



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE FISIOLOGÍA**

**LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGÍA DE LA CONDUCTA Y  
CONTROL MOTOR**

**“La 4-aminopiridina mejora la marcha en la rata *taiep*:  
un modelo de tubulinopatía”**

Tesis para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias Fisiológicas**

Presenta:

**Ing. Biomédico Diego Adrián Martínez Martínez**

Director de tesis:

**Dr. José Ramón  
Eguibar Cuenca**

Co-directora de tesis:

**Dra. Ma. del Carmen  
Cortés Sánchez**

Abril 2025

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría ser breve en esta sección, sin embargo, tengo tanto que agradecer que una sola página no alcanzaría, así que aquí está mi mejor intento.

Gracias Dios por todas las oportunidades, bendiciones y dones que me has otorgado, en general, gracias por todo. Gracias a mis padres y hermano por siempre estar presentes y apoyarme en esta meta que un día me propuse y que está a punto de culminar, la maestría. Sus enseñanzas y consejos fueron clave en este camino.

Gracias familia y amigos por estar aquí, por hacer la vida de colores que a veces se quiere tornar un poco gris, en especial agradezco a Karla Vázquez, Hallel Aquino y Elizabeth Rojas, porque el destino nos cruzó, pero nosotros nos elegimos.

También agradecer a mis directores de tesis el Dr. José Ramón Eguibar Cuenca y a la Dra. Ma. Del Carmen Cortés Sánchez, por su incansable labor para conmigo, gracias por guiarme y haberme dado la oportunidad de pertenecer a su laboratorio. A mi comité tutorial el Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán y el Dr. Fabián Galindo Ramírez, por su retroalimentación y consejos para llevar a buen puerto esta tesis.

Gracias a mis compañeros del Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y Control Motor, en especial a la Maestra Araceli Ugarte y al Maestro Juan Carlos Ahumada, por orientarme en todos los procedimientos de experimentación.

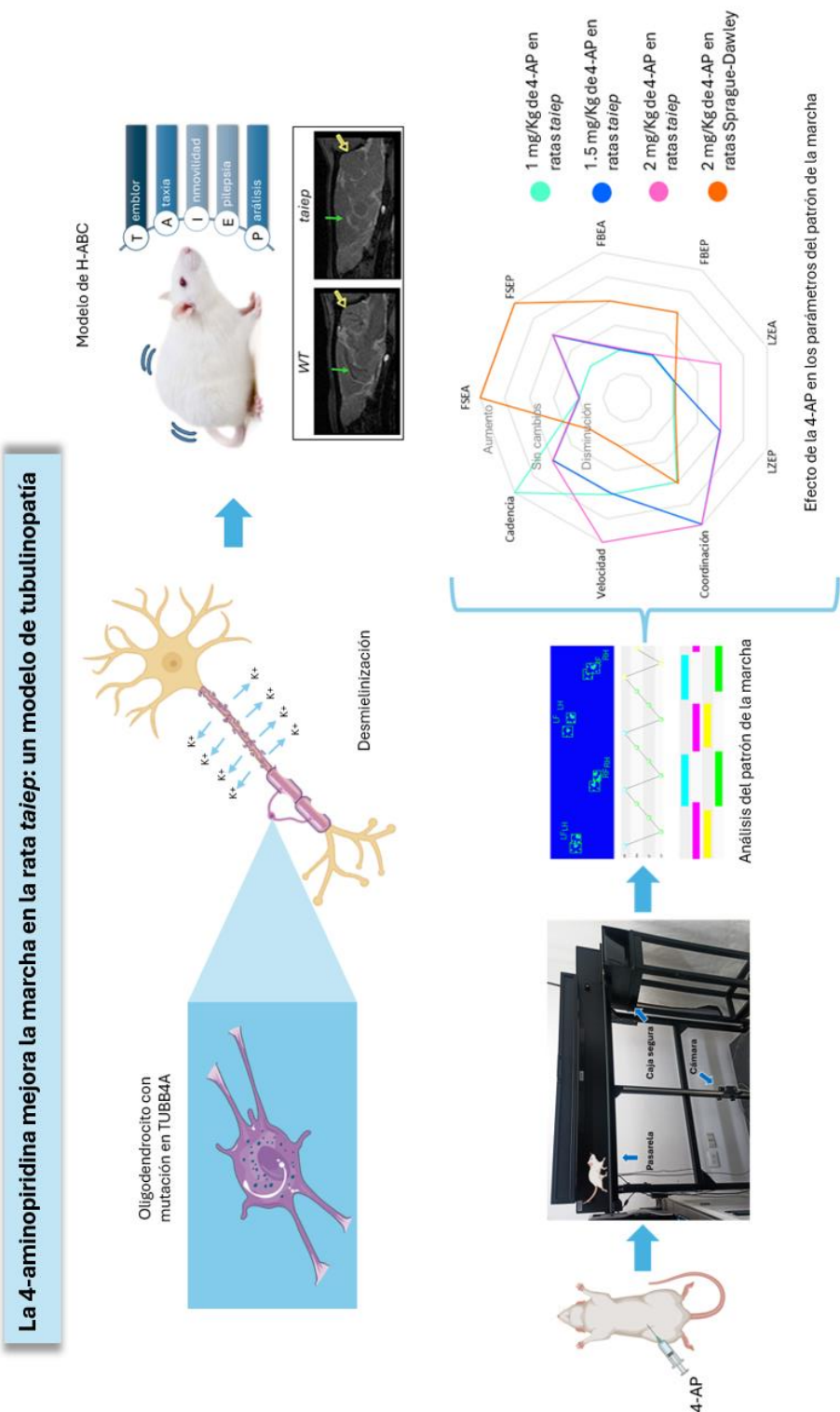
Por último y no menos importante, al Programa Nacional Estratégico de Ciencias, Tecnologías e innovación en salud (PRONACES-CONACYT 194171) y a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP (VIEP-BUAP-2024), al Cuerpo Académico consolidado en Neuroendocrinología (BUAP-CA-288) y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT).

