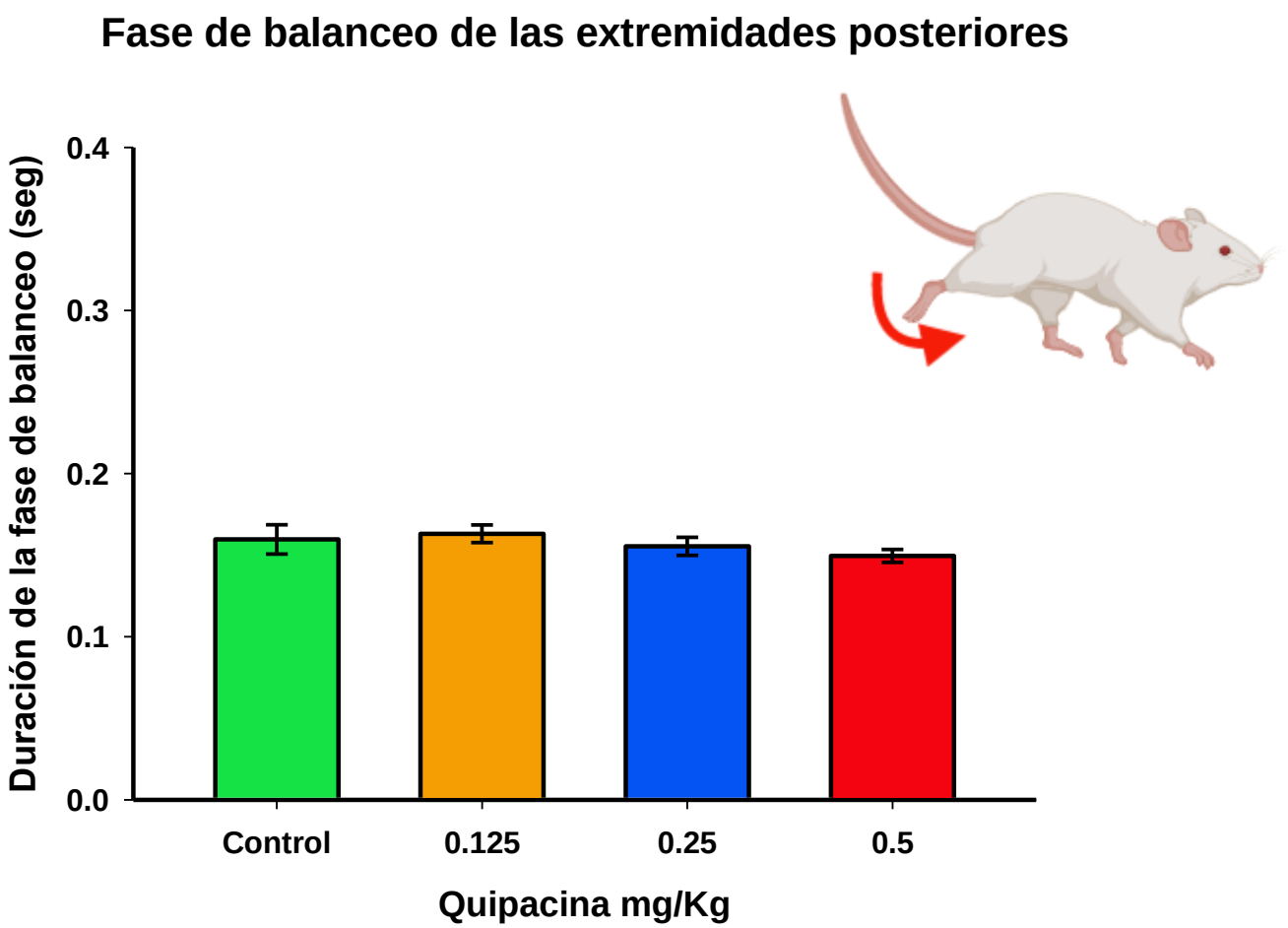

Figura 44. Fase de balanceo de las extremidades posteriores en la rata macho *taiep* adulta. La quipacina no modifica la duración de la fase de balanceo en las extremidades posteriores de las ratas *taiep* a los tres meses de edad (ANOVA, H=2.38, gl=3, *P*=0.49).

En la Figura 44 se muestra los resultados evaluados tras la administración quipacina. Con ninguna de las dosis empleadas se obtuvieron cambios significativos en el tiempo en el cual la rata *taiep* mantiene la en la fase de balanceo que se da para avanzar la extremidad en el espacio (ANOVA, H=3.98, gl=3, *P*=0.26).

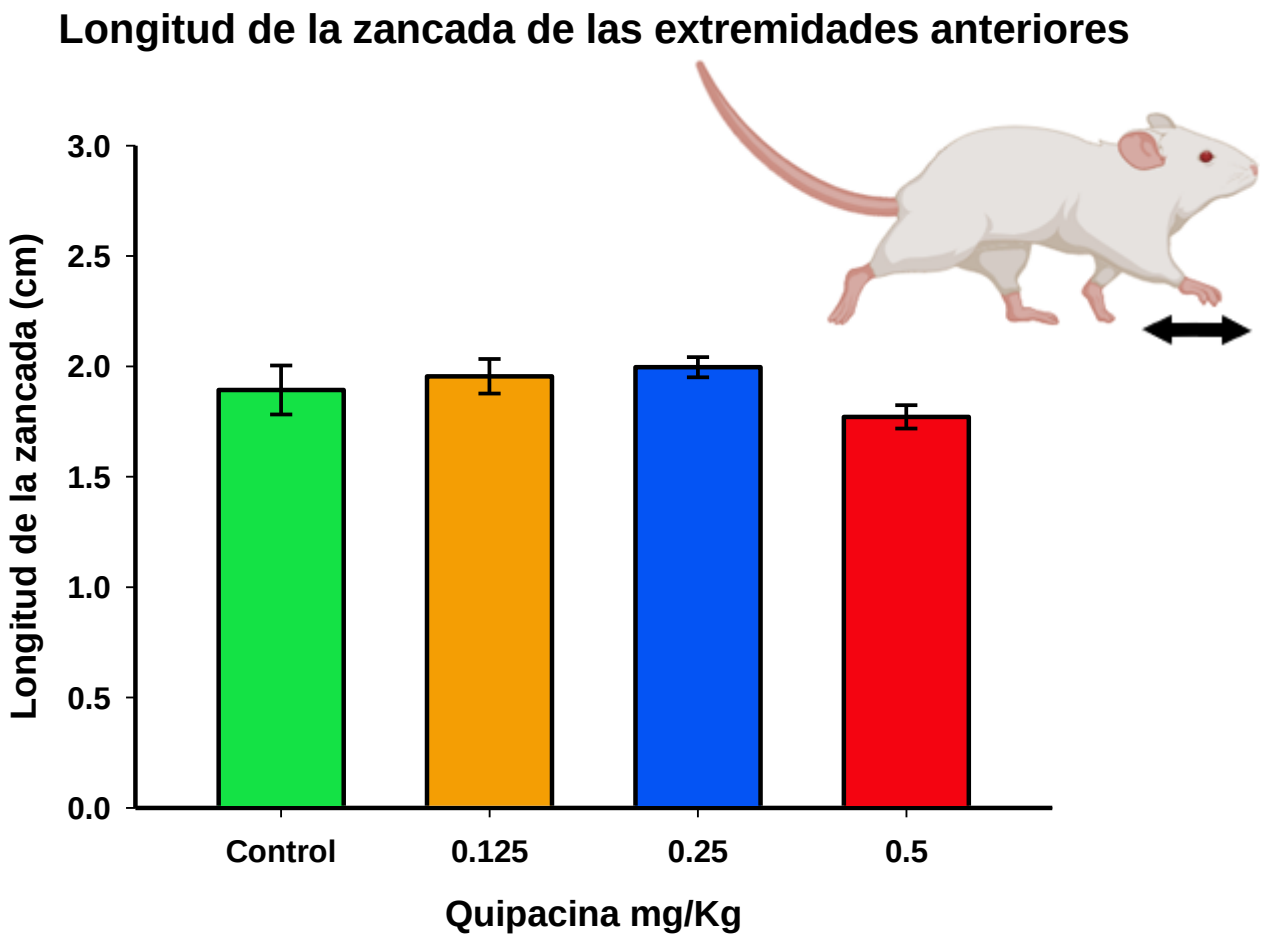

Figura 45. La longitud de zancada de las extremidades anteriores. La administración de quipacina no modifica la longitud de la zancada en ratas *taiep* macho adultas (ANOVA, H=7.75, gl=3, *P*=0.19).

En la Figura 45 se muestran los resultados obtenidos con las tres dosis del agonista serotonérgico 5-HT_{2A} la quipacina. Note que no se obtuvo un efecto significativo sobre la longitud de la zancada (ANOVA, H=7.75, gl=3, *P*=0.19).

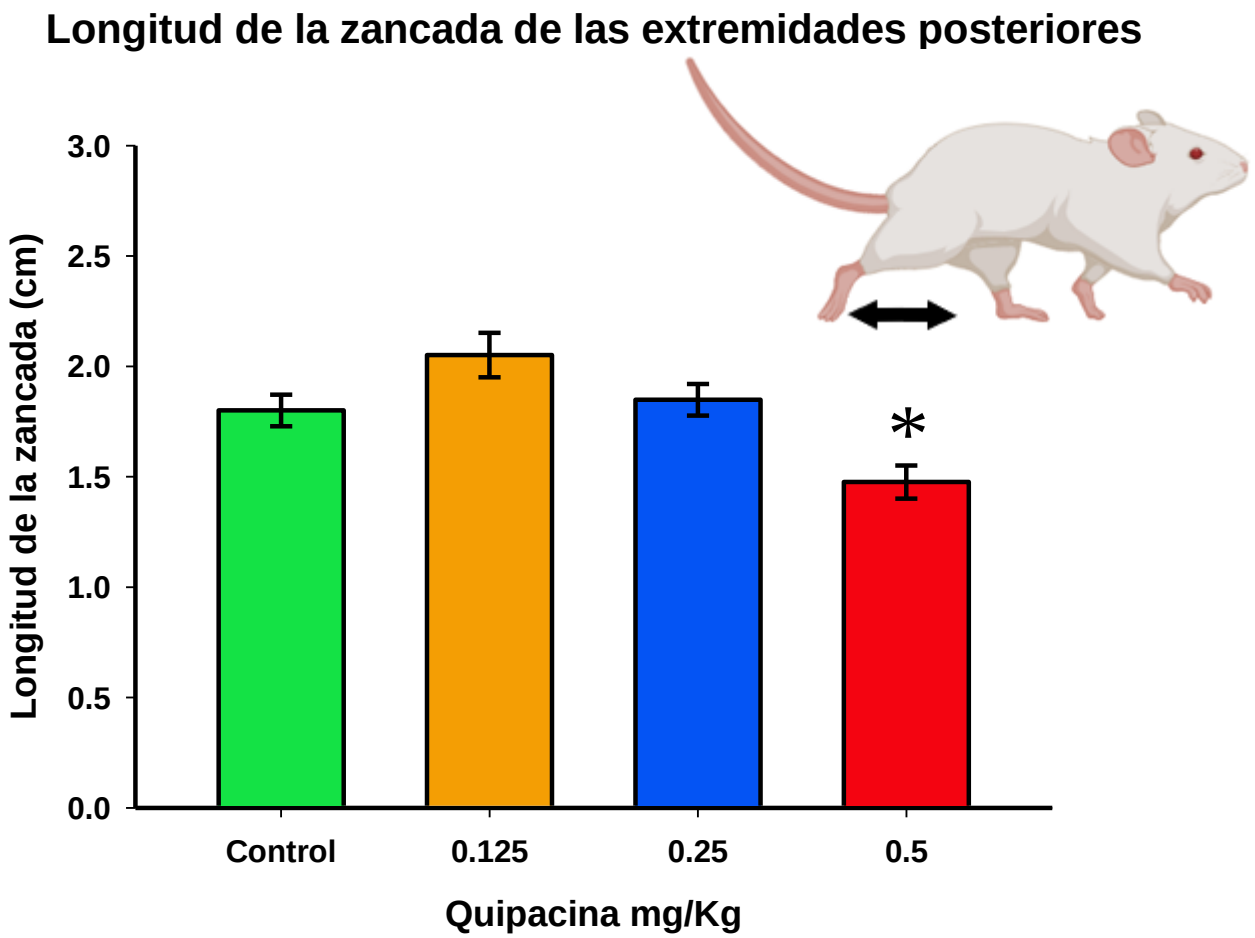

Figura 46. La longitud de zancada de las extremidades anteriores en rata *taiep* tratada con quipacina. La quipacina a la dosis de 0.5 mg/Kg disminuye la longitud de la zancada en las extremidades posteriores (ANOVA, H=18.66, gl=3, $P< 0.05$, seguido de una prueba de Dunn, *$P<0.05$).

En la Figura 46 se ilustran los resultados obtenidos tras la administración del agonista serotonérgico 5-HT_{2A}. Note que solo la quipacina a la dosis de 0.5 mg/Kg produjo una disminución significativa de la longitud de la zancada respecto a los sujetos tratados con solución salina (ANOVA, H=18.66, gl=3, $P< 0.05$, seguido de la prueba de Dunn, *$P<0.05$).

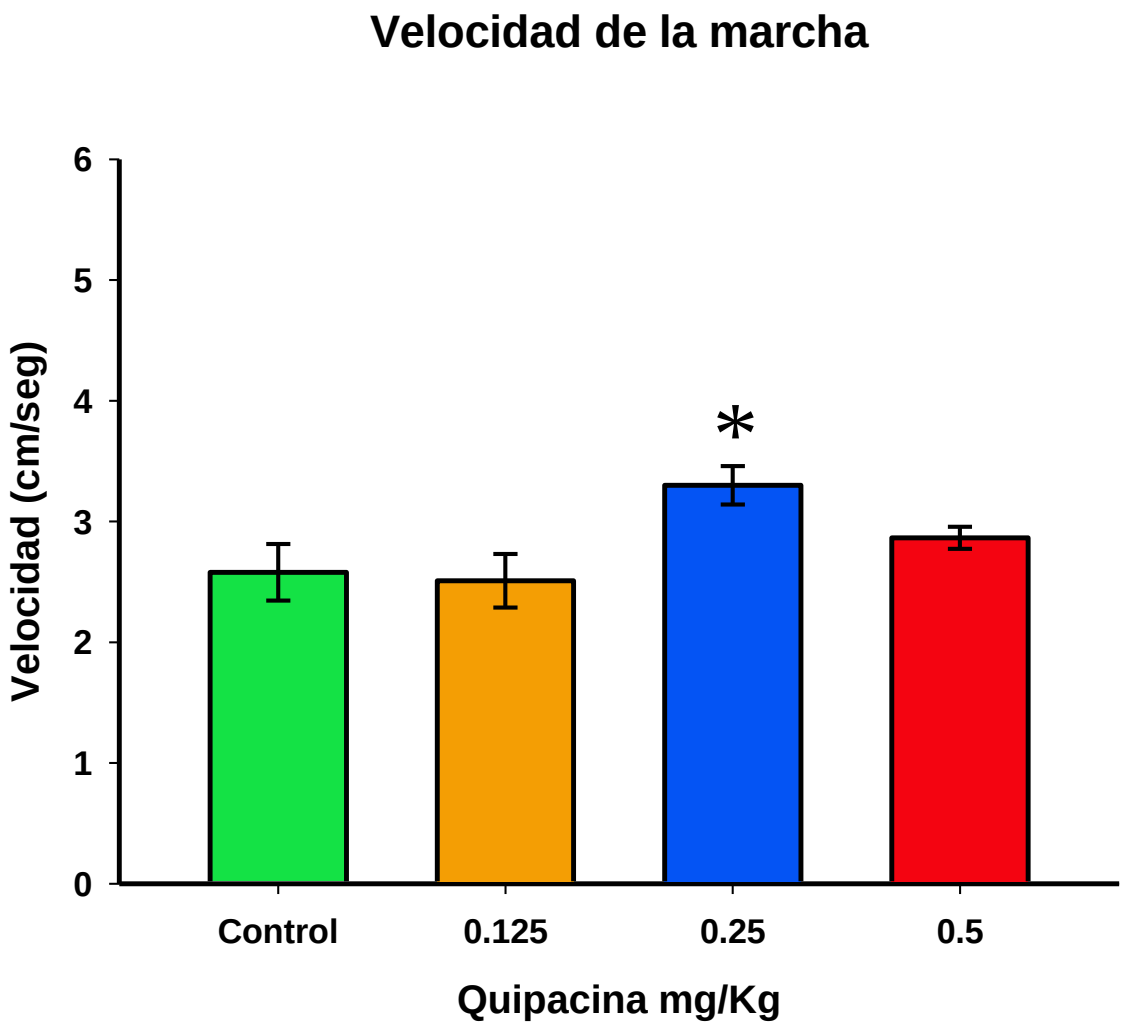

Figura 47. Velocidad de la marcha en la rata macho *taiep* adulta. El agonista serotoninérgico quipacina a la dosis de 0.25 mg/Kg mejora la velocidad de la marcha (ANOVA, H=11.16, gl= 3, *P*<0.014, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05).

En la figura 47 se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de tres dosis del agonista serotonérgico 5-HT_{2A} la quipacina. Note que solo con la administración de quipacina a la dosis intermedia de 0.25 mg/Kg aumentó de manera significativa la velocidad de la respecto del grupo control (ANOVA, H=11.16, gl= 3, *P*<0.014, seguido de la prueba de Dunn, **P*< 0.05).

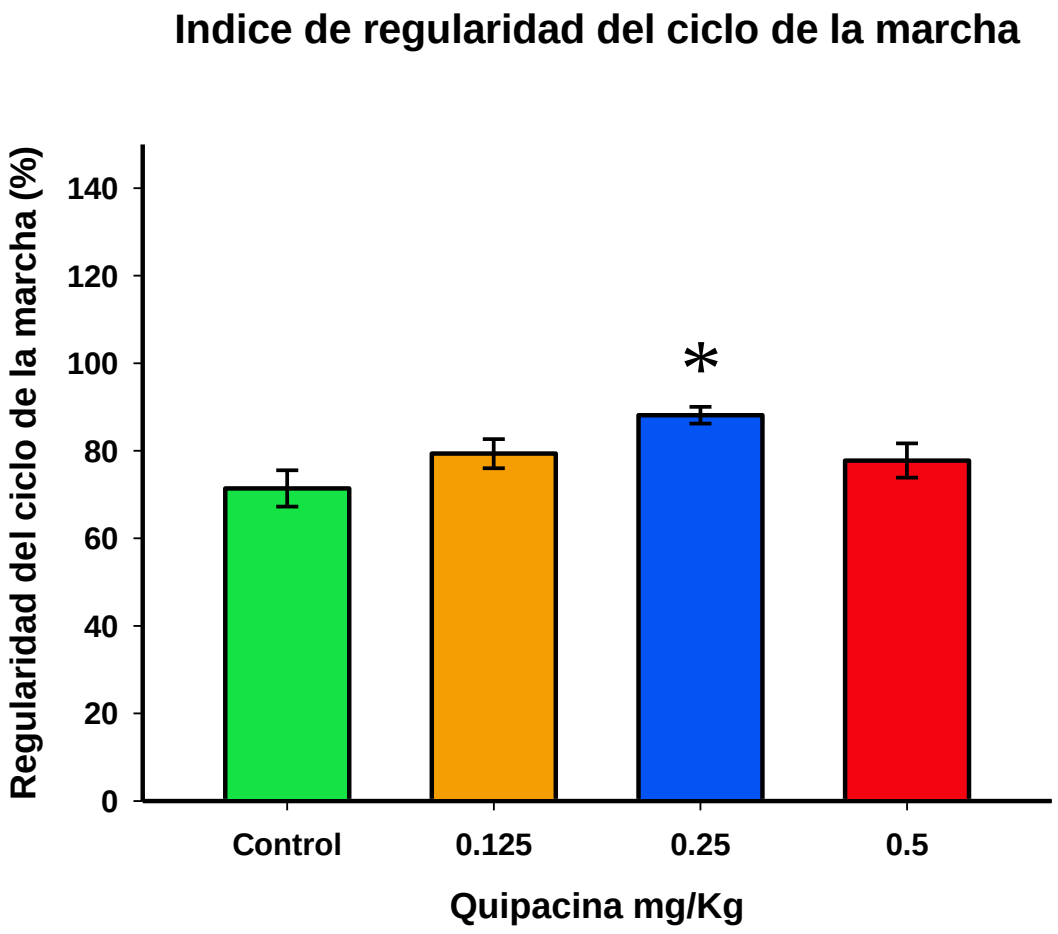

Figura 48. Índice de regularidad de la marcha en ratas macho *taiep* adultas. La administración del agonista serotoninérgico quipacina mejora significativamente la regularidad del ciclo de la marcha (ANOVA, H=9.86, *P*<0.05, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05).

En la a Figura 48 se muestra que la regularidad de la marcha aumenta después de la administración sistémica de quipacina a la dosis de 0.25 mg/Kg, pero no con las otras dos dosis empleadas (ANOVA, H=9.86, *P*<0.05, seguido de la prueba de Dunn, **P*<0.05).

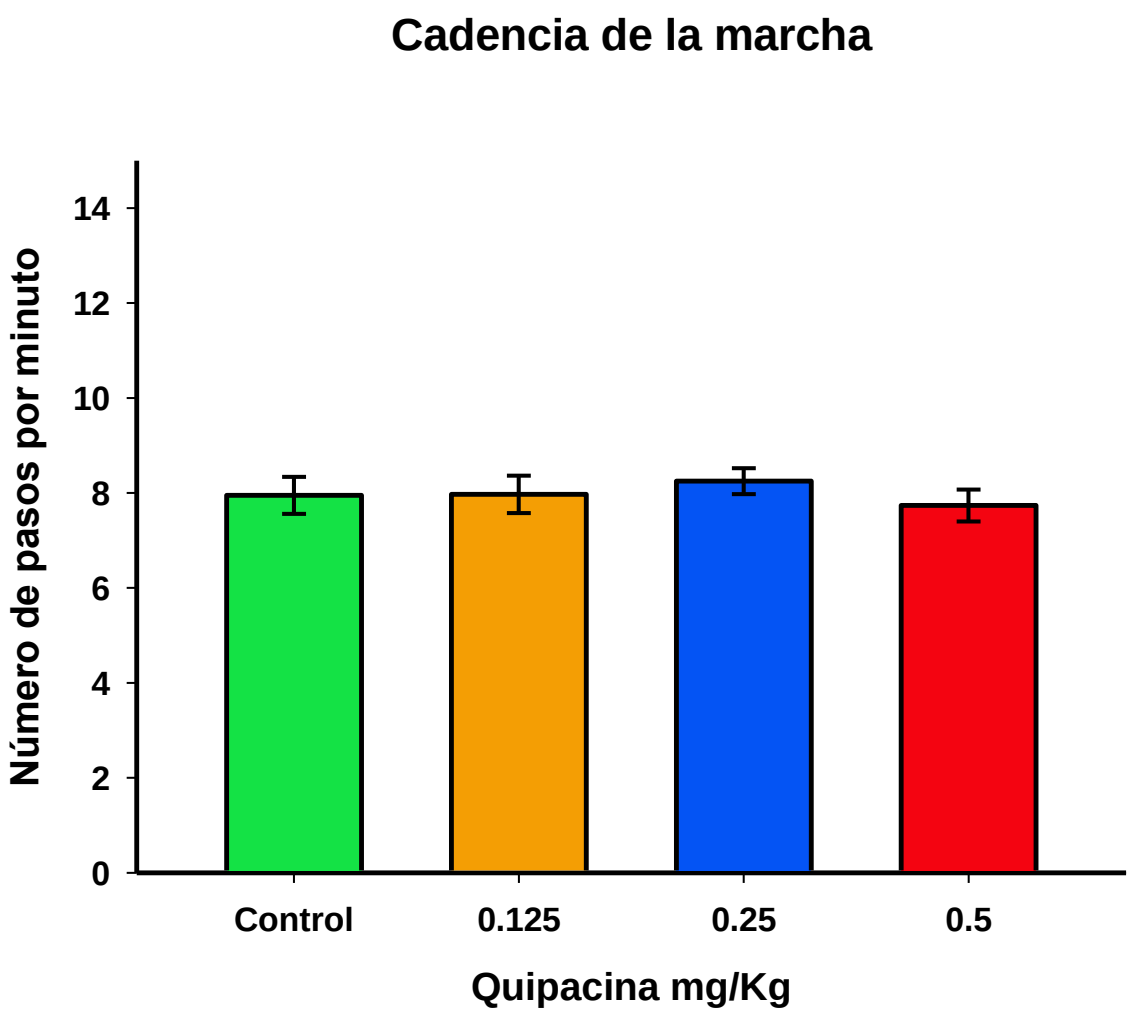

Figura 49. El número de pasos por minuto en la marcha de la rata *taiep* macho adulta. La administración del agonista serotoninérgico quipacina no modifica en número de pasos por minuto en la rata *taiep* a los tres meses de edad (ANOVA, H=02.34, gl=3, *P*=0.5).

En la Figura 49 se ilustra el número de pasos por minuto antes y después de emplear tres dosis del agonista serotonérgico 5-HT_{2A} la quipacina. Note que no se obtuvieron cambios significativos con ninguna de las dosis empleadas de la droga (ANOVA, H=02.34, gl=3, *P*=0.5).

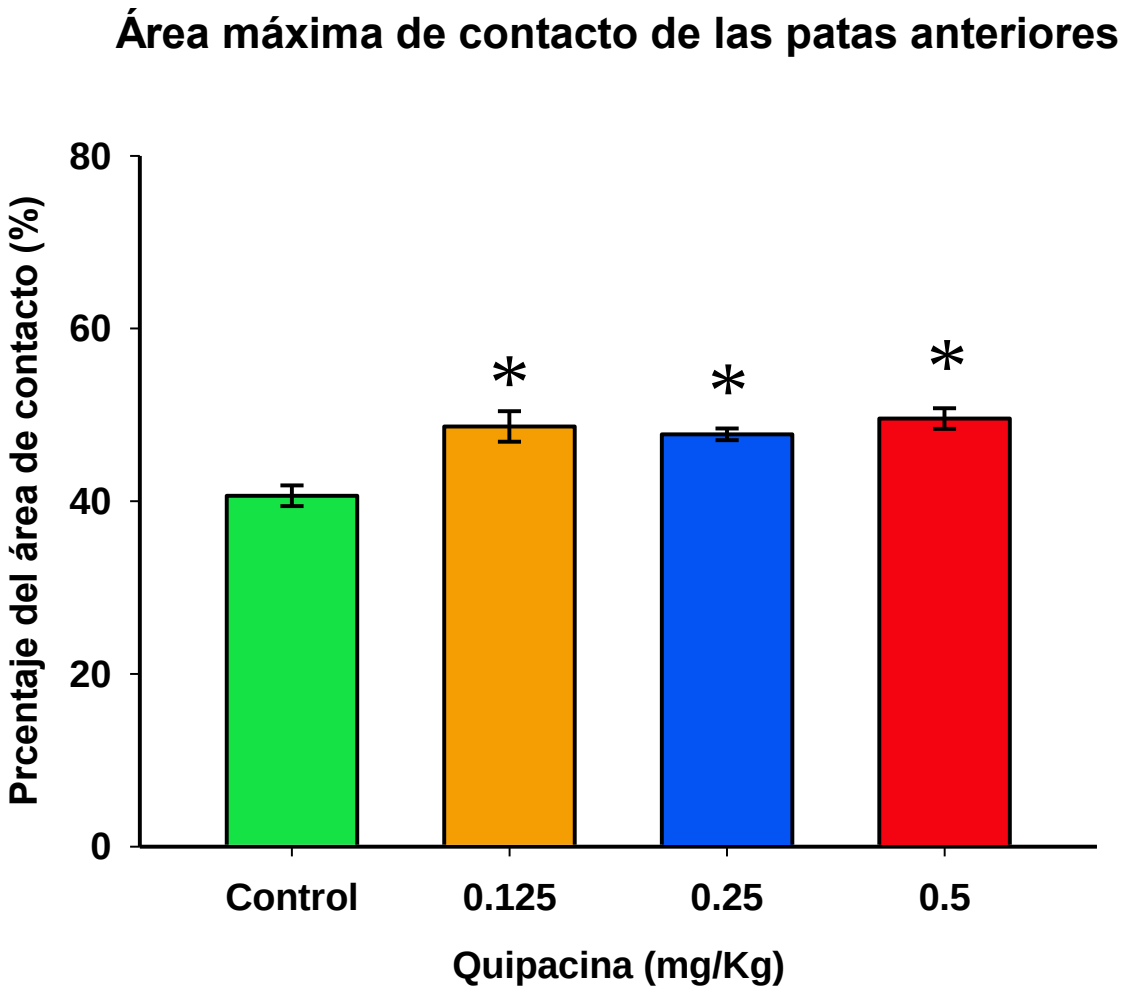

Figura 50. Área de contacto de las patas delanteras tras la administración del agonista 5-HT2A la quipacina en ratas taiep macho adultas. La quipacina aumenta el área máxima de contacto con todas las dosis evaluadas (0.125, 0.25, 0.5 mg/Kg), con respecto a los sujetos tratados con solución salina (ANOVA, H=24.95, gl=3, *P*<0.001, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05).

En la Figura 50 se ilustran los resultados obtenidos tras la administración del agonista serotonérgico de los receptores 5-HT_{2A} la quipacina. Note que con todas las dosis empleadas se obtuvo un incremento significativo del área de contacto de las patas delanteras con respecto a las ratas tratadas con solución salina fisiológica (ANOVA, H=24.95, gl=3, *P*<0.001, seguido de la prueba de Dunn, **P*<0.05). Cabe la pena resaltar que este agonista mejora la capacidad de la pata al apoyarse de manera más eficiente durante la fase de soporte.

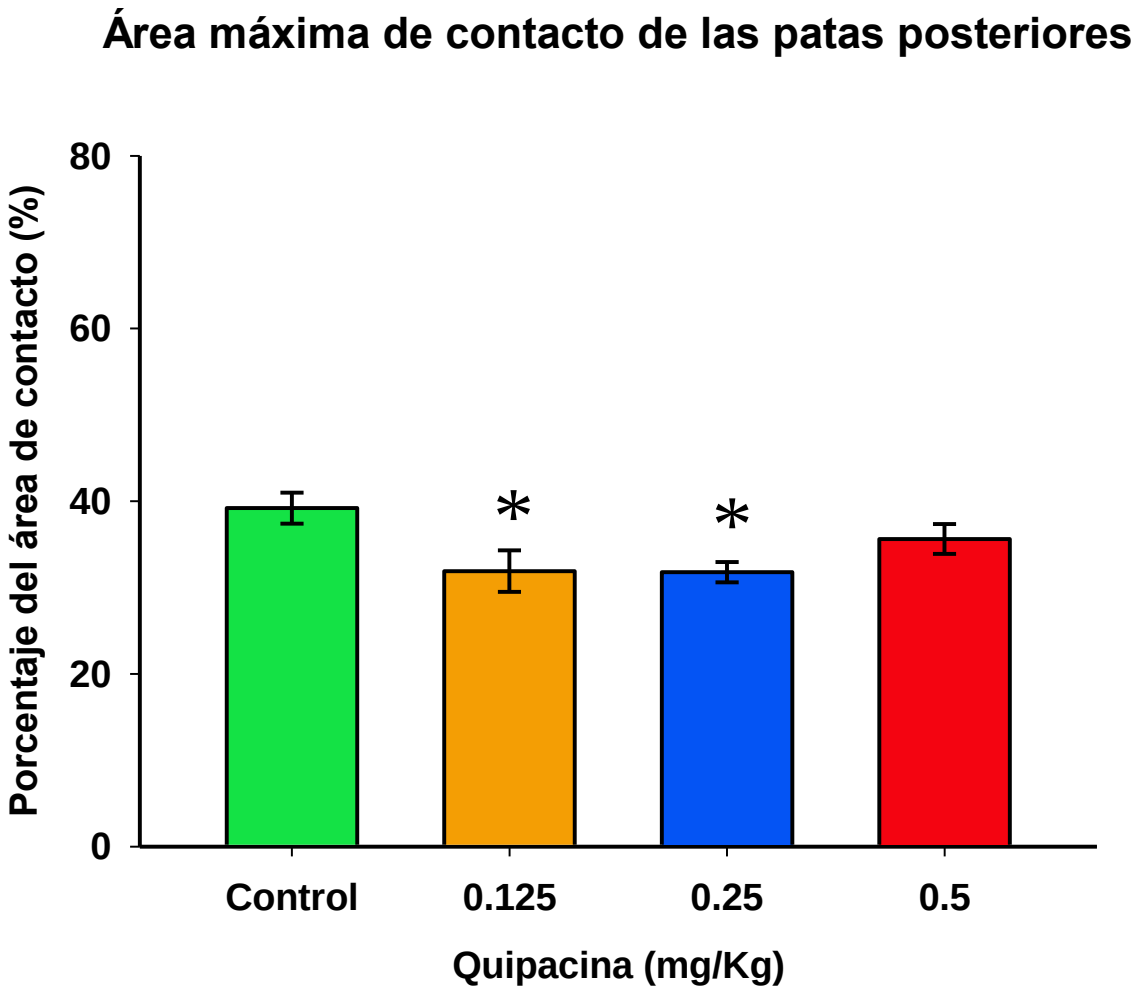

Figura 51. Evaluación del área de contacto de las patas traseras empleando el agonista serotonérgico quipacina en la rata taiep macho de tres meses de edad. La quipacina disminuye el área máxima de contacto en la rata *taiep* cuando se andinista a las dosis de 0.125 y 0.25 mg/Kg con respecto al grupo control (ANOVA, H=13.15, gl=3, *P*=0.004, seguido de una prueba de Dunn, **P*<0.05).

En la figura 51 se ilustran los resultados obtenidos después de la administración de quipacina en el área de contacto de las patas traseras en la rata *taiep*. Note que la quipacina a las dosis de 0.125 y 0.25 mg/Kg disminuyó el área de contacto de las patas traseras en las ratas *taiep* respecto a las ratas tratadas con solución salina (ANOVA, H=13.15, gl=3, *P*=0.004, seguido de la prueba de Dunn, **P*<0.05). Este agonista serotonérgico mejora el desplazamiento de la rata hacia adelante según lo que se observa en la Figura 48, de tal forma que el área de contacto de las patas delanteras se incrementa y de las traseras disminuye durante el ciclo de la marcha.

Discusión

El análisis cinemático de la marcha ha tenido varias etapas. Eadwear Muybridge fue un fotógrafo y animador que dio vida a múltiples escenas de la carrera y galope de distintos animales a finales del siglo XIX, se utilizó la fotografía y el cine como una aproximación para evaluar el movimiento de las extremidades en las distintas fases del ciclo locomotor, y también cómo se adaptan estos cuando se pasa de la caminata al trote y de este al galope en animales con marcha cuadrúpeda. También se analizaron otras actividades con alternancia como son el nado, o incluso otras modalidades de desplazamiento como el salto de un canguro o el arrastre sobre el piso en las serpientes (Biewener y cols., 1990).

Otras aproximaciones del análisis de la marcha ha sido el registro de las huellas después de que se han pintado las plantas de las patas o uno muy socorrido por su sencillez como lo es la cinemática basada en marcar las tres articulaciones de las extremidades inferiores y filmar con una cámara a velocidad normal o con menores velocidades, lo que permite un análisis detallado de la fase de soporte y de la de balanceo (Sutherland, 2002).

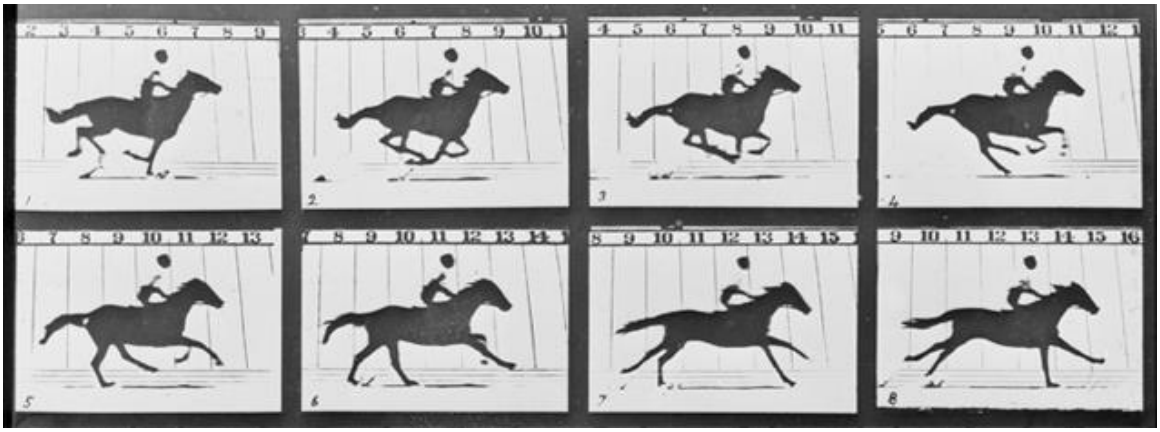

Figura 52. El caballo corriendo "The running horse". Fotografía tomada por Eadweard Muybridge en 1888, fue una de las primeras aproximaciones para entender y estudiar la locomoción desde un punto de vista dinámico (Muybridge, 1888, tomado de Baker, 2007).

El mutante de mielina *taiep*, es un modelo idóneo para el estudio de las patologías desmielinizantes crónicas del SNC, ya que tiene una esperanza de vida igual a la de una rata normal, esto es hasta los 24 meses (Cortes y cols., 1995; Blackmore y cols., 2005;

Duncan y cols, 2017), en base a lo anterior es posible analizar con detalle las alteraciones motoras de procesos de patrones complejos alternantes y estereotipados como lo es la marcha, los cuales son comandados por generadores centrales de patrones en la médula espinal (Grillner., 1985), pero son modulados por distintas estructuras supraespinales para ajustar la marcha a un entorno cambiante.

De hecho, en un estudio previo del laboratorio pudimos determinar que la velocidad del desplazamiento y el número de pasos fue menor en las ratas *taiep* con respecto a las ratas normales Sprague-Dawley (Rocha, tesis de maestría 2010), a lo largo de los primeros seis meses de vida como se ilustra en la Figura 53. Debemos destacar que existen dos tipos de fases en el deterioro de la marcha en la rata *taiep* y que el peso entre la rata *taiep* y la Sprague-Dawley son similares en los primeros tres meses de vida (Rocha, tesis de maestría 2010).

En base a estos resultados en el presente trabajo de tesis, se emplearon ratas macho *taiep* de tres meses de edad, ya que la velocidad de la marcha es estable entre los tres y cuatro meses que fue el rango de edad cuando se analizaron los efectos de las drogas probadas en este estudio de tesis de maestría.

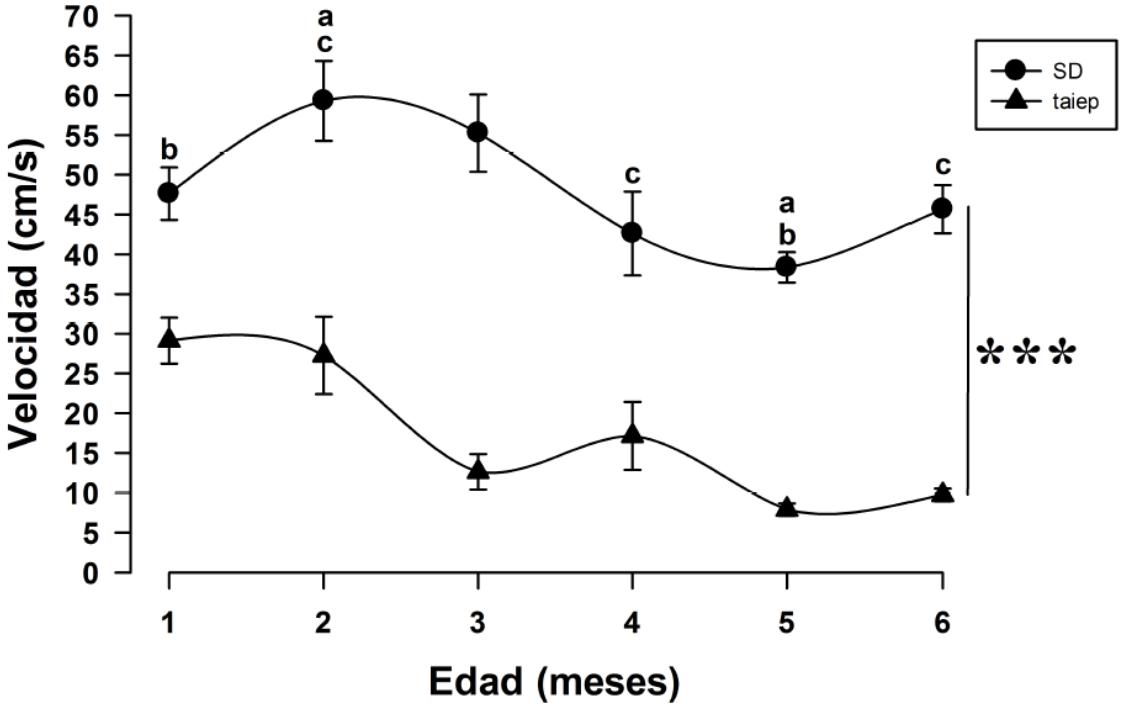

Figura 53. Velocidad promedio en los primeros seis meses de edad en ratas taiep y controles Sprague-Dawley. Se ilustran las velocidades promedio al primer mes hasta los seis meses de vida en la rata *taiep* y controles Sprague-Dawley. Note que la rata *taiep* deambula a menor velocidad que la Sprague-Dawley desde el primer mes de vida, y la disminución de la velocidad se vuelve progresiva con el tiempo (modificado de Rocha, tesis de maestría 2010).

Las alteraciones motoras son un signo común a múltiples patologías neurodegenerativas, musculares e incluso óseas. La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo que afecta a las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* pars *compacta* produciendo alteraciones motoras como son el temblor, la ataxia, la rigidez y alteraciones en la marcha; existen más de 10 millones de personas afectadas por esta patología en todo el mundo, siendo los pacientes de más cincuenta años los más afectados (Poewi y cols., 2017). La ataxia o ausencia de orden al deambular, denota un síndrome clínico de falta de coordinación, como en la ataxia espinocerebelosa (SCA, de sus siglas en inglés) es un grupo de ataxias hereditarias que se caracterizan por cambios degenerativos en el cerebelo y con menor frecuencia en la médula espinal, afectan a 0.27 por cada 100,000 personas en todo el mundo, es decir aproximadamente hay 16 millones de afectados (Ruano y cols., 2014). Las alteraciones en la marcha y la postura son el principal signo de discapacidad en este trastorno, aunque también se puede presentar disartria, nistagmus, diplopía y alteraciones cognitivas (Klockgether y cols., 2019).

El cáncer es un crecimiento incontrolado de células anormales en el cuerpo, se estimas aproximadamente 43.8 millones de personas afectadas por esta patología (WHO, 2018). Dentro de los tipos de cáncer más frecuentes se encuentran el de pulmón (18%), el de mama (11.6%) el colorectal (10.2%) y el de próstata (7.1%) entre otros (Ferlay y cols., 2019). Las alteraciones neuromusculares y músculo-esqueléticas producidas por el cáncer tienen diversas causas como lo son la compresión mecánica derivada del tumor, la diseminación hematológica, la diseminación linfática meníngea y la perineural, también, algunas otras derivadas de por efectos secundarios como la desnutrición y las infecciones. Del 2.5 al 5.5 por ciento de pacientes con cáncer de pulmón y de mama presentan alteraciones motoras que afectan su deambulación y el 28.5 % de pacientes

con distintas neoplasias también sufren de alteraciones motoras, entre ellas la deambulación en su organización espacio-temporal o con ataxia (Custodio y cols., 2008).

Como se ha descrito en la presente tesis la esclerosis múltiple es un trastorno desmielinizante del SNC, sin embargo, existen otro tipo de enfermedades que afectan a la marcha como lo son: la neuromielitis óptica la cual produce inflamación y desmielinización del el nervio óptico y la médula espinal; la mielitis transversa produce inflamación de la médula espinal afectando todas las vías por debajo del nivel de lesión; la encefalomielitis diseminada aguda produce inflamación del encéfalo y la médula espinal (Love, 2006). El síndrome de Guillain Barré que es una polirradiculoneuropatía desmielinizante aguda y autoinmune que afecta al SNP, desencadenada por una infección viral o bacteriana (Hughes y cols., 2007). Es considerado la causa más común de parálisis hipotónica ya que afecta a 2.7 de cada 100,000 habitantes, se caracteriza por producir debilidad muscular periférica, trastornos respiratorios derivados de la parálisis del diafragma, arreflexia o hiporreflexia osteotendinosa y alteraciones en la marcha y la postura, afectando la coordinación entre las extremidades y produciendo caídas (Wilson y cols., 2016).

Por otra parte, las tubulinopatías son un grupo de entidades patológicas recientemente descritas y pueden conducir a malformaciones complejas en la corteza y en otras estructuras del SNC. Todas ellas son causadas por la disfunción de las tubulinas y las proteínas asociadas a los microtúbulos. Se trata de una mutación en algunos de los genes que codifica para las isoformas de las: α-tubulina (gen TUBBA1A), β-tubulina (genes TUBB2A, TUBB2B, TUBB3, TUBB5) Y γ-tubulina (gen TUBBG1) (Gonçalves y cols., 2018; Eguibar y cols., aceptado para su publicación 2019; Garduno-Robles y cols., 2020). Los genes TUBA1A, TUBB2B y TUBB3 son los causantes de más del 90% de malformaciones cerebrales los que incluyen: liscenfalia, paquirigia, anomalías callosas, ventrículomegalia, ganglios basales dismórficos, tallo cerebral asimétrico y vermis del cerebro pequeño (Bahi-Buisson y cols., 2014; Gonçalves y cols., 2018). Dentro de las características clínicas se incluyen discapacidades motoras e intelectuales, epilepsia y alteraciones oculares. Se ha reportado que la tubulinopatía del gen TUBB4A en pacientes presentan

una hipomielinización asociada a una atrofia de los ganglios basales y cerebelo (síndrome H-ABC, de sus siglas en inglés); los pacientes presentan retraso motor en la etapa infantil con problemas para deambular, rigidez y espasticidad progresivas (Hamilton y cols., 2017; Joyal y cols., 2018)

La lesión medular espinal (SCI, de sus siglas en inglés) se caracteriza por afectar de manera parcial o total la continuidad del tejido neuronal en la médula espinal, existen aproximadamente 93.5 millones de personas con SCI y 368 de cada 100,000 pacientes terminan con alguna discapacidad que limita sus actividades de la vida diaria como lo son las alteraciones en la marcha (GBDTB, 2019). Las principales causas en América del Norte son debido a accidentes automovilísticos alcanzando hasta un 38.6 % y la segunda causa más frecuente son las caídas, sobretodo en pacientes de la tercera edad con un 32.2 % (NSCISC, 2019).

Por la alta incidencia de SCI se han realizado modelos *in vivo* e *in vitro* para resolver los problemas neurodegenerativos que dejan como secuela este tipo de lesiones medulares. Desde la década de los 60's del siglo pasado, Jankowzka y colaboradores demostraron que la dopamina puede generar patrones locomotores en gatos espinalizados. En el experimento utilizaron una combinación de L-DOPA por vía intravenosa (i.v.) más nialamida, un inhibidor de la monoaminaooxidasa, de tal forma que la L-DOPA y la dopamina que se produce, pudiera mantener su actividad por más tiempo. Treinta minutos después de la administración las drogas en la médula espinal, registraron una actividad alternante rítmica entre en los eferentes flexores y extensores (Jankowzka y cols., 1967). Algunos años más tarde Viala y cols., mostraron que la 5-HT administrada por i.v. en conejos paralizados por anestesia, pero con el sistema nervioso intacto, mejoraban en la actividad de tipo locomotora en las extremidades posteriores (Viala y cols., 1971, 1974). Estos experimentos mostraron clara y contundentemente que el generador de patrones de la marcha a nivel espinal puede ser modulado positivamente por la dopamina e inducir alternancia motora.

A principios de la década de los 80's la preparación de la médula espinal de rata *neonata in vitro* se volvió muy popular para ser utilizada en investigaciones farmacológicas que

involucraban la función de la médula espinal. Cazalets y cols., extrajeron la médula espinal de la rata *neonata* e hicieron estudios del patrón locomotor en las raíces ventrales desde el día postnatal 0 al 5to día postnatales (DPN); posteriormente, la médula espinal se mantiene un recipiente con liquido cefalo-raquídeo artificial y burbujeado con carbógeno. Bajo estas condiciones se pueden obtener registros de varias horas, y al momento cuando se agregan al baño 5-HT y NMDA se pueden hacer registros de succión en las raíces ventrales de las raíces lumbares o sacras y simultáneamente realizar registros intracelulares en las motoneuronas que inervan a los músculos flexores y extensores, encontrando actividad locomotora alternante ficticia (Cazalets y cols., 1995). Posteriormente Kienh y cols., mostraron que la L-DOPA *in vitro* produce una actividad rítmica y alternante en las motoneuronas de los músculos flexores y extensores, similar a la locomoción de ratas intactas. Sin embargo, la 5-HT produjo un ritmo más rápido y estable (Kiehn y cols., 1996).

Posteriormente, la preparación se realizó en otros modelos murinos, así Jiahg y cols., mostraron que en la médula espinal de ratón de 12 DPN no se producía actividad locomotora tras la administración de manera independiente de 5-HT, NMDA o L-DOPA; pero la administración simultanea de esto indujo actividad rítmica entre las motoneuronas de los músculos flexores y extensores (Jiahg y cols., 1999). Cabe la pena destacar que en los trabajos realizados en el ratón neonato de 0 a 7 DPN, los fármacos administrados de manera independiente si pueden provocar respuestas semejantes a la locomoción (Cazalets y cols., 2000). De hecho, en ratones carentes del gen EphA4, un receptor de la familia de la efrinas, que es de suma importancia en las señales de guía molecular del tracto cortico espinal, se produce una coordinación sincrónica anormal. Estos resultados mostrados por Kullander y cols., en los que emplearon ratones carentes de gen EhpA4, tras administrar 7 μM de NMDA y 7 μM de 5-HT se produce una sobreexcitación recíproca, a lo que conlleva una coordinación sincrónica anormal como lo es la marcha del conejo, estos estudios permiten determinar que las vías serotonérgicas están involucradas en la modulación de los CPG's, ya que al verse modificadas por la falta del gen EphA4 durante el desarrollo, específicamente al reprimir sus proyecciones axonales a un lado de la médula espinal, afectan la coordinación contralateras de las cuatro extremidades (Coonan y cols., 2001; Kullander y cols., 2003; Khien y cols., 2006).

Los estudios *in vitro* han permitido analizar con detalle los factores génicos, de distintos grupos neuronales, así como de sus neurotransmisores y neuromoduladores sobre el patrón de los CPG's espinales, entre los cuales las monoaminas en general son fundamentales para producir movimientos rítmicos y alternantes entre los flexores y extensores en el ciclo locomotor (Guertin y cols., 2009). Es relevante que a la fecha no se hayan realizado estudios sobre el análisis sistematizado del patrón de la marcha en ratones o ratas mutantes de mielina con afectación a niveles espinales, del tallo cerebral o estructuras superiores del SNC.

Tabla 3. Resumen de los modelos *in vivo* para el estudio de los efectos de la serotonina y sus agonistas.

Animal	Nivel	Tipo	Sustancia	Respuesta	Referencia
Gato	Espinal bajo	Agudo	5-HPT i.v	Aumento del tono, mayormente flexor	Grillner y cols., 1974.
Gato	T_{13}	Crónico	5-HPT i.v	Modula la locomoción inducida por el ciclo ergómetro	Barbeau y cols., 1990.
Gato	T_{13}	Crónico	Quipazina i.p.	Modula la locomoción inducida por el ciclo ergómetro	Edgerton y cols., 1997.
Gato	C_1	Agudo	5-HPT i.v	Descarga rítmica	Miller y cols., 1975

Conejo	T_5	Agudo	5-HPT i.v	Movimientos espontáneos	Viala y cols., 1971.
Rata	T_{4-6}	Crónico	5-HTP i.p.	Actividad rítmica	Nozaki y cols., 1977.
Rata	T_5	Crónico	5-HTP i.p.	Aumento de la descarga tónica y fásica	Barbeau y cols., 1981.
Rata	$T_{5/6}$	Agudo	Quipacina s.c.	Actividad rítmica	McEwen y cols., 1997.
Rata	$T_{8/9}$	Crónico	Quipacina i.p.	Actividad rítmica	Feraboli y cols., 1999.
Mono	$T_{11/12}$	Agudo	5-HT i.t. NMDA	Se facilitaron los ritmos locomotores	Fedirchuk y cols., 1998.

Se muestra los modelos animales más representativos en los cuales fueron evaluados diferentes agentes serotonérgicos sobre la actividad de la serotonina en la locomoción. C= región cervical; T= región torácica; i.v.= vía intravenosa; i.p. = vía intraperitoneal; i.t.= vía intratecal; s.c.= vía subcutánea (Modificado de Schimidt y Jordan, 2000).

En 1996 Sevrin y Orlovskii describieron que con la estimulación eléctrica de una región que se encuentra entre el mesencéfalo y el romboencéfalo, se induce el patrón de la marcha en el gato descerebrado, esta área fue denominada región locomotora mesencefálica (MLR, de sus siglas en inglés), en esta zona se incluye el núcleo cuneiforme (NCf) y el pedúnculo pontino (NPP) principalmente (Shik y cols., 1966; Steeves y Jordan, 1984; Noga y cols., 2003). Noga y cols., demostraron que, en gatos descerebrados, las neuronas serotonérgicas ubicadas en los núcleos del rafé en las vías retículo-espinales (RS, de sus siglas en inglés) que inervan la médula espinal, son activadas durante la locomoción provocada por la MLR (Noga y cols., 2017). Así mismo, se ha demostrado que el NCf es el principal componente para inducir la locomoción. En ratones se ha empleado la optogenética de las neuronas glutamatérgicas del NCf, la cual

produce el inicio y la aceleración de la locomoción, mientras que el NPP, se obtuvo que está involucrado más en la marcha lenta y en la fase final del ciclo locomotor (Josset y cols., 2018). La evidencia de que las neuronas serotonérgicas activadas por la MLR y están a su vez, involucradas en los procesos locomotores, y que es la serotonina y sus agonistas los que pueden inducir actividades locomotoras en modelos *in vivo* e *in vitro*, ya que la activación de los CPGs se ha encontrado la participación de los receptores serotonérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT_7 (Slawínska y cols., 2014). Es relevante que en estos estudios hemos mostrado que tanto los receptores serotonérgicos 5-HT_{1A}, como los 5-HT_{2A} son capaces de modular el patrón locomotor en ratas *taiep* adultas, las cuales tienen tubulinopatía específica que les afecta su mielinización y como hemos mostrado recientemente en el cerebro y la médula espinal empleando resonancia magnética funcional (Garduno-Robles y cols., 2020).

El receptor a serotonina 5-$HT1_A$ ha sido de los más estudios para analizar cómo se comportan los procesos locomotores a nivel espinal, siendo el 8-OH-DPAT el agonista de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_7, el que ha mostrado que pude producir actividad del tipo locomotora en modelos de lesión medular (Antri y cols., 2002). Esto después ser administrado por vía i.p. o por vía i.t. en un modelo de lesión por contusión espinal, así como en ratones carentes del receptor 5-HT_7 (Antri y cols., 2002; Antri y cols., 2003; Antri y cols., 2005). También, se ha utilizado la buspirona, un agonista parcial de la dopamina y la serotonina, que al ser administrado en ratones espinalizados mejoró su recuperación locomotora (Jeffrey y cols., 2018), y recientemente se ha empleado en pacientes con lesión de la médula espinal, con una combinación de L-DOPA, carbidopa más buspirona llamado Spinalon ™, sin embargo, los resultados presentados indican que más del 60% de los pacientes con este tratamiento no se obtuvieron mejoras significativas (Radhakrishna y cols., 2017).

El sistema de registro empleado en este trabajo de tesis, tipo pasarela, nos permitió llevar a cabo un análisis detallado del ciclo locomotor, así como de la coordinación de la marcha en el mutante de mielina *taiep,* antes y después de la administración de drogas con acción específica sobre los sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos. Nuestros resultados muestran que el agonista específico para los receptores de la familia de dopaminérgicos

D2 el pramipexol produce una disminución de la duración de la fase de soporte en las extremidades posteriores (véase la Figura 20), sin cambios en la duración de la fase de soporte de las extremidades anteriores, esto se puede deber a que la desmielinización presente en el mutante de mielina afecta más a la región lumbo-sacra de la médula espinal (Lunn y cols., 1997; Garduno-Robles y cols., 2020).

Clarke y cols., (1991) realizaron un estudio con 40 ratas Sheffield hembra, en el cual mostraron que la fase de balanceo aumenta y la fase de soporte disminuye, siendo esta en proporción inversa a la velocidad (Clarke y cols.; 1991). Sin embargo, en animales con lesión medular las duraciones de las dos fases de la marcha se ven afectadas (Neuman y cols.; 2009). Estos datos indican que la hipomielinización inicial seguida de una desmielinización progresiva en la rata *taiep* (Couve y cols., 1992, Duncan y cols.; 1992, Krsulovic y cols.; 1999), son capaces de modificar los circuitos espinales que están involucrados con la generación y el mantenimiento de la locomoción, el cual puede ser restaurado parcialmente mediante la activación farmacológica de los receptores D2, e incluso pueden generar actividad semejante a la locomoción ficticia similar a lo obtenido en preparaciones espinales de rara neonata (Barriére y cols., 2004). De manera relevante cada sistema neuromodulador modificó de forma diferente los parámetros de la marcha, lo que implica que es posible activar al patrón generador del ritmo o el formador de patrones, o inclusive a tener algún efecto directamente en las motoneuronas.

La velocidad es un parámetro dinámico de la marcha mediado por el correcto funcionamiento de todos los procesos espinales relacionados con la locomoción (Danner y cols., 2017). El pramipexol disminuyó de manera significativa la velocidad de la marcha en la rata *taiep* y este efecto puede deberse a que la actividad de los receptores dopaminérgicos D2 están involucrados en la inhibición recíproca de las motoneuronas a nivel espinal (Allen y cols., 2011); de tal forma que, al activar dichos receptores aumenta el efecto de la inhibición recíproca entre los músculos antagonistas, lo que alarga la latencia de las fases entre los flexores y extensores y mejora el patrón locomotor disminuyendo la ataxia y mejorando la coordinación (Kelly y cols., 1998).

El acople entre las extremidades anteriores y posteriores en la marcha descrito en este trabajo como el índice de regularidad, aumenta tras la administración de pramipexol, estudios previos indican que el índice de regularidad es menor en la rata *taiep* respecto a la rata Sprague-Dawley (Rocha, tesis de maestría 2013). El uso de pramipexol a dosis bajas disminuye la actividad locomotora probablemente debido a la activación de los receptores D2 presinápticos (Lagos y cols., 1998). Lo que implica que la modulación a la baja producida por el pramipexol, tanto en la región locomotora mesencefálica, como en los CPGs espinales, permiten un mejor acople entre los circuitos neuronales que modulan los movimientos alternantes y estereotipados que caracterizan a la marcha, por ende, la coordinación mejora, independientemente de que la velocidad se vea disminuida. Este efecto se refiere a que el animal camina lento, pero mejora su coordinación entre las extremidades. Concordando con lo reportado por Popoli y cols., (1990) quienes utilizaron SCH-23390 y sulpiride, agonistas de los receptores D1 y D2 respectivamente, para disminuir las estereotipias producidas por la ataxia inducida por fenciclidina, obteniendo resultados satisfactorios. Adicionalmente, el pramipexol se ha utilizado para el tratamiento del síndrome de piernas inquietas (RLS, de sus siglas en inglés), un trastorno del sueño con alteraciones motoras, a fin de disminuir los signos motores, los resultados fueron satisfactorios con las dosis de 0.25 a 0.75 mg/Kg (Montplaisir y cols., 2002).

En estudios previos se ha mostrado que el agonista serotoninérgico para los receptores $5HT_{1A}$ como lo es el 8-OH-DPAT, produce un aumento en la actividad locomotora ficticia en el gato espinalizado, la lamprea o en la preparación de la médula espinal en la rata neonata (Dourish y cols., 1985; Wikström y cols., 1995; Landry y cols., 2006; Zhang y cols., 2000). En nuestros resultados del patrón de la marcha después de la administración sistémica del agonista serotonérgico, 8-OH-DPAT, produjo una disminución significativa en la fase de soporte en ambas extremidades y un aumento en la fase de balanceo (ver Figuras de la 31 a la 33).

Estudios de nuestro laboratorio indican que el mutante de mielina *taiep* presenta un aumento de la duración de la fase de soporte probablemente debido a la hipomielinización inicial seguido de una desmielinización progresiva, que afecta en mayor proporción a los tractos cortico-espinales (Lunn y cols., 1997; Rocha, tesis de maestría 2010); y la

activación de los receptores $5HT_{1A}$ puede ser el responsable de modular la salida del glutamato en las neuronas presinápticas o bien a la expresión de los receptores para el N-metil-D-aspartato (NMDA) en las neuronas postsinápticas (Cheng y cols., 1998; Yuen y cols., 2005), de esta forma podrá mejorar la sincronicidad entre las motoneuronas de los músculos agonistas y antagonistas permitiendo regularizar las fases de la marcha. De hecho, se ha mostrado que el 8-OH-DPAT también disminuye la duración de la fase de balanceo en modelos con lesión espinal por contusión y con sección medular completa (Antri y cols., 2002, 2005; Landry y cols., 2004). El desplazamiento y la velocidad no se ven modificados tras la administración de 8-OH-DPAT, esto es evidencia de que los receptores $5HT_{1A}$ podrían regular la coactivación intrínseca de las redes neuronales encargadas de generar los patrones en la marcha, de tal forma que las ratas son capaces de realizar un mayor número de pasos para desplazarse en una distancia dada, por ende, la cadencia se observa aumentada como se muestra en la Figura 34.

Se ha reportado que el uso de 8-OH-DPAT y de la quipacina, pueden mejorar la marcha cuando se realiza un protocolo de administración crónica en modelos de lesión medular espinal aguda producida por contusión o bien en animales crónicos producido por sección medular (Antri y cols., 2002, 2003 y 2005). En esta tesis hemos mostrado que la coordinación entre las extremidades mejora después de la administración sistémica por tres días de 8-OH-DPAT (véase la Figura 34), lo que nos permite concluir que el receptor para la serotonina subtipo $5HT_{1A}$ y probablemente el subtipo $5HT_7$ mejoran la respuesta de las redes neuronales para producir movimientos alternantes rítmicos, probablemente al modular la liberación de neurotransmisores o bien al activar sus receptores y su cadena de segundos mensajeros. En futuras exploraciones farmacológicas podremos determinar de manera específica sobre la marcha de este mutante con tubulinopatía.

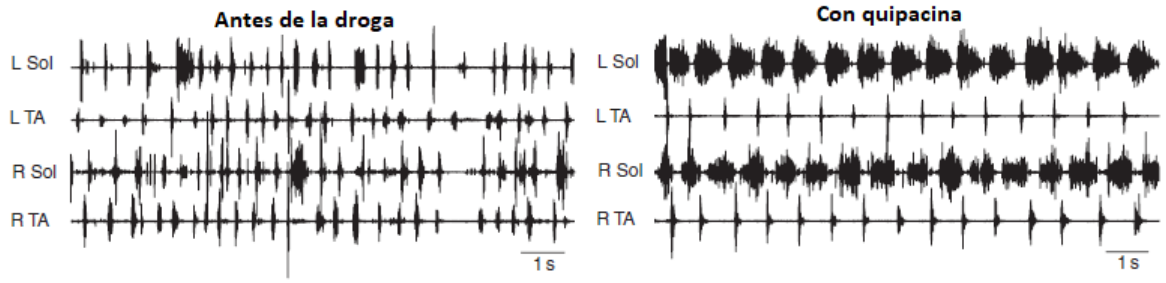

Figura 54. La coordinación intra e inter-extremidades mejora con la activación de los receptores serotoninérgicos postsinápticos 5HT2$_A$. Los registros fueron tomados con electrodos de EMG bipolares en el músculo tibial anterior y en el sóleo de ambas extremidades. Después de varias semanas, sin entrenamiento previo se colocó a la rata en una banda sin fin y se estimuló de forma nociceptiva la cola para provocar la marcha. La administración de quipacina a una dosis de 0.25 mg/Kg después de 30 minutos mejoro la actividad plantar en la fase de soporte ilustrado en la actividad del sóleo (Sol) (modificado de Jordan y cols., 2011).

El uso de la quipacina en la rata *taiep* disminuyó la duración de la fase de soporte y aumentó la velocidad de la marcha después de su administración por tres días. Estos resultados que se asemejan a los obtenidos en experimentos previos en modelos con lesión medular crónica, utilizaron la quipacina y estimulación eléctrica epidural (ES, de sus siglas del inglés), la quipacina a la dosis de 0.3 mg/Kg fue capaz de mejorar la coordinación entre las extremidades y amentar la velocidad de la actividad locomotora, por otra parte cuando se utilizó un tratamiento combinado con ES también mejoro la actividad plantar y la frecuencia de los paso (Ichiyama y cols., 2008*).* Estos resultados se interpretaron como que la quipacina elevo la excitabilidad de las motoneuronas de manera extrínseca o por medio de interneuronas al activar los receptores 5HT$_{2A}$. También se ha demostrado que la serotonina está involucrada con las propiedades de membrana de las neuronas, en los reflejos espinales y por lo tanto con la función locomotora (Schmidt y Jordan, 2000).

En la Tabla 2 se resumen los efectos encontrados con las tres drogas analizadas en este trabajo de tesis. Note que la quipacina mejora el índice de regularidad, la velocidad de la marcha y mejoro el área máxima de contacto de las extremidades anteriores; mientras que el 8-OH-DPAT aumenta el índice re regularidad y la cadencia. Finalmente, el pramipexol mejoró el área de contacto con el piso de la pasarela e incremento la cadencia.

Tabla 4. Efectos de los agonistas serotoninérgicos y dopaminérgicos en el patrón de la marcha adulta del mutante de mielina *taiep*

Fármaco	Receptor	Soporte	Balanceo	Longitud de zancada	Índice de regularidad	Cadencia	Velocidad	Área de contacto
Pramipexol	D2	↓	↓	↓	=	↑	↓↓	↑
8-OH-DPAT	$5HT1_A$	↓	↓	=	↑	↑	=	↓
Quipacina	$5HT2_A$	=	=	↓	↑	=	↑	↑↓

Cuadro comparativo del efecto del pramipexol, 8-OH-DPAT y quipacina en los parámetros de la marcha tras su administración sistémica en rata *taiep* de tres meses de edad. La flecha roja indica un descenso de los parámetros, la flecha verde indica un aumento de los parámetros evaluados y el signo de igualdad se refiere a que no se encontraron cambios significativos.

El agonista para los receptores setoninérgicos presinápticos, el 8-OH-DPAT, tuvo también efectos sobre la cadencia de la marcha y el índice de regularidad. Estos efectos se deben a los efectos moduladores de aferentes tegmentales o descendentes por ejemplo sobre los aferentes musculares del tipo II, que son modulados específicamente por interneuronas de este tipo de receptores con actividad serotoninérgica en la parte más profunda del cuerno dorsal (Jankowska y cols., 1995).

Por otra parte, en estudios de inmunohistoquimica se ha determinado que los receptores $5HT_{2A}$ están presentes por toda la médula espinal de la rata, pero en mayor proporción en la lámina IX donde se encuentra el mayor número de motoneuronas, y principalmente como receptores presinápticos tanto en las motoneuronas α como en las γ (Doly y cols., 2004). En base a lo anterior, la activación de los receptores postsinápticos $5\text{-}HT2_A$, seguramente localizados a nivel de las dendritas de motoneuronas espinales mejoran la regularidad entre las extremidades y la velocidad de desplazamiento en la pasarela, lo que es muy relevante porque puede ser aplicado tanto en procesos que alteran la mielina o en aquellos con lesión espinal, que también cursan con cambios en el grosor de la mielina (Von y cols., 2005, Landry y cols., 2004).

Debemos mencionar que recientemente se descubrió que las ratas *taiep* muestran una mutación puntual en el gen para la tubulina β 4A (Garduno-Robles y cols., 2020). Por lo que el mutante es entonces una tubulinopatía que afecta de manera específica a los oligodendrocitos, con acumulación de microtúbulos en los oligodendrocitos y sus procesos (Duncan y cols., 1992; Lunn y cols., 1997).

En base a lo anterior realizamos experimentos preliminares acerca del neurodesarrollo de la marcha en el mutante de mielina *taiep*, el registro fue realizado en la pasarela, y se utilizaron ratas *taiep y* Sprague-Dawley después del destete, del 21 a 28 DPN. Nuestros resultados muestran que en la fase de hipomielinización (Lunn y cols., 1997). Los sujetos machos disminuyen su velocidad significativamente con respecto a las ratas Sprague-Dawley (Eguibar y cols., aceptado para su publicación 2019, Elsevier Ltd), probablemente debido a que la hipomielinización que presenta la rata *taiep* desde el nacimiento afecta principalmente a los tractos de maduración tardía como se ha mostrado previamente (Lunn y cols., 1997).

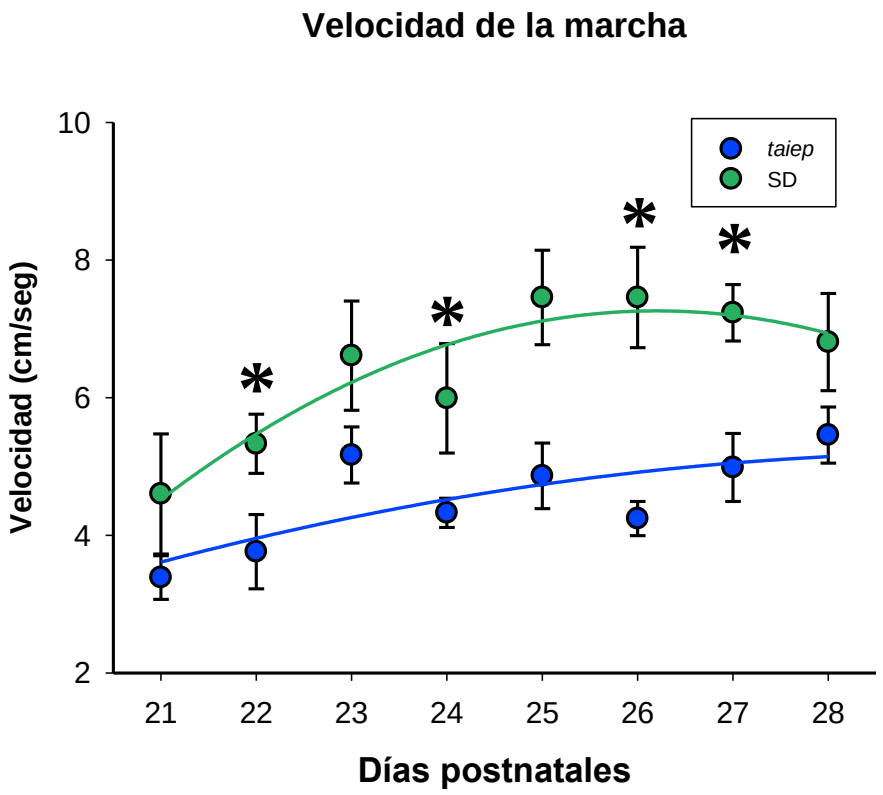

Figura 55. Velocidad promedio del ciclo de la marcha en ratas taiep del 21 al 28 DPN y controles Sprague-Dawley. Se ilustran las velocidades promedio de la primera semana después del destete. Note que la rata *taiep* deambula a menor velocidad con respecto al control en 22, 24, 26 y 27 DPN. La hipomielinización inicial del mutante de mielina, afecta las vías encargadas de la locomoción desde el primer mes de vida (Modificado de Eguibar y cols., aceptado para su publicación 2019, Elsevier Ltd).

Es claro que desde su descripción como mutante de mielina en 1989, la rata *taiep* tenía un predominio de signos motores dentro de los cuales la ataxia era conspicuo desde el segundo mes de vida en adelante. Para compensarlo las ratas *taiep* estáticas aumentan su base de soporte ampliando el ángulo de apertura de las extremidades posteriores (Powell y cols., 1999). No es hasta que Rocha (2010) que hizo una primera aproximación empleando la pasarela Catwalk de Noldus Technologies. Estos estudios iniciales mostraron que el mutante de mielina *taiep* a lo largo de los primeros seis meses de vida

deambulaba a menor velocidad que la rata Sprague-Dawley, el número de pasos por minuto es menor, el área máxima de contacto de las patas delanteras y traseras es menor, la fase de soporte y la fase de balanceo se encuentran aumentadas, así como la base de soporte y la distancia entre los dígitos todas las extremidades son menores respecto a su control. Las características en el aumento ambas fases y la base de soporte son similares a los modelos de lesión espinal por contusión en la fase de recuperación (Neuman y cols., 2009).

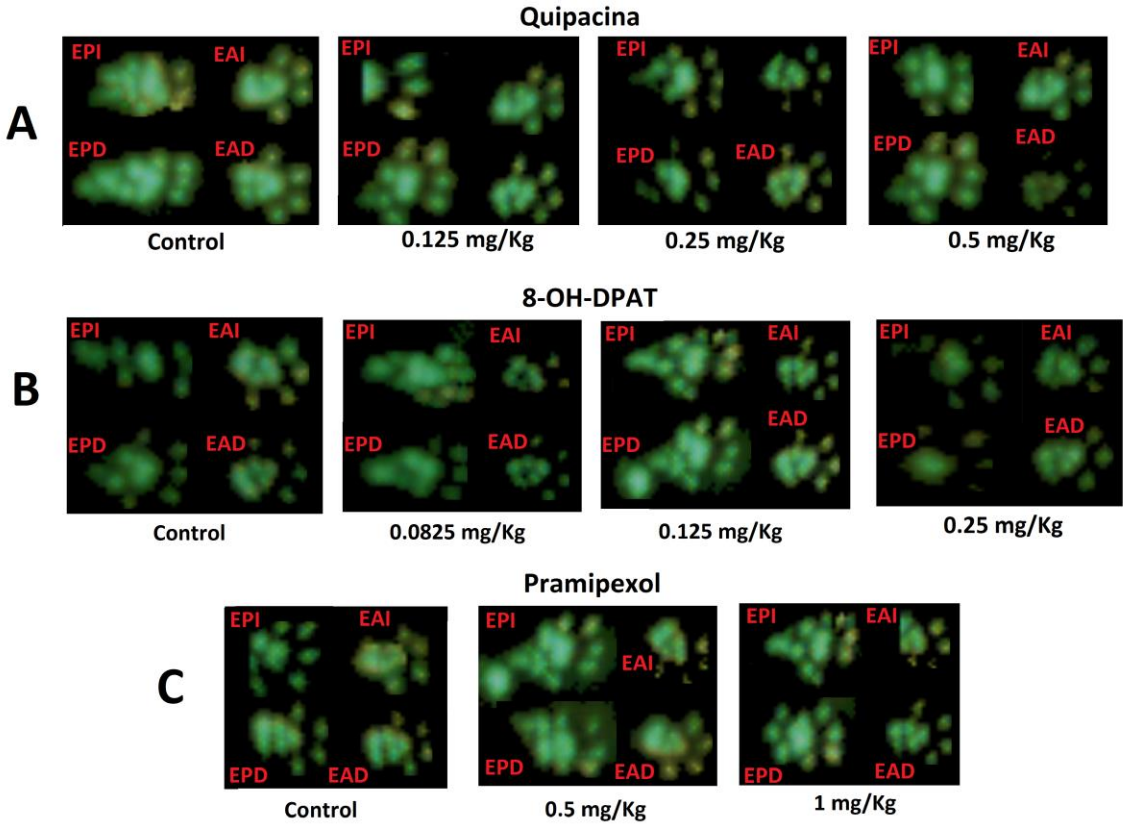

Figura 56. Imágenes representativas las huellas de las ratas taiep tras la administración del dopaminérgico pramipexol y los serotonérgicos 8-OH-DPAT y quipacina. A. Se ilustran la evaluación del área de contacto de las extremidades anteriores y posteriores en ratas *taiep* de tres meses de edad tras la administración de pramipexol a las dosis de 0.5 y 1 mg/Kg y el vehículo **B.** 8-OH-DPAT a las dosis de 0.0825, 0.125 y 0,25 mg/Kg y el grupo control **C.** Quipacina a las dosis de 0.125, 0.25 y 0.5 mg/Kg y grupo tratado con solución salina. EAI=extremidad anterior izquierda; EAI= extremidad anterior izquierda; EPD= extremidad posterior derecha; EPI= extremidad posterior izquierda.

Por otra parte, el mutante de mielina *taiep* cursa con un proceso de astrocitos reactiva y activación de óxido nítrico sintasa activando la caspasa-3 (León-Chávez y cols., 2001), y un aumento de algunas citosinas pro-inflamatorias. Es evidente que en toda la patología presente en el mutante de mielina *taiep* existe un componente neuroinflamatorio que afecta progresivamente a los procesos de reparación a la mielina. Se ha mostrado que la neuroinflamación contribuye a la patogénesis de múltiples enfermedades

neurodegenerativas como el Alzheimer, la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington entre otras. De hecho, algunas revisiones han descrito que evidencia ya sea por la observación de tejido patológico, aumento de citocinas pro-inflamatorias o algunos marcadores inflamatorios (Fiszer y cols., 2001; Navikas y cols., 1996; Mc geer y cols., 2001).

Es por eso que, en la última década ha aumentado el interés de los efectos beneficiosos de los antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs, de sus siglas en inglés), ya que hay informes que los NSAIDs no solo inhiben la ciclooxigenasa I y II (COX I y COX II), enzimas responsable de la producción de prostaglandinas, si no también tienen efecto en otras respuestas de la microglía como la liberación de citocinas pro-inflamatorias y agentes neurotóxicos como el NMDA, el glutamato, los iones de zinc entre otros (Flavin y cols., 1997; Hinson y cols., 1996; Combs y cols., 2000). El celecoxib y el rofecoxib, inhibidores de la COX II, ha sido los NSAID más estudiado para la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica, el problema de que los resultados carezcan de robustez es posiblemente porque la COX II está presente en el SNC principalmente en neuronas y no en la microglía (Hoozemans y cols., 2002).

Aunque no hay una cura para la esclerosis múltiple, existe un abanico de fármacos aprobados por la Agencia de Medicamentos y Alimentación, Estados Unidos de América. Para reducir la actividad y la progresión en pacientes con EM: el interferón beta-1a, acetato de glatiramer un competitivo de la proteína básica de la mielina, la mitoxantrona un inhibidor de las células T por la topoisomerasa II, el anticuerpo monoclonal natalizumab y el fingolimod un modulador de la esfingosina-1-fosfato (Marvin y cols., 2012). Los glucocorticoides han sido un tratamiento inicial por elección en la esclerosis múltiple, la razón es que estos fármacos tienen efectos neuroprotectores y antiinflamatorios, algunos de ellos como la metilprednisolona y la dexametasona son de amplio uso en casos de daño espinal (Golde y cols., 2003; Sloka y cols., 2005).

La metilprednisolona en altas dosis es el glucocorticoide de elección, es capaz de suprimir la expresión de la molécula de adhesión intracelular tipo 1 (ICAM 1, de sus siglas en inglés) en las células mononucleares sanguíneas y en menor expresión en el líquido céfalo-raquídeo, lo cual se traduce en que inhibe la capacidad de estas células de adherirse al endotelio y restringe su entrada al SNC. También, se ha observado un efecto de amortiguación de la cascada de citocinas pro-inflamatorios, inhibir la activación de las células T y facilitar la apoptosis de las células inmunes en el SNC (Noseworthy y cols., 2000. Sin embargo, se ha reportado alteraciones en el hígado con el uso crónico de este fármaco (Kupersmith y cols., 1994; Noseworthy y cols., 2000). En el laboratorio se realizó un trabajo para evaluar la marcha de la rata *taiep* de tres meses tras la administración sistémica de metilprednisolona como tratamiento agudo, sin que se obtuviesen cambios significativos en los sujetos de estudio (Domínguez-Hernández, tesis de maestría 2018). Es necesario analizar el efecto de los glucocorticoides en el mutante de mielina bajo administración crónica a nivel intratecal de forma crónica.

Estudios recientes reportan una similitud entre el mutante de mielina *taiep* y la leucodistrofia asociada al gen TUBB4A (Garduno-Robles y cols., 2020), esta leucodistrofia se caracteriza por presentar una hipomielinización o desmielinización con atrofia en los ganglios basales y el cerebelo (H-ABC) durante los primeros años de vida, esto permite utilizar al mutante de mielina como un modelo para su estudio (Eguibar y cols., aceptados para su publicación 2019, Elsevier Ltd; Garduno-Robles y cols., 2020), Sin embargo, Foote y Blakemore describen que para utilizar un modelo de estudio para las lesiones crónicas del SNC producidas por la esclerosis múltiple se requiere de cuatro aspectos esenciales: axones que permanezcan sin vaina de mielina durante un tiempo prolongado, se debe contar con células progenitoras de los oligodendrocitos (OPC's, de sus siglas en inglés) y ausencia de remielinización, los axones deben estar presentes en áreas que contengan astrocitos y finalmente ausencia de una inflamación aguda. (Foote y Blakemore., 2005). Estos datos permiten suponer que el mutante de mielina *taiep* no solo es un modelo adecuado para las adrenoleucodistrofias, también se puede utilizar para explorar las lesiones producidas por la desmielinización progresiva de la esclerosis múltiple y las alteraciones motoras que se presentan.

Conclusiones

1. La rata *taiep* es un modelo adecuado para el estudio de las patologías desmielinizantes crónicas como son la esclerosis múltiple primaria progresiva o las leucodistrofias, debido a que se puede hacer un análisis pormenorizado de la marcha, principal signo de discapacidad en los pacientes con patologías desmielinizantes.

2. Los resultados obtenidos con el agonista dopaminérgico de los receptores de la familia D_2, mostraron una mejora en el área máxima de contacto de las extremidades anteriores y de las extremidades posteriores.

3. Los resultados obtenidos con el agonista serotonérgico $5\text{-}HT_{1A}$ muestran una mejora en la coordinación de la marcha en la rata *taiep,* sin que se modifiquen la velocidad o la distancia entre los pasos.

4. Los resultados obtenidos con quipacina, un agonista $5\text{-}HT_{2A}$ mostraron una mejora en la velocidad de la marcha y en la coordinación entre las extremidades.

5. El sistema de registro del tipo pasarela es útil para el análisis de la marcha y para evaluar los efectos de drogas que impactan a los generadores centrales de patrones y los mecanismos que los regulan.

Perspectivas

A partir de los resultados y discusiones presentados en esta tesis de maestría, las perspectivas de trabajo son:

- En primer plano estarían los trabajos destinados a complementar de manera más detallada el actual estudio, acerca de la búsqueda de si el uso de medicamentos que mejoren la marcha.

- Utilizar un protocolo de administración crónica de serotonérgicos solos o combinados con dopaminérgicos tal como se ha usado en modelos con lesión medular, para dilucidar los efectos de estas drogas en las alteraciones motoras causadas por la desmielinización crónica.

- Realizar técnicas de inmunohistoquímica para analizar los receptores para dopamina D2 y para serotonina subtipos $5HT1_A$ y $5HT2_A$ en el mutante de mielina *taiep.*

- Realizar un conteo de citocinas en el sistema nervioso central del mutante de mielina *taiep,* en base a esto utilizar fármacos anti-inflamatorios como tratamiento complementario a los serotoninérgicos y dopaminérgicos para mejorar los parámetros de la marcha en este modelo animal.

- Realizar un estudio de las técnicas más utilizadas en los procesos de remielinización como lo es la terapia física y llevarlas a cabo en el mutante de mielina *taiep* como terapia conjunta de los serotoninérgicos para mejorar los parámetros de la marcha y la coordinación entre las extremidades.

Anexo

The myelin mutant *taiep* rat as a model for developmental brain disorders.

[1]

Correspondin

g author:

Professor

Jose R.

Eguibar

Behavioral Neurophysiological

Laboratory Institute of

Physiology

Benemérita Universidad

Autónoma de Puebla Av. San

Claudio # 6301

Col. San

Manuel

Puebla, Pue.

C.P. 72570

México

Telephone: +52 (222) 229 5500

Ext. 7331 Email:

jose.eguibar@correo.buap.mx

Professor Carmen Cortes:

Behavioral Neurophysiological

Laboratory Institute of

Physiology

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Av. San Claudio # 6301

Col. San Manuel

Puebla, Pue. C.P. 72570

México

Telephone: +52 (222) 229 5500 Ext. 7331

Email: carmen.cortes@correo.buap.mx

Juan C. Ahumada-Juárez.

Behavioral Neurophysiological Laboratory

Institute of Physiology

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Av. San Claudio # 6301

Col. San Manuel

Puebla, Pue. C.P. 72570

México

Telephone: +52 (222) 229 5500 Ext. 7331

Email: juan.ahumada@alumno.buap.mx

In Absentia Contact Person:

Ms. Claudia Herrejon

Research Office,

Vice-rectory of Research and Postgraduate Studies

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

México.

Telephone: +52 (222) 229 5500 Ext. 5737

Email: investigacioviep@gmail.com

Email: cl.herrejon@gmail.com

Abbreviated version of the title:

Taiep rats a brain development disorder.

Abstract.

Central nervous system (CNS) pathologies produced substantial health burdens because is the first cause of disability-adjusted life-years, but less is known about the burden of myelin diseases, among them leukodystrophies. The myelin-mutant *taiep* rat has a mutation in the TUBB4A gene which encodes β-tubulin 4A, primarily expressed in oligodendrocytes, and had an initial hypomyelination followed by a progressive demyelination of the CNS. The oligodendrocytes in *taiep* rats present an accumulation of microtubules in their cytoplasm and its myelin processes that disrupt transporting mechanisms, reducing protein and lipid contents on myelin sheets. We showed that *taiep* have similar weight, size, incisive emergence and opening of the eyes, as well as the righting reflex, cliff avoidance and negative geotaxia with respect to Sprague-Dawley rats. However, the speed of gait is significantly reduced in *taiep* from 21 to 28 days of age, supporting early alterations in locomotor mechanisms for this myelin-mutant with tubulinopathy.

Key words: Myelin, multiple sclerosis, leukodystrophy, demyelination, hypomyelination, axon, animal models, adrenoleukodystrophy, tubulinopathy, tubulin, locomotion, gait.

List of Abbreviations.

CNS central nervous system

PNS peripheral nervous system

SVZ subventricular zone

MBP myelin basic protein

qk quaking

ZFN zinc finger nucleases

TALENs transcription activator-like effector nucleases

CRISPR clustered regularly interspaced short palindromic repeats

Cas CRISPR-associated

PMD Pelizaeus-Merzbacher disease

MRI magnetic resonance imaging

HY high-yawning

MBP myelin basic protein

PLP proteolipid protein

MAG myelin-associated glycoprotein

MOBP myelin/associated oligodendrocytic basic protein

CNP 2’3’-cyclic nucleotide 3’-phosphodisterase

MT microtubules

ER endoplasmic reticulum

H-ABC hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum

DYT4

PND postnatal days

HLD6 hypomyelinating leukodystrophy 6

md myelin-deficient

sh pup shaking pup

pt paralytic tremor

jp jimpy

jp^{mld} myelin synthesis deficiency

jp ^{rsh} rumpshaker

1. Development of central nervous sytem.

Neurodevelopment is a reference for the somatic growth and maturation of neurons with various anatomical and physiological characteristics throughout the life. This is particularly useful when comparing animals with different genetic backgrounds that may affect the growth and neurodevelopment of either the CNS or the PNS, particularly with respect to myelin-sheats formation. Most of the studies about neurodevelopment alterations are directed towards toxicological effects induced by the exposure to metals, contaminants such as pesticides, air pollutants, etc. on neurons, but there are much less studies on evaluating weather glial cells play a critical role during development by offering physical support and guidance for new neurons reaching the target domains (Neman & de Vellis, 2008).

Oligodendrocytes are the myelin-forming cells of the CNS, and Schwann cells in the PNS. Myelin, which is essential for the normal functioning of the mammalian CNS, is a fatty insulation composed of modified plasma membrane that surrounds axons and promotes the rapid and efficient conduction of electrical impulses (i.e. action potentials). Many neurological diseases are caused by myelin deficiency, which can be the result of both genetic and environmental factors (Neman & de Vellis, 2008). There are several white matter disorders occurring during development, generally displaying hypomyelination or dysmyelination of the CNS. Deficiency of myelin may also occur after the maturation of the postnatal brain through a degenerative process resulting in demyelination (Neman & de Vellis, 2008). From the development point of view, oligodendrocytes originate in the ventral spinal cord or ventral telencephalon

and form the so-called glial-restricted precursor cells that differentiated into both, oligodendrocytes and astrocytes. There is a second source of glial cells from the dorsal region of the spinal cord or the telencephalon, and importantly the neuroepithelium, which gives rise to the SVZ participating in the secondary proliferative population of neuronal and glial cells. Progenitor cells may be specified to become glia, migrate radially from the SVZ into the subcortical white matter in the corpus callosum, striatum and cerebral cortex, where they differentiate into astrocytes and oligodendrocytes (Marshall, Suzuki & Goldman, 2003). Additionally, oligodendrocytes continue to be produced in the adult brain and participate in myelin repair (Chari & Blakemore, 2002). Therefore, the possible alterations of myelin during development can affect the normal production of glial cells, oligodendrocyte-sheath formation, and its maturation processes.

2. Animal models of myelin diseases.

Until now, there are few available animal models on which specific glial lineage cells are affected, among them the oligodendrocytes that are responsible to form myelin in the CNS. In the case of oligodendrocytes there is a large group of X-linked myelin mutations in humans characterized by the Pelizaeus-Merzbacher disease, and animals models in dogs: the shaking pup (sh pup), in pigs: the type III hypomyelinogenesis congenita, in rats: the myelin-deficient (md), in rabbits: the paralytic tremor (pt), and in mouse: jimpy (jp) and its alleles, myelin synthesis deficiency (jp^{mld}) and rumpshaker (jp^{rsh}) mice (Csiza & de Lahunta, 1979; Nussbaum, Neskovis & Kostic, 1969). Among these mutants, the md rat and the

jimpy mouse had a short life-span due to the severity of myelin loss, however in the case of the shaking pup, pt, and the rumpshaker mouse have more myelin amounts and therefore a longer lifespan (Duncan, 1995; Sidman, Dickie & Appel, 1964). Another group of myelin mutant are autosomal recessive, and they are a heterogenous group including the *shiverer* mouse which has mutations on the structural gene myelin basic protein (MBP. These mutations result in the absence of MBP in the case of *shiverer* mutant, and very low levels in the myelin deficient mutant *shiverer*^{mld} (Mikoshida, Aruga, Ikenaka, Okano & Maternson, 1992).

The *quaking* (qk) mouse has an autosomal recessive mutation, and after the second week of age they shake their trunk, accentuated when the animal explore, the tremor is most marked in the caudal part of the trunk and proximal portion of the hind limbs, consequently the mouse appears to be bouncing on its haunches (Fagg, 1979; Sidman, Dickie & Appel, 1964), or the twitcher mouse a model of hereditary leukodystrophy (Duchen, Eicher, Jacobs, Scaravilli & Teixeira, 1980). The myelin deficient *Syrian* hamster has an autosomal recessive inheritance with a trembling involving the trunk and the hindquarters, and a marked myelin deficiency in the CNS (Nunoya, Takima, Mizutami & Umezawa, 1985; Redhead & Hood, 1990). Another autosomal recessive mutant are the *taiep* rats, which had a progressive motor syndrome characterized by tremor when reaching the first month of age, followed by ataxia at 4 months, immobility episodes that start at 6 months, and present a peak between 8 to 9 months of age, epilepsy and hind limb paralysis (Holmgren, Urbá-Holmgren, Riboni & SaenzdeMiera., 1989; Cortes, Gavito, Ita, Valencia & Eguibar, 2005; Eguibar, Cortés, Ugarte & León-Chávez, 2014).

The above animal model descriptions are based on the reports about inheritance, morphological characteristics in the CNS, and in some of them, electrophysiological recordings. However, little is known about the associated neurodevelopmental characteristics.

3. Different paths to obtain myelin mutants.

In the case of mice, there are several genetically-modified animals, such as: knockout, knock-in, or those that are modified using Cre-Lox recombination as a site-specific recombinase technology. They may have deletions, insertions, translocations and inversions at specific sites in the DNA sequence of CNS cells, including oligodendrocytes and other glial cells. Currently there are four major classes of engineered nucleases employed for genome editing purposes: zinc finger nucleases (ZFN), transcription activator-like effector nucleases (TALENs), engineered meganucleases, CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) and CRISPR-associated (Cas), that allow RNA-guided Cas9 endonuclease to modify the expression of specific genes (Willen, 2003). However, in most of them there are few studies describing development and neuromaturation of their reflex activities. However, these group of genetical manipulated mice usually have several alterations, mainly because the modified genes are expressed in different tissues, including neurons and glial cells.

Hence, the heterogenous group of myelin mutants that only affect the central nervous system (CNS) represent better animal models with specific alterations in

myelin and lipid-proteins, among them, leukodystrophies a heterogeneous group of white matter disorders exclusively affecting the CNS. They mimic equivalent human illness, usually present in infancy or childhood, that frequently lead to early death and rarely in adulthood but all them show a progressive disorder associated to myelin dysfunction. Importantly, the genetic basis, clinical manifestations and pathological landmarks are heterogeneous, including myelinated axons that never get ensheathed or an unbalance between demyelination and different degrees of remyelination (Duncan, Kondo & Zhang, 2011; Love, 2006; Ohno & Ikenaka, 2019).

4. Leukodystrophies.

In humans there are four groups of leukodystrophies: 1) Pelizaeus Merzbacher disease (PMD); 2) Krabbe disease; 3) Metachromatic leukodystrophy; and 4) adrenoleukodystrophy. The PMD is characterized by a duplication of the *plp1* gene and has two variants; one is a severe disorder with early death, the so-called connatal form, or the classical form in which the myelin deficit is not as severe and therefore life expectancy is longer that the former (Hodes, Woodward & Spinner, 2000). Krabbe is an autosomal recessive demyelinating disease caused by a genetic deficiency in the activity of the enzyme galactocerebrosidase. In base of that, it is classified as a lysosomal storage disease, where the main cause of demyelination is the accumulation of psychosine, a cytotoxic lipid metabolite that accumulates and appears to selectively kill oligodendrocytes and Schwann cells, leading to rapid

demyelination (Wenger, Suzuki, Suzuki & Suzuki, 2001). Metachromatic leukodystrophy is an autosomal recessive disorder resulting from a mutation of the *arylsulfatase* A gene, which leads to profound demyelination of the central and peripheral nervous system. There are several clinical forms of the disease with infantile, juvenile and adult stage onset. The knockout mouse of the *arylsulfatase* gene only shows scattered demyelination and did not reproduce exactly the human disease (Hess, Saftig, Hartman, Coenen, Lullmann-Rauch, Goebel, Evers, et al., 1996). Finally, adrenoleukodystrophy, the most common leukodystrophy in children, results from a mutation in the peroxisomal membrane gene ABCD1. The disease is striking on regards to its phenotypic variation, one of them with a profound subcortical demyelination associated with marked inflammation and early onset in childhood. In contrast, the adult onset phenotype called adrenomyeloneuropathy has prominent long-tract degeneration in the spinal cord but not a prominent demyelination. Importantly, knockout mouse strategies had failed to yield an accurate model with similar characteristics observed in the human pathology (see Table 1; Dubois-Dalcq, Feigenbaum & Auborug, 1999).

5. Tubulinophaties and leukoystrophies.

Recently, and due to better magnetic resonance imaging (MTI) techniques in association with detail genetic analysis, clinicians have been able to stablish relationships between clinical signs and symptoms in patients with specific

alterations in the CNS using MRI and complementary gene analysis. Therefore, during the last decade there are some reports which stablish a clear association of hypomyelination leukodystrophy with several different mutations in the TUBB4A gene (Purnell, Bleyl & Bonkowsky, 2014; Tonduti, Aiello, Renaldo, Dorboz, Saaman, Rodriguez, Fettah, et al., 2016); a hypomyelination that mimics PMD (Shimojima, Okumura, Ikeno, Nishimura, Saito, Saitsu, Matsumoto et al., 2015); or dystonia-4, an autosomal dystonia that it is characterized by a progressive laryngeal dysphonia associated with two missense mutations of the *tubb4a* gene (Watanabe, Itakaoka, Seki, Morimoto, Homma, Miyamoto & Yamauchi, 2018).

In human tubulinopathies there are mutations causing dysfunction of the tubulins and microtubule associated proteins. Most of them described as cause leading to complex brain malformations, such as dysmorphic basal ganglia (75% of cases), callosal dysgenesis, cerebellar hypoplasia/dysplasia and cerebral cortex malformations (Gonçalves, de Andrare, Freddi, Taranath, Laksmanan, Goetti, Feltrin et al., 2018). Tubulins are structural subunit-proteins that form the microtubules and represent a protein superfamily in eukaryotic cells including α, β, γ, δ ξ, and a sixth family called ζ tubulin (McKean & Vaughan, 2011). The α, β and γ tubulins are ubiquitous and present in all nucleated cells organisms. Microtubules are primarily formed from heterodimeric tubulins, consisting of α, and β tubulin polypeptides, and they are assembled in a head-to-tail heterodimer organization (McKean & Vaughan, 2011). The spectrum of tubulinopathies includes patients with TUBA1A, TUBB2B, TUBB2A, TUBB3, TUB4A, DYNCH1H1 and TUB8ADCX mutations, all them causing either developmental malformations or degenerative changes in different cell types

of the CNS (Curiel, Liu, Bugaighis, Fu, Nmezi, Rodriguez Bey & Padiath, 2017). These problems include microcephaly, ventriculomegaly, callosal agenesis/dysgenesis, brainstem hypoplasia, and cerebellar and vermian hypodysplasia, among other neuroimaging findings (Gonçalves, et al., 2018).

The case of TUBB4A represents an exception, being it directly associated to hypomyelination and/or a demyelination, being hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum (H-ABC) the main anatomopathological finding. These conditions caused by TUBB4A mutations have the most profound effects on CNS white matter, and even myelin degeneration during childhood. H-ABC have been found to be responsible from hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum (H-ABC). This inborn leukodystrophy is characterized by a combination of defective myelination/cerebellar-neostriatal atrophy, as observed by magnetic resonance imaging (MRI) scans, and a complex neurological phenotype, including delayed motor development, intellectual disability, extrapyramidal movement abnormalities, ataxia and spasticity (Zech, Boesch, Jocim, Graf, Lichtner, Peters, Gieger, et al., 2015).

Other mutations in the TUBB4A gene also produce hereditary isolated dystonia (DYT4), displaying considerable phenotypic variability, ranging from focal/segmental to severe dystonia, with prominent laryngeal involvement and a missense mutation in the TUBB4A mutation. These pathologies are well in accordance with the prominent role played by tubulins in brain development through neuronal genesis and migration, cortical organization, and in axon guidance (Breuss, Leca, Gstrein, Hansen & Keays, 2017).

6. *Taiep* a myelin mutant a model of leukodystrophy.

We obtained as a spontaneous mutation in the process of inbreeding to obtain a SD rat with a high-yawning (HY) frequency (Urbá-Holmgren, Trucios, Holmgren, Eguibar, Gavito, Cruz & Santos., 1990). The myelin mutants develop a progressive motor syndrome characterize by tremor, ataxia, immobility episodes, epilepsy and paralysis, the acronym of these symptoms given is name *taiep* (Holmgren et al., 1989). They had an initial hypomyelination, followed by a progressive demyelination in the CNS (Duncan, Lunn, Holmgren, Urbá-Holmgren & Brignolo-Holmes, 1992). The myelin alterations are due to an abnormal accumulation of microtubules in oligodendrocytes that disrupt transporting mechanism from endoplasmic reticulum, to the Cis portion of Golgi apparatus (Couve, Cabello, Krsulovic & Roncagliolo, 1997). So, all myelin proteins MBP, PLP, MAG, MOBP and CNP decreased with the age as well as lipid content in different structures of the brain and the spinal cord on *taiep* rats (Möller, Durr, Quarter & Duncan, 1997; Eguibar, Cortés, Lara-Lozano & Mendiola, 2012).

At the structural level, *taiep* rats have an accumulation of microtubules (MT) physically-bound to the endoplasmic reticulum in the cytoplasm of their oligodendrocytes (Couve et al., 1997). It is well stablished that microfilaments and MT are essential for maintaining anterograde transport of proteins and lipids. In fact, stable MT are fundamental to maintain the highly polarized morphology of the

oligodendrocytes (Song, Goetz, & Baas, 2001). When the *taiep´s* oligodendrocytes were plated, microtubule associated proteins MAP1b and *tau* were higher with respect to those levels obtained from oligodendrocytes isolated from control SD rats (Song, O´Connor, Yu, Baas & Duncan, 1999). In addition, tightly-bundles of MT and counterclockwise-hooked are statistically higher in cultured oligodendrocytes with respect to those obtained from SD rats (Song et al., 1999; Eguibar et al., 2014), that disrupts the transporting of PLP protein, or MBP mRNA that can be reversed by nocodazole, a MT disassembling drug, or by inhibiting dynein-activity by specific antibodies (Song, Carson, Barbarese, Li & Duncan, 2003).

Electrophysiologically, *taiep* rats showed progressive deterioration of auditory brainstem responses along their postnatal development (Roncagliolo, Benítez & Eguibar, 2000). Importantly, optic nerves from *taiep* rats showed a significant reduction on the amplitude for compound actions potentials, and a diminution of their conduction velocity with the age of the animals (Roncagliolo, Schlageter, Leon, Couve, Bonansco & Eguibar, 2006). Demyelination is concomitant to reactive astrocytosis, and the activation of nitric oxide synthase (León-Chávez, Guevara, Galindo, Kuna, Ugarte, Villegas, Mena et al., 2001; León-Chávez, Aguilar-Alonso, González-Barrios, Eguibar, Ugarte, Brambila, Ruíz-Argüellez et al., 2006), which are able to stimulate lipoperoxidation and activate caspase-3, leading to an increase in the degeneration of myelin, but paradoxically also to activate CNS repair mechanisms (Soto-Rodriguez, Martínez-Fong, Arroyo, Aguilar-Alonso, Rubio, Eguibar, Ugarte et al., 2012).

Recently, it has been demonstrated a single point mutation in Tubb4a

(p.Ala302Thr) was found in homozygous *taiep* samples, being the first animal model of TUBB4 mutations used as an experimental model for adrenoleukodystrophy (Duncan, Bugiani, Radcliff, Moran, Lopez-Anido, Duong, August et al., 2017).

7. Developmental characteristics of *taiep* rats.

The main allometric characteristic of the *taiep* rat is the weight, which normally increases along the first stages in the lactation period. Results in our laboratory showed that there are not significantly differences between *taiep* animals with respect to SD rats, with similar weight increments per day of around 1.4 ± 0.2 grams between 3 to 15 postnatal days (PND) and around 5.4 ± 0.3 grams between 30 to 40 PND, resulting in similar body weights in both groups(see Table 2). Comparable results were obtained in the size of the subjects (data not shown) supporting SD are allometrically like *taiep* rats. Development characteristics are based on the day that the pups open their eyes, *taiep* opened their eyes between 13 to 15 PND, in the case of SD between 14 to 15 PND (Table 3). The age when a superior incisive eruption happened was also similar in both groups of animals varying between 6 to 8 PND (see Table 4). These results clearly showed that *taiep* rats, a myelin-mutant model with leukodystrophy, has similar maturational processes as control SD rats during the first 15 days of life.

To measure the brain neurodevelopment process on SD and *taiep* pups, we measure reflex responses, such as surface righting, cliff avoidance and negative

geotaxis. Surface righting reflex is time that the pup spent when the neonate was placed in a supine position, and immediately turns over to restore its normal prone position by touching all the four paws with the plane surface, we measured the time taken to restore the prone position from 3 to 6 PND. The percentage of subjects that executed the reflex successfully were similar in both groups of rats in the time needed to recover the prone position (data not shown). In the case of the cliff avoidance test, the rats displayed risk assessment behaviors by avoiding the cliffs and heights. Cliff avoidance reflex was evaluated in the pups from 3 to 10 PND placed the pups on the edge of a wooden box, with nose and forepaws touching just over the edge. The time taken by the subjects to avoid the cliff and turn backwards was recorded, all rats were capable to do so (see Table 5).

Negative geotaxia is a test considered as a diagnostic response for vestibular and/or proprioceptive function, being an automatic postural reaction by turning upright in an inclined plane test. We used a wooden board with rough surface that was inclined 25°, and the pups were placed on it with their snout downwards. The time taken to perform 180° rotation was recorded (Naik, Patro and Patro, 2015). The responsiveness for the execution of the negative geotaxia was similar in both groups of rats between 3 to 15 PND between both groups of rats (see Table 6).

8. Developmental of gait in *taiep* rats.

We measured gait since weaning day 21 to 28 PND in order to measure the ontogeny of locomotion in both groups of rats using the CatWalk system (Noldus Technologies, The Netherlands). The speed of gaiting in *taiep* rats was significantly lower with respect to Sprague-Dawley rats (see Figure 1; RMANOVA, $F_{(1,7)}=57.9$; $P\leq 0.002$, followed by Bonferroni test $P\leq 0.05$). These results further imply that since the early stages of development, central pattern generators in the spinal cord may be affected by hypomyelination in this structure and corresponds with anatomical data showing that dorsal columns and corticospinal spinal tracts are more affected than ventral columns in the myelin mutant (Lunn, Clayton & Duncan, 1997).There are only few reports about myelin-mutant mice on which authors analyze development characteristics. This is a relevant point because it allows to determine coherent and well-organized body and CNS growth and function. In fact, from the medical point of view, it is well stablished that allometric and reflex activity have prediction value for the future neurodevelopment characteristics.

9. Future trends in myelin diseases.

In conclusion animal models are fundamental tools for the analysis of normal and altered myelin sheaths, particularly during demyelination associated or not to neuroinflammation because general evolution of the diseases are characterized by progressive deterioration of different sensory, motor, or neuro-cognoscitive capabilities until death of the patient. The models are also useful to determine the

value of an early intervention through physical therapy, the therapeutic use of different pharmacological, even immunological or even genetic approaches, Gene therapy strategies have been developed to tackle leukodystrophies using hematopoietic stem cells (HCT) or allogeneic HCT produced a mild improvement in patiens. Another approaches including the use of human immunodeficiendy virus type 1 (HIV)-derived lentiviral vectors that allow more efficient gene transfer into HCT than murine gamma-retroviruses, or even intracerebral injections of adeno-associated virus using as a vector to target mainly neurons, Currently there are clinical trials in X-linked adrenoleukodystrophy and several genetic therapies in mouse models (Biffi, Aubourg & Cartier, 2011). It is clear that soon gene therapy could be an adequate way to treat myelin and other CNS diseases.

Applications to Other Areas of Development

In this chapter we reviewed some of the most relevant developmental characteristics of myelin mutants, and particularly tubulinopathies in humans. Leukodystrophies are a heterogenous group of diseases with different genetics backgrounds and are grouped in four diseases: 1) Pelizaeus Merzbacher disease (PMD); 2) Krabbe disease; 3) Metachromatic leukodystrophy; and 4) adrenoleukodystrophy. Recently, there are several reports involving several mutations in the TUBB4A gene, leading to several clinical illnesses such as hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum (H-ABC), dystonia type 4 (DYT4-isolated dystonia) or

hypomyelinating leukodystrophy 6 (HLD6). Recent availability of resonance imaging techniques, associated with genetic analysis and molecular biology techniques, have allowed to detect different causes and provide a detailed clinical characterization of different diseases, and further the reproduction of the syndromes in animal models, particularly in genetic modified mice.

So far, the best available model for TBB4A tubulinopathy are the *taiep* rats, a Sprague-Dawley derived animal model with hypomyelination, followed by progressive demyelination in the central nervous system clinically resembling adrenoleukodystrophy. As previously mentioned, *taiep* is the acronym of the motor syndrome that characterize them: tremor, ataxia, immobility episodes, epilepsy and paralysis. These mutants do not present delayed maturation of the morphological characteristics such as: body weight, size, incisor eruption, and eye opening. Furthermore, neurologically the *taiep* rats show normal reflex maturation determined by righting reflex, cliff avoidance and negative geotaxia tests, thus indicating that maturation processes are normal, instead of the hypomyelination of the central nervous system observed in the human condition. Nonetheless, gait analysis uncovers a significant reduction in the speed of locomotion, suggesting an alteration at the spinal cord level in this leukodystrophy model. This is quite relevant because in the four leukodystrophies reported for gait alterations in humans, such as muscle tone changes and ataxia are remarkable signs and can be of clinical relevance for new therapies. Genetic analysis provides a possibility for early detection and concomitantly gene therapy treatments using different genetic, viral or stem cell options.

Mini-Dictionary of Terms (10-15 explanations of important terms, phrases or words)

Myelin: An insulation made by specialized cells that covers axons in order to avoid short circuits

Demyelination: A progressive loss of the myelin sheath.

Dysmyelination. An abnormal formation of the myelin sheath during development.

Gait: The motor organization for alternation during walking patterns,

Multiple sclerosis: The most frequent myelin disease characterized by an area or areas in the central nervous lacking myelin

Adrenoleukodystrophy: A central nervous system disease with a progressive loss of the myelin sheath in axons due to an accumulation of long chain fatty acids.

Animal models: An experimental group of laboratory animals that have similarities with actual human conditions, and further help to test new therapeutic approaches.

Tubulinopathy. A group of genetic diseases that had a mutation in one of the protein subunits that conform microtubules.

Leukodystrophies. A group of diseases with a hypomyelination or demyelination of the central nervous due to different genetic backgrounds.

Pelizaeus-Merzbacher disease. A central nervous disorder that is characterized by alterations in coordination, motor skills, and learning due to an inability to form myelin.

Krabbe disease. Called also globoid cell leukodystrophy or galactosylceramide lipidosis produced a progressive damage of the nervous system and early death

Key Facts of myelin *taiep* rats. (5-10 sentences in bulleted format).

- *Taiep* rats are an adequate model of myelin diseases because they have an initial hypomyelination followed by a progressive demyelination.
- Myelin disease represents 5% of the total central nervous diseases.
- Adrenoleukodystrophies are a heterogenous group of myelin diseases characterized by hypomyelination and/or demyelination.
- Leukodystrophies are myelin diseases with different clinical evolutions, and *taiep* rats showed some of their clinical and radiologic characteristics.
- There are not adequate treatments for the disease, and therefore animal models are extremely important for testing new options.
- Human leukodystrophies are characterized by the loss of myelin and associated demyelination.

Summary Points.

- This chapter focuses on myelin diseases, which are a large group of illnesses that affect the insulation system of the axons.
- *Taiep* rats are an animal model for myelin disease with an initial hypomyelination followed by a progressive demyelination.
- *Taiep* rats develop a locomotor syndrome associated to the progressive demyelination of the central nervous system.
- The therapeutic options for the treatment of myelin diseases are still limited, and animal models are the best option to evaluate new therapies.
- *Taiep* rats is a myelin mutant of TUBB4A gene similar characteristics of human leukodystrophies.
- Animal models of myelin are fundamental to test new therapeutic options because there are not adequate treatments.
- Gene therapy require adequate animal models of human diseases.

Title and Legends to all Tables and Figures.

Figure 1: Speed of gait in the first week after weaning in *taiep* and Sprague-Dawley rats. Detailed analysis of the velocity of gait in the first week after weaning show that *taiep* have significantly lower speed, measured in the CatWalk, being significant at 22, 24, 26 and 27 days of age with respect to SD rats (RMANOVA, $F_{(1,7)}=57.9$, $P \leq 0.002$, followed by Bonferroni test, $P \leq 0.05$)

Table 1. Animal models of leukodystrophies and the corresponding human diseases.

Table 2. Body weight on Sprague-Dawley and *taiep* rats during lactation.

Table 3. Percentage of eye-opening in Sprague-Dawley and *taiep* pups.

Table 4. Postnatal eruption of incisive teeth on Sprague-Dawley and *taiep* pups.

Table 5. Postnatal display of complete cliff avoidance on Sprague-Dawley and *taiep* pups.

References.

1. Biffi A., Aubourg O., Cartier N. (2011). Gene therapy for leukodystrophies. *Human Molecular Genetics*, 20, R42-R53.

2. Breuss, M. W., Leca, I., Gstrein, T., Hansen, A. H.,& Keays, D. A. (2017). Tubulins and brain development–The origins of functional specification. *Molecular and Cellular Neuroscience, 84,* 58–67.

3. Chari D.M., & Blakemore W.F. (2002). Efficient recolonization of progenitor-depleted area in the CNS by adult oligodendrocyte progenitor cells. *Glia*, 37, 307-313.

4. Cortes, M. C., Gavito, B., Ita, M. L., Valencia, J., & Eguibar, J. R. (2005). Characterization of the spontaneous and gripping-induced immobility episodes on *taiep* rats. *Synapse, 58*, 95-101.

5. Csiza, C. K., & de Lahunta, A. (1979). Myelin deficiency (md): a neurologic mutant in the Wistar rat. *The American Journal of Pathology, 95*, 215-224.

6. Curiel, J., Liu, J., Bugaighis, M., Fu, X., Nmezi, B., Rodríguez Bey, G., Padiath, Q., et al. (2017). TUBB4A mutations result in specific neuronal and oligodendrocytic defects that closely match clinically distinct phenotypes. *Human Molecular Genetics, 26,* 4506–18.

7. Couve, E., Cabello, F., Krsulovic, J., & Roncagliolo, M. (1997). Binding of microtubules to transitional elements in oligodendrocytes of the myelin mutant *taiep* rat. *Journal of Neuroscience Research, 47*, 573-581.

8. Dubois-Dalcq M., Feigenbaum V., & Auborug P. (1999). The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. *Trends in Neuroscience*, 22, 4-12.

9. Duchen, L. W., Eicher, E. M., Jacobs, J. M., Scaravilli, F., & Teixeira, F. (1980). Hereditary leukodystrophy in the mouse: the new mutant twicher. *Brain, 103*, 695-710.

10. Duncan, I. D., Lunn, K. F., Holmgren, B., Urbá-Holmgren, R., & Brignolo-Holmes, L. (1992). The *taiep* rat: A myelin mutant with an associated oligodendrocyte microtubular defect. *Journal of Neurocytology, 21*, 870-884.

11. Duncan I. D. (1995). Inherited disorders of myelination of the central nervous system. In H. Kettenmann & B. R. Ranson (Eds.), Neuroglia (990-1009). New York: Oxford University Press.

12. Duncan I. A., Kondo Y., & Zhang S. C. (2011). The myelin mutants as models to study myelin repair in the leukodystrophies. *Neurotherapeutics, 8*, 607-624.

13. Duncan I.D., Bugiani M., Radcliff A.B., Moran J.J., López-Anido C., Duong P., August B.K., Wolf N.I., van der Knaap M.S., & Svaren J. (2017). A mutation in the Tubb4a gene leads to microtubule accumulation with hypomyelination and demyelination. *Annals of Neurology*, 81, 690-702.

14. Eguibar, J. R., & Cortes, M. C. (2010). The myelin mutant *taiep* as a model for absence crisis. *Gaceta Médica Mexicana, 146*, 12-18.

15. Eguibar, R. J., Cortes, M. C., Lara-Lozano M., & Mendiola D.M. (2012). Dopaminergic D2-like agonists produce yawning in the myelin mutant *taiep* and Sprague-Dawley rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 102, 118-123.

16. Eguibar, R. J., Cortes, M. C., Ugarte, A., & León-Chávez, A. (2014). The myelin mutant rat taiep as a model of neuroimmunological disease. *Advances in Neuroimmune Biology, 5*, 9–17.

17. Fagg G.E. (1979). The quaking mouse: Regional variations in the content and protein composition of myelin isolated from the central nervous system. *Neuroscience*, 4, 973-978.

18. Gonçalves, F. G., Freddi, T. L., Taranath, A., Lakshmanan, R., Goetti, R., Feltrin, F. S., Mankad, K., Teixeira, S. R., Hanagandi, P. B., & Arrigoni, F. (2018). Tubulinopathies. *Topics in Magnetic Resonance Imaging* 27, 395-408.

19. Hess B., Saftig P., Hartmann D., Coenen R., Lullmann-Rauch R., Goebel H.H., Evers M., von Figura K., D'Hooge R., Nagels G., et al: (1996). Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93, 14821-14826.

20. Hodes M.E., Woodward K., & Spinner N.B. (2000). Additional copies of the proteolipid protein gene causing Pelizaeus-Merzbacher disease arise by separate integration into the X chromosome. *American Journal of Human Genetics*, 67, 14-22.

21. Holmgren, B., Urbá-Holmgren, R., Riboni, L., & Vega-Saenz de Miera, E. C. (1989). Sprague Dawley rat mutant with tremor, ataxia, tonic immobility episodes, epilepsy and paralysis. *Laboratory Animal Science, 39*, 226-228.

22. Leon-Chavez, B. A., Aguilar-Alonso, P., Gonzalez-Barrios, J. A., Eguibar, J. R., Ugarte, A., Brambila, E., Ruiz-Arguelles, A., & Martinez-Fong, D. (2006). Increased nitric oxide levels and nitric oxide synthase isoform expression in the

cerebellum of the *taiep* rat during its severe demyelination stage. *Brain Research, 1121*, 221-230.

23. León-Chávez, B. A., Guevara, J., Galindo, S., Luna, J., Ugarte, A., Villegas, O., Mena, R., Eguibar, J. R., & Martinez-Fong, D. (2001). Regional and temporal progression of reactive astrocytosis in the brain of the myelin mutant *taiep* rat. *Brain Research, 900*, 152-155.

24. Love S. (2006). Demyelinating diseases. *Journal of Clinical Pathology*, 59, 1151-1159.

25. Lunn, K. F., Clayton, M. K., & Duncan, I. D. (1997). The temporal progression of the myelination defect in the *taiep* rat. *Journal of Neurocytology, 26*, 267-281.

26. Marshall C.A., Suzuki S.O., & Goldman J.E. (2003). Gliogenic and neurogenic progenitors of the subventricular zone: Who are they, where did they come, and where are they going? *Glia*, 43, 52-61.

27. McKean P.G., Vaughan S., & Gull K. (2001). The extended tubulin superfamily. *Journal of Cell Science*, 27, 395-408.

28. Mikoshiba, K., Aruga, J., Ikenaka, K., Okano, H., & Martenson, R. E. (1992). Shiverer and allelic mutant mld mice. In R.E. Matterson (Ed.), Myelin: Biology and Chemistry (pp. 723-744). Boca Raton: CRC Press.

29. Möller, J. R., Durr, P. G., Quarter, R. H., & Duncan, I. D. (1997). Biochemical analysis of myelin proteins in a novel neurological mutant: The *taiep* rats. *Journal of Neurochemistry, 69*, 773-779.

30. Naik A. A., Patro I. K., & Patro N. (2015). Slow physical growth, delayed reflex ontogeny, and permanent behavioral as well as cognitive impairments in rats

following intra-generational protein malnutrition. *Frontiers in Neuroscience, 9*, 18 pages.

31. Neman J., & de Vellis J. (2008). Myelinating cells in the central nervous system-development, aging, and disease. In R. Pérez-Polo & R. Steffen (Eds.), Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology. Developmental and aging changes in the nervous system (pp. 61-75). New York: Springer Press.

32. Nunoya T., Takima M., Mizutani M., & Umezawa H. (1985). A new mutant strain of Syrian hamster with myelin deficiency. *Acta Neuropathologica, 65*, 305-312.

33. Nussbaum, J. L., Neskovic, N., & Kostic, D. (1969). Characterization of the demyelination disorder in the "jimpy" mouse. *Journal of Physiology (Paris), 61*, 156.

34. Ohno N., & Ikenaka K. (2019). Axonal and neuronal degeneration in myelin diseases. *Neuroscience Research*, 139, 48-57.

35. Purnell S.M., Bleyl S.B., & Bonkowsky J.L. (2014). Clinical exome sequencing identifies a novel TUBB4A mutation in a child with static hypomyelinating leukodystrophy. *Pediatric Neurology*, 50, 608-611.

36. Redheat C., & Hood L. (1990). The dysmyelinating mouse mutations Shiverer (shi) and myelin deficient (shi^{mld}). *Behavior Genetics, 20*, 213-234.

37. Roncagliolo, M., Benítez, J., & Eguibar, J. R. (2000). Progressive deterioration of central components of auditory brainstem responses during postnatal development of the myelin mutant *taiep* rat. *Audiology and Neurootology, 5*, 267-275.

38. Roncagliolo, M., Schlageter, C., León, C., Couve, E., Bonansco, C., & Eguibar, J. R. (2006). Developmental impairment of compound action potential in the optic nerve of myelin mutant *taiep* rats. *Brain Research, 1067*, 78-84.

39. Shimojima K., Okumura A., Ikeno M., Nishimura A., Saito A., Saitsu H., Matsumoto N. et al., A *de novo* TUBB4A mutation in a patient with hypomyelination mimicking Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain & Development*, 37, 281-285.

40. Sidman R.L., Dickie M.M., & Appel S.H. (1964). Mutant mice (quaking and jimpy) with deficient myelination in the central nervous system. *Science*, 144, 309-311

41. Song, J., Carson, J. H., Barbarese, E., Li, F. Y., & Duncan, I. D. (2003). RNA transport in oligodendrocytes from the *taiep* mutant rat. *Molecular and Cellular Neurosciences, 24*, 926-938.

42. Song, J., Goetz, B. D., & Baas, P. W. (2001). Cytoskeletal reorganization during the formation of oligodendrocyte processes and branches. *Molecular and Cellular Neurosciences, 17*, 624-636.

43. Song, J., O'Connor, L. T., Yu, W., Baas, P. W., & Duncan, I. D. (1999). Microtubule alterations in cultured *taiep* rat oligodendrocytes lead to deficits in myelin membrane formation. *Journal of Neurocytology, 28*, 671-683.

44. Soto-Rodríguez, G., Martínez-Fong, D., Arroyo, R., Aguilar-Alonso, P., Rubio, H., Eguibar, J. R., Ugarte, A., Torres-Soto, M., González-Barrios, J. A., Cebada, J., Brambila, E., & León-Chávez, B. A. (2012). Nitric oxide production is associated to increased lipoperoxidation and active caspase-3 in demyelinated brain regions of the taiep rat. *Advance Bioscience Biotechnology, 3*, 695-704.

45. Tonduti D., Aiello C., Renaldo F., Dorboz I., Saaman S., Rodríguez D., Fettah H. et a., (2016). TUBB4A.related hypomyelinating leukodystrophy: New insights from a series of 12 patients. *European Journal of Pediatric Neurology*, 20, 323-330.

46. Tosic, M., Matthey, B., Gow, A., Lazzarini, R. A., & Matthieu, J. M. (1997). Intracellular transport of the DM-20 bearing shaking pup (shp) mutation and its possible phenotypic consequences. *Journal of Neuroscience Research, 50*, 844-852.

47. Urbá-Holmgren, R., Trucios, N., Holmgren, B., Eguibar, J.R., Gavito, A., Cruz. G., & Santos, A. (1990). Genotypic dependency of spontaneous yawning frequency in the rat. *Behavioural Brain Research*, 40, 29-35.

48. Wenger D., Suzuki K., Suzuki Y., & Suzuki K. (2001). Galactosylceramide lipidosis. Globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease). In: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, B. Childs, W.K. Kinzler & B. Vogeistein (Eds.), The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. (pp. 3669-3694). New York: McGraw-Hill Inc.

49. Willem Voncken J. (2011). Strategies for developing genetically modified mice. In: M.M. Hofker, & J. van Deursen (Eds.), Transgenic Mouse. Methods and protocols, vol. 209. (pp. 1-10). New York: Humana Press.

50. Zech M., Boesch S., Jochim A., Graf S., Lichtner P., Peters A., Gieger C., et al., (2015). Large-scale TUBB4A mutational screening in isolated dystonia and controls. *Parkinsonism and Related Disorders*, 21, 1278-1281.

Table 1. Animals models of leukodystrophies and the corresponding human disease.

Models	Affected gene	Neuropathology	Longevity	Human disease
Jimpy mouse	*plp1*	Dysmyelination	21 days	PMD
Shiverer mouse	MBP	Dysmyelination	120 days	–
Twitcher mouse	Galactocerebrosidase	Demyelination	35-45 days	Krabbe disease
Myelin deficient rat	*plp1*	Dysmyelination	21 days	PMD
Long Evans shaker rat	MBP	Dysmyelination/ demyelination	6-9 months	–
Tremor rat	Aspartoacetylase	Myelin vacuolation	12 months	Canavan disease
taiep rat	β-tubulin 4a	Hypomyelination followed by demyelination	>18 months	–
Shaking pup canine	*plp1*	Dysmyelination	23-24 days	PMD

PMD= Pelizaeus-Merzbacher disease; MBP= Myelin basic protein *plp*= proteolipid protein gene.

Table 2. Body weight on Sprague-Dawley and *taiep* rats during lactation.

Postnatal days	Sprague-Dawley	*taiep*
3	6.85 ± 0.15	7.70 ± 0.66
5	8.90 ± 0.10	9.83 ± 1.21
7	11.33 ± 0.49	12.63 ± 1.32
9	14.56 ± 0.63	16.95 ± 0.85
10	15.90 ± 1.10	18.13 ± 1.56
15	25.05 ± 0.25	29.86 ± 1.61

Data are the mean ± SDM on grams.

Table 3. Percentage of eye-opening in Sprague-Dawley and *taiep* pups.

Postnatal days	**Sprague-Dawley (%)**	***taiep* (%)**
12	0	0
13	4	0
14	64	79
15	100	100

Table 4. Postnatal eruption of incisive teeth on Sprague-Dawley and *taiep* pups.

Postnatal days	**Sprague-Dawley (%)**	***taiep* (%)**
6	2	2
7	66	57
8	100	100

Table 5. Postnatal display of complete cliff avoidance on Sprague-Dawley and *taiep* pups.

Postnatal days	**Sprague-Dawley (%)**	***taiep* (%)**
3	47.0	25.0
4	52.9	33.3
5	80	64.5
8	100	100
10	100	100

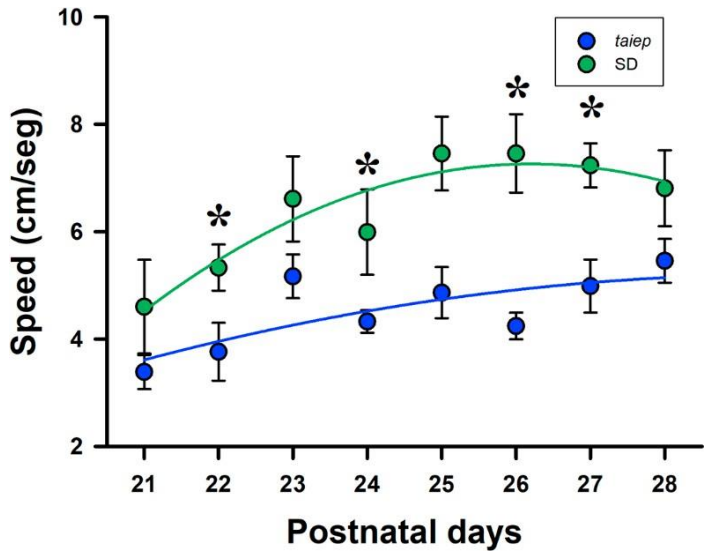

Figure 1: Speed of gait in the first week after weaning in *taiep* and Sprague- Dawley rats. Detailed analysis of the velocity of gait in the first week after weaning show that *taiep* have significantly lower speed, measured in the CatWalk, being significant at 22, 24, 26 and 27 days of age with respect to SD rats (RMANOVA, $F_{(1,7)}$=57.9, $P \leq 0.002$, followed by Bonferroni test, $P \leq 0.05$).

Referencias

Albert, P., Lemonde, S. (2004). 5-HT1A receptors, gene repression, and depression: Guilt by association. *Neuroscientist*, **10:**575-593.

Albin, R., Young, A., Penney, J. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders, *Trends in Neurosciences*, **12**:366-375.

Allen, A., Maher, K., Wani, K., Betts, K., Chase, D. (2011). Coexpressed D1-and D2-like dopamine receptors antagonistically modulate acetylcholine release in Caenorhabditis elegans, *Genetics*, **188**: 579-590.

Antri, M., Mouffle, C., Orsal, D., Barthe, J. (2003). 5-HT1Areceptors are involved in short- and long-term processes responsible for 5-HT-induced locomotor function recovery in chronic spinal rat. *European Journal of Neuroscience,* **18**:1963-1972.

Antri, M., Orsal, D., Barthe, J. (2002). Locomotor recovery in the chronic spinal rat: Effects of long-term treatment with a 5-HT2 agonist. *European Journal of Neuroscience,* **16:** 467-476.

Antri, M., Barthe, J. Y., Mouffle, C., Orsal, D. (2005). Long-lasting recovery of locomotor function in chronic spinal rat following chronic combined pharmacological stimulation of serotonergic receptors with 8-OHDPAT and quipazine. *Neuroscience Letters*, **384:** 162-167.

Arshavsky, Y., Berkinblit, M., Fukson, O., Gelfand, I., Orlovsky, G.N. (1972). Origin of modulation in neurones of the ventral spinocerebellar tract during locomotion. *Brain Research,* **43:** 276-297.

Baker, R. (2007). The history of gait analysis before the advent of modern computers. *Gait & Posture*, **26**: 331-342.

Barrière, G., Mellen, N., Cazalets, J. R. (2004). Neuromodulation of the locomotor network by dopamine in the isolated spinal cord of newborn rat. *European Journal of Neuroscience*, ***19***: 1325-1335.

Bastian, A. J., Martin, T. A., Keating, J. G., & Thach, W. T. (1996). Cerebellar ataxia: abnormal control of interaction torques across multiple joints. *Journal of Neurophysiology*, **76**: 492-509.

Begolka, W., Vanderlugt, C., Rahbe, S., & Miller, S.D. (1998). Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in

two clinically distinct models of multiple sclerosis. *Journal of Immunology,* **161:**4437-4446

Biewener, A. (1990). Biomechanics of mammalian terrestrial locomotion. *Science*, **250:** 1097-1103.

Bretzner, F., Brownstone, R. (2013). Lhx3-Chx10 reticulospinal neurons in locomotor circuits. *Journal of Neuroscience*, **33**: 14681-14692.

Cazalets, J., Grillner, P., Menard, I., Cremieux, J., Clarac, F. (1990). Two types of motor rhythm induced by NMDA and amines in an in vitro spinal cord preparation of neonatal rat. *Neuroscience Letters,* **111**: 116-121.

Cazalets, J., Gardette, M., Hilaire, G. (2000). Locomotor network maturation is transiently delayed in the MAOA-deficient mouse. *Journal of Neurophysiology*, ***83***: 2468-2470.

Chang, W., Breier, M., Yang, A., Swerdlow, N. (2011). Disparate effects of pramipexole on locomotor activity and sensorimotor gating in Sprague-Dawley rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **99**: 634-638.

Chanda, P., Minchin, M., Davis, A., Greenberg, L., Reilly, Y., McGregor, W., Hung, P. (1993). Identification of residues important for ligand binding to the human 5-hydroxytryptamine1A serotonin receptor. *Molecular Pharmacology*, **43**: 516-520.

Clarke, K. (1991). Swing time changes contribute to stride time adjustment in the walking rat. *Physiology & Behavior*, **50**: 1261-1262.

Cohen, J., Rae-Grant, A. (2010). *Handbook of multiple sclerosis*. Springer Healthcare Limited, **6**: 61-78.

Combs, C. K., Johnson, D. E., Karlo, J. C., Cannady, S. B., Landreth, G. E. (2000). Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of β-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARγ agonists. *Journal of Neuroscience*, **20**: 558-567.

Coonan, J. R., Greferath, U., Messenger, J., Hartley, L., Murphy, M., Boyd, A. W., Bartlett, P. (2001). Development and reorganization of corticospinal projections in EphA4 deficient mice. *Journal of Comparative Neurology*, **436**: 248-262.

Cortés, M., Gavito, B., Ita, M., Valencia, J., Eguibar, J. (2005). Characterization of the spontaneous and gripping-induced immobility episodes on *taiep* rats. *Synapse*, **58:** 95-101.

Cramer, G., Darby, S. (2017). *Clinical Anatomy of the Spine, Spinal Cord, and ANS*.

Elsevier Health Sciences, 341-412.

Crowninshield, R., Brand, R. (1981). A physiologically based criterion of muscle force prediction in locomotion. *Journal of Biomechanics,* **14**: 793-801.

Cucarián, J., (2017). Caracterización temporo-espacial del patrón de marcha en roedores como modelo animal de lesión cerebral cerebrovascular. *Acta Biológica Colombiana,* **22**: 307-321.

Custodio, C. (2008). Neuromuscular complications of cancer and cancer treatments. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America,* **19**: 27–45.

Danner, S., Shevtsova, N., Frigon, A., Rybak, I. (2017). Computational modeling of spinal circuits controlling limb coordination and gaits in quadrupeds. *ELife*, **6*:*** 31-50.

Dendrou, C., Fugger, L., Friese, M. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology,* **15:** 545-558.

Deutschländer A., (2016). Occupancy of pramipexole (Sifrol) at cerebral dopamine D2/3 receptors in Parkinson's disease patients. *NeuroImage Clinical,* **12:** 41-46.

Dujardin, F., Tobenas-Dujardin, A.-C., & Weber, J. (2009). Anatomía y fisiología de la marcha, de la posición sentada y de la bipedestación. *Aparato Locomotor,* **42**: 1-20.

Duncan, I., Lunn, K., Holmgren, B., Urba-Holmgren, R., Brignolo-Holmes, L. (1992). The *taiep* rat: A myelin mutant with an associated oligodendrocyte microtubular defect. *Journal of Neurocytology,* **21**: 870-884.

Duncan, I., Bugiani, M., Radcliff, A., Moran, J., Lopez-Anido, C., Duong, P., Svaren, J. (2017). A mutation in the Tubb4a gene leads to microtubule accumulation with hypomyelination and demyelination. *Annals of Neurology*, **81**: 690-702.

Domínguez, S. (2018). Evaluación de los efectos de antiinflamatorios esteroideos sobre la marcha en el mutante de mielina *taiep*: un modelo de esclerosis múltiple. Tesis de licenciatura en Ingeniería Biomédica. División de Ciencias e Ingenierías. Universidad de Guanajuato.

Doly, S., Madeira, A., Fischer, J., Brisorgueil, M., Daval, G., Bernard, R., Conrath, M. (2004). The 5-HT2A receptor is widely distributed in the rat spinal cord and mainly localized at the plasma membrane of postsynaptic neurons. *Journal of Comparative Neurology*, ***472***: 496-511.

Dourish, C. , Hutson, P., Curzon, G. (1985). Low doses of the putative serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicit feeding in the

rat. *Psychopharmacology*, ***86:*** 197-204.

D'Souza, S., Bonetti, B., Balasingam, V., Cashman, N. R., Barker, P. A., Troutt, A. B., Antel, J. (1996). Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *Journal of Experimental Medicine*, ***184***:.

Feinstein, A., Freeman, J., Lo, A. (2015). Treatment of progressive multiple sclerosis: What works, what does not, and what is needed. *The Lancet Neurology,* **14:** 194–207.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, **144:** 1941-1953.

Flavin, M. P., Ho, L. T., Coughlin, K. (1997). Neurotoxicity of Soluble Macrophage Productsin Vitro—Influence of Dexamethasone. *Experimental Neurology*, **145**: 462-470.

Fone, K., Robinson, A., Marsden, C. (1991). Characterization of the 5HT receptor subtypes involved in the motor behaviours produced by intrathecal administration of 5HT agonists in rats. *British Journal of Pharmacology,* **103**: 1547-1555.

Fonseca, M., Ni, Y., Dunning, D., Miledi, R. (2001). Distribution of serotonin 2A, 2C and 3 receptor mRNA in spinal cord and medulla oblongata. *Molecular Brain Research,* **89**: 11-19.

Foote, A., Blakemore, W. (2005). Inflammation stimulates remyelination in areas of chronic demyelination. *Brain*, **128:** 528-539.

Garduno-Robles, A., Alata, M., Piazza, V., Cortes, C., Eguibar, J. R., Plantano, S., Hernandez, V. (2020), MRI features in a rat model of H-ABC tubulinopathy, *Frontiers in Neuroscience*.

GBDTB, I. (2019). Spinal Cord Injury C. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurology*, **18:** 56-87.

Gerasimenko, Y. (2007). Epidural spinal cord stimulation plus quipazine administration enable stepping in complete spinal adult rats. *Journal of Neurophysiology*, **98**: 2525–2536.

Gerin, C., Privat, A. (1998). Direct evidence for the link between monoaminergic descending pathways and motor activity: II. A study with microdialysis probes

implanted in the ventral horn of the spinal cord. *Brain Research*, **794:** 160-173

Grillner, S., Robertson, B. (2016). The basal ganglia over 500 million years. *Current Opinion Biology*, **26:** 528-539.

Golde, S., Coles, A., Lindquist, J. A., Compston, A. (2003). Decreased iNOS synthesis mediates dexamethasone-induced protection of neurons from inflammatory injury in vitro. *European Journal of Neuroscience*, **18:** 2527-2537.

Gonçalves, F. G., Tomás de Andrade, L. F., Taranath, A., Lakshmanan, R., Goetti, R., Feltrin, F. S., Arrigoni, F. (2018). Tubulinopathies. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*, ***27***: 395-408.

Goodman, A. D., Brown, T. R., Edwards, K. R., Krupp, L. B., Schapiro, R. T., Cohen, R., (2010). A phase 3 trial of extended release oral dalfampridine in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, **68:** 494-502.

Guertin, P. A. (2009). The mammalian central pattern generator for locomotion. *Brain Research Reviews*, ***62***: 45-56.

Hamers, F.P.T., Lankhorst, A.J., van Laar, T.J., Veldhuis, W.B., Gispen, W.H. (2001). Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat : its application to spinal cord contusion and transection injuries. *Journal of Neurotrauma,* **18:**187–210.

Hamers, F.P., Lankhorst, A.J., van Laar, T.J., Veldhuis, W.B., Gispen, W.H. (2001). Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries. *Journal of Neurotrauma,* **18:** 187–201.

Hamilton, E. M., Bertini, E., Kalaydjieva, L., Morar, B., Dojčáková, D., Liu, J., Pinelli, L. (2017). UFM1 founder mutation in the Roma population causes recessive variant of H-ABC. *Neurology*, **89**: 1821-1828.

Harris-Warrick, R.M., Cohen, a H. (1985). Serotonin modulates the central pattern generator for locomotion in the isolated lamprey spinal cord. *The Journal of Experimental Biology,* **116:** 27-46.

Hawker, K., & Frohman, E. (2004). Multiple sclerosis. *Primary Care - Clinics in Office Practice,* **31**: 201–226.

Hayes, D. J., Greenshaw, A. J. (2011). 5-HT receptors and reward-related behaviour: a review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **35**: 1419-1449.

Hinson, R. M., Williams, J. A. Shacter, E. (1996). Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**: 4885-4890.

Hjorth, S., & Magnusson, T. (1988). The 5-HT1A receptor agonist, 8-OH-DPAT, preferentially activates cell body 5-HT autoreceptors in rat brain in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology,* **338:** 463-471.

Hoozemans, J. J. M., Rozemuller, A. J. M., Janssen, I., De Groot, C. J. A., Veerhuis, R., Eikelenboom, P. (2001). Cyclooxygenase expression in microglia and neurons in Alzheimer's disease and control brain. *Acta Neuropathologica*, **101**:, 2-8.

Holmgren, B., Urbá-Holmgren, R., Riboni, L., Vega-SaenzdeMiera, E. (1989). Sprague Dawley rat mutant with tremor, ataxia, tonic immobility episodes, epilepsy and paralysis. *Laboratory Animal Science,* **39**: 226–228..

Hughes, R. A., Swan, A. V., Raphaël, J. C., Annane, D., van Koningsveld, R., van Doorn, P. A. (2007). Immunotherapy for Guillain-Barré syndrome: a systematic review. *Brain*, **130**: 2245-2257.

Iversen, S. D., Iversen, L. L. (2007). Dopamine: 50 years in perspective. *Trends in Neurosciences*, ***30***: 188-193.

Jaber, M., Robinson, S.W., Missale, C., Caron, M.G. (1997). Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology,* **35**: 1503–1519.

Jackson, D.M., Westlind-Danielsson, A. (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacology & Therapeutics,* **64:** 291–370.

Jacobs, B.L., Azmitia, E.C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews,* **72**: 165–229.

Jankowska, E., Jukes, M. G., Lund, S., Lundberg, A. (1967). The Effect of DOPA on the Spinal Cord 6. Half-centre organization of interneurones transmitting effects from the flexor reflex afferents. *Acta Physiologica Scandinavica*, **70***:* 389-402.

Jeffrey-Gauthier, R., Josset, N., Bretzner, F., Leblond, H. (2018). Facilitation of locomotor spinal networks activity by buspirone after a complete spinal cord lesion in mice. *Journal of Neurotrauma*, **35:** 2208-2221.

Jersild, C. (1973). Histocompatibility Determinants in Multiple Sclerosis, With Special Reference To Clinical Course. *The Lancet,* **302:** 1221–1225.

Jiang, Z., Carlin, K. P., Brownstone, R. M. (1999). An in vitro functionally mature mouse spinal cord preparation for the study of spinal motor networks. *Brain Research*, **816**: 493-499.

Josset, N., Roussel, M., Lemieux, M., Lafrance-Zoubga, D., Rastqar, A., & Bretzner, F. (2018). Distinct contributions of mesencephalic locomotor region nuclei to locomotor control in the freely behaving mouse. *Current Biology*, ***28***: 884-901.

Joyal, K. M., Michaud, J., van der Knaap, M. S., Bugiani, M., Venkateswaran, S. (2019). Severe TUBB4A-Related Hypomyelination With Atrophy of the Basal Ganglia and Cerebellum: Novel Neuropathological Findings. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, ***78:*** 3-9.

Eguibar, J.R., Cortés, C., Ugarte, A. (2014). The myelin mutant rat *taiep* as a model of neuroimmunological disease. *Advances in Neuroimmune Biology,* **5:** 9-17.

Kandel, E.R. (2001). Kandel *. Principios de neurociencia.* 4th. McGraw-Hill. Madrid, España, 653-673.

Kappos, E.A. (2017). Validity and reliability of the CatWalk system as a static and dynamic gait analysis tool for the assessment of functional nerve recovery in small animal models. *Brain and Behavior,* **7**: 1-12.

Kaye JF, Kerlero de Rosbo N., Mendel .I, Flechter S., Hoffman M., Yust I., Ben-Nun A. (2000). The central nervous system-specific myelin oligodendrocytic basic protein (MOBP) is encephalitogenic and a potential target antigen in multiple sclerosis (MS). *Journal of Neuroimmunology*, **102:** 189-198.

Kebabian, J. W., Calne, D. B. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature*, **277:** 93-96.

Kelly, M. A., Rubinstein, M., Phillips, T. J., Lessov, C. N., Burkhart-Kasch, S., Zhang, G., Low, M. J. (1998). Locomotor activity in D2 dopamine receptor-deficient mice is determined by gene dosage, genetic background, and developmental adaptations. *Journal of Neuroscience*, **18:** 3470-3479.

Kiehn, O., & Kjaerulff, O. (1996). Spatiotemporal characteristics of 5-HT and dopamine-induced rhythmic hindlimb activity in the in vitro neonatal rat. *Journal of Neurophysiology*, **75**: 1472-1482.

Kiehn, O. (2006). Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annual Review of Neurosciense*, ***29***: 279-306.

Klockgether, T., Mariotti, C., Paulson, H. L. (2019). Spinocerebellar ataxia. *Nature Reviews Disease Primers,* **5:** 1-21.

Kullander, K., Butt, S. J., Lebret, J. M., Lundfald, L., Restrepo, C. E., Rydström, A., Kiehn, O. (2003). Role of EphA4 and EphrinB3 in local neuronal circuits that control walking. *Science*, **299**: 1889-1892.

Kupersmith, M. J., Kaufman, D., Paty, D. W., Ebers, G., McFarland, H., Johnson, K., Whitaker, J. (1994). Megadose corticosteroids in multiple sclerosis, *Neurology***, 1**: 1-1.

Krsulovic, J., Couve, E., Roncagliolo, M. (1999). Dysmyelination, demyelination and reactive astrogliosis in the optic nerve of the *taiep* rat. *Biological Research*, **32:** 253-262.

Landry, E.S., Guertin, P.A. (2004). Differential effects of 5-HT1 and 5-HT2 receptor agonists on hindlimb movements in paraplegic mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry,* **28:** 1053-1060.

Landry, E. S., Lapointe, N. P., Rouillard, C., Levesque, D., Hedlund, P. B., Guertin, P. (2006). Contribution of spinal 5-HT1A and 5-HT7 receptors to locomotor-like movement induced by 8-OH-DPAT in spinal cord-transected mice. *European Journal of Neuroscience*, **24**: 535-546.

Lassmann, H., Van Horssen, J. (2011). The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Letters,* **585:** 3715–3723.

Chavez, B. A. L., Guevara, J., Galindo, S., Luna, J., Ugarte, A., Villegas, O., Martinez-Fong, D. (2001). Regional and temporal progression of reactive astrocytosis in the brain of the myelin mutant taiep rat. *Brain Research*, **900:** 152-155.

Leon, R.D. de, Acosta, C.N. (2006). Effect of robotic-assisted treadmill training and chronic quipazine treatment on hindlimb stepping in spinally transected rats. *Journal of Neurotrauma,* **23:** 147–1163.

Levite, M., Marino, F., & Cosentino, M. (2017). Dopamine, T cells and multiple sclerosis (MS). *Journal of Neural Transmission,* **124**: 525–542.

Li, F.Y., Song, J., Duncan, I.D. (2003). Mapping of *taiep* rat phenotype to rat Chromosome 9. *Mammalian Genome,* **14**: 703–705.

Love, S. (2006). Demyelinating diseases. *Journal of Clinical Pathology*, **59:** 1151-1159.

Lublin, F. D., Reingold, S. C. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology*, **46**: 907–912.

Lunn, K.F., Baas, P.W., Duncan, I.D. (1997). Microtubule organization and stability in the oligodendrocyte. *The Journal of Neuroscience,* **17**: 4921–4932.

Lunn, K.F., Clayton, M.K., Duncan, I.D. (1997). The temporal progression of the myelination defect in the *taiep* rat. *Journal of Neurocytology,* **26:** 267–281.

Madden, G.J., Johnson, P.S., Brewer, A.T., Pinkston, J.W., Fowler, S.C. (2010). Effects of pramipexole on impulsive choice in male wistar rats. *Experimental and Clinical Psychopharmacology,* **18:** 267–276.

Mierau, J., Schingnitz, G. (1992). Biochemical and pharmacological studies on pramipexole, a potent and selective dopamine D2 receptor agonist. *European Journal of Pharmacology,* **215**: 161–170..

Möller, J.R., Durr, P.G., Quarles, R.H., & Duncan, I.D. (1997). Biochemical analysis of myelin proteins in a novel neurological mutant: the *taiep* rat. *Journal of Neurochemistry,* **69**: 773–779.

Montplaisir, J., Denesle, R., Petit, D. (2000). Pramipexole in the treatment of restless legs syndrome: a follow-up study. *European Journal of Neurology*, **7:** 27-31.

Nilsson, J., Thorstensso, A. (1985). Changes in leg movements and muscle activity with speed of locomotion and mode of progression in humans. *Acta Physiologica Scandinavica,* **123**: 457–475.

Noga, B. R., Kriellaars, D. J., Brownstone, R. M., Jordan, L. M. (2003). Mechanism for activation of locomotor centers in the spinal cord by stimulation of the mesencephalic locomotor region. *Journal of Neurophysiology*, ***90***: 1464-1478.

Noga, B. R., Opris, I. (2017). The hierarchical circuit for executive control of movement. In *The Physics of the Mind and Brain Disorders*, **1**: 95-127.

Noserworthy, J. (2000). Clinical course and diagnosis. *The New England Journal of Medicine,* **343**: 938–952.

National Spinal Cord Injury Statistical Center (NSCISC), (2019). Facts and Figures at a Glance. Birmingham, AL: University of Alabama at Birmingham, **1**: 1-2.

O'Connor, L.T., Goetz, B.D., Couve, E., Song, J., Duncan, I.D. (2000). Intracellular distribution of myelin protein gene products is altered in oligodendrocytes of the *taiep* rat. *Molecular & Cellular Neurosciences*, **16**: 396–407.

Olek, M.M. 2005. Multiple Sclerosis- Etiology, diagnosis and new treatment strategies. Totowa. New Jersi.USA

Parker, A.J., Clarke, K.A. (1990). Gait topography in rat locomotion. *Physiology and Behavior,* **48**: 41–47.

Peroutka, S.J., Hamik, A. (1988). [3H]quipazine labels 5-HT3 recognition sites in rat cortical membranes. *Eur J Pharmacol,* **148**: 297-299.

Pithadia, A. B., Jain, S. M. (2009). 5-Hydroxytryptamine receptor suptypes and their modulators with therapeutic potentials. *Journal of clinical medicine Research*, **1:** 72.

Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkmann, J., Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature reviews Disease Primers*, **3:** 1-21.

Popoli, P., Caporali, M. G., De Carolis, A. S. (1990). Evidence of the involvement of D1 dopamine receptors in PCP-induced stereotypy and ataxia in rabbits. *Pharmacological Research*, **22**: 197-205.

Poser, C. M., Paty, D. W., Scheinberg, L., McDonald, W. I., Davis, F. A., Ebers, G. C., Tourtellotte, W. (1983). New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Annals of Neurology,* **13**: 2217-231.

Rodriguez, R., Rojas-Ramirez, J. A., Drucker-Colin, R. (1973). Serotonin-like actions of quipazine on the central nervous system. *European Journal of Pharmacology*, **24:** 164-171.

Rocha, F. (2010). Análisis de la locomoción en la rata *taiep*: rol de las vías inhibitorias. Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas. Instituto de Fisiología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Roncagliolo, M., Benítez, J., Eguibar, J.R. (2000). Progressive deterioration of central components of auditory brainstem responses during postnatal development of the myelin mutant *taiep* rat. *Audiology and Neuro-Otology* **5**: 267–275.

Rybak, I. A., Shevtsova, N. A., Lafreniere-Roula, M., McCrea, D. A. (2006). Modelling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: insights from deletions during fictive locomotion. *The Journal of Physiology*, **577:** 617–639.

Ryczko, D., Auclair, F., Cabelguen, J. M., Dubuc, R. (2016). The mesencephalic locomotor region sends a bilateral glutamatergic drive to hindbrain reticulospinal neurons in a tetrapod. *Journal of Comparative Neurology*, **524**: 1361-1383.

Sablin, S. O., Yankovskaya, V., Bernard, S., Cronin, C. N., Singer, T. P. (1998). Isolation

and characterization of an evolutionary precursor of human monoamine oxidases A and B. *European Journal of Biochemistry*, **253***:* 270-279.

Schepisi, C., De Carolis, L., Nencini, P. (2013). Effects of the 5HT2C antagonist SB242084 on the pramipexole-induced potentiation of water contrafreeloading, a putative animal model of compulsive behavior. *Psychopharmacology,* **227**: 55-66.

Shik, M. L., Severin, F. V., Orlovskiĭ, G. N. (1967). Structures of the brain stem responsible for evoked locomotion. *Fiziologicheskii zhurnal SSSR imeni IM Sechenova*, **53:** 1125-1132.

Sloka, J. S., Stefanelli, M. (2005). The mechanism of action of methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, **11:**, 425-432.

Sławińska, U., Miazga, K., Jordan, L. M. (2014). 5-HT2 and 5-HT7 receptor agonists facilitate plantar stepping in chronic spinal rats through actions on different populations of spinal neurons. *Frontiers in Feural Circuits*, **8**: 95.

Solaro, C., Trabucco, E., Messmer Uccelli, M. (2013). Pain and multiple sclerosis: Pathophysiology and treatment topical collection on demyelinating disorders. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, **13**: 320.

Song, J., O'Connor, L.T., Yu, W., Baas, P.W., Duncan, I.D. (1999). Microtubule alterations in cultured *taiep* rat oligodendrocytes lead to deficits in myelin membrane formation. *Journal of Neurocytology,* **28**: 671-684.

Soto-Rodriguez, G., Gonzalez-Barrios, J. A., Martinez-Fong, D., Blanco-Alvarez, V. M., Eguibar, J. R., Ugarte, Torres-Soto, M. (2015). Analysis of chemokines and receptors expression profile in the myelin mutant taiep rat. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2015**: 1-8.

Steeves, J. D., Jordan, L. M. (1980). Localization of a descending pathway in the spinal cord which is necessary for controlled treadmill locomotion. *Neuroscience Letters*, **20**: 283-288.

Trapp, B.D., Nave, K. (2008). Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder?. *Annual Review of Neuroscience,* **31**: 227-260

Viala, D., Buser, P. (1971). Modalités d'obtention de rythmes locomoteurs chez le lapin spinal par traitements pharmacologiques (DOPA, 5-HTP, D-amphétamine). *Brain Research*, **35:** 151-165.

Viala, D., Buser, P. (1974). Effects of a decarboxylase inhibitor on the Dopa and 5-HTP

induced changes in the locomotor-like discharge pattern of rabbit hind limb nerves. *Psychopharmacologia*, **40**: 225-233.

Villamil-osorio, L. (2016). Características clínicas y demográficas de los pacientes con esclerosis múltiple. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. **54**: S186-S190

Von Steyern, F. V., & Lømo, T. (2005). Postnatal appearance of 5-HT2A receptors on fast flexor and slow extensor rat motor neurons. *Neuroscience*, **136**: 87-93.

Wang, C. (2013). Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science,* **340**: 610-614.

Watson, C., Paxinos, G., Kayalioglu, G., Heise, C. (2009). Atlas of the rat spinal cord. In *The Spinal Cord,* 238-306.

Willison, H. J., Jacobs, B. C., & Van Doorn, P. A. (2016). Guillain-barre syndrome. *The Lancet*, **388:** 717-727.

Wilkins, A., Kondo, Y., Song, J., Liu, S., Compston, A., Black, J. A., Duncan, I. D. (2010). Slowly progressive axonal degeneration in a rat model of chronic, nonimmune-mediated demyelination. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, **69:** 1256-1269.

Wikström, M., Hill, R., Hellgren, J., Grillner, S. (1995). The action of 5-HT on calcium-dependent potassium channels and on the spinal locomotor network in lamprey is mediated by 5-HT1A-like receptors. *Brain research*, **678:** 191-199.

Yuen, E. Y., Jiang, Q., Chen, P., Gu, Z., Feng, J., & Yan, Z. (2005). Serotonin 5-HT1A receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. *Journal of Neuroscience*, **25**: 5488-5501.

Zoghi, S. et al. 2011. Cytokine secretion pattern in treatment of lymphocytes of multiple sclerosis patients with fumaric acid esters. *Immunological Investigations,* **40**: 581-596.

Zorzon, M., Zivadinov, R., Bosco, A., Bragadin, L. M., Moretti, R., Bonfigli, L., Cazzato, G. (1999). Sexual dysfunction in multiple sderosis: a case-control study. Frequency and comparison of groups. *Multiple Sclerosis Journal*, **5**: 418-427.