# Índice

<b>RESUMEN GRÁFICO</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>6</b>
<b>1. La marcha.</b>	<b>6</b>
1.1. Fisiología de la marcha.	6
1.2. El análisis del patrón de la marcha.	7
1.2.1. Equipo de pasarela CatWalk para el análisis de la marcha.	10
1.3. Ataxia.	11
<b>2. Leucodistrofias.</b>	<b>13</b>
2.1. Tubulinopatías.	13
2.2. Enfermedad H-ABC.	15
2.2.1. Fisiopatología.	15
2.2.2. Signos y síntomas.	17
2.2.3. Diagnóstico y tratamiento.	18
2.3. La rata <i>taiep</i> como un modelo de H-ABC.	19
<b>3. Los canales de potasio tipo Kv 1.1 y 1.2.</b>	<b>23</b>
<b>4. La 4-Aminopiridina.</b>	<b>24</b>
4.1. Composición química.	25
4.2. Mecanismo de acción de la 4-aminopiridina.	25
4.3. Farmacodinamia.	26
4.4. Farmacocinética.	27
4.5. Toxicología.	28
<b>ANTECEDENTES.</b>	<b>29</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.</b>	<b>34</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.</b>	<b>37</b>
<b>HIPÓTESIS.</b>	<b>38</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.</b>	<b>38</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.</b>	<b>38</b>
<b>METODOLOGÍA.</b>	<b>39</b>
<b>1. Animales.</b>	<b>39</b>

<b>2. Droga.</b>	<b>39</b>
<b>3. Análisis del patrón de la marcha.</b>	<b>40</b>
<b>4. Análisis estadístico.</b>	<b>40</b>
<b>5. Diagrama del diseño experimental empleado.</b>	<b>41</b>
<b>RESULTADOS.</b>	<b>42</b>
<b>DISCUSIÓN.</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>70</b>
<b>REFERENCIAS.</b>	<b>71</b>

# RESUMEN GRÁFICO



## RESUMEN

La rata *taiep* es un mutante de tubulinas cuyo nombre es el acrónimo de los signos motores progresivos que presenta a lo largo de su vida: temblor, ataxia, inmovilidad, epilepsia y parálisis. Este es el primer modelo animal para analizar nuevas opciones terapéuticas para la tubulinopatía conocida como hipomielinización con atrofia de los ganglios basales y cerebelo (H-ABC), para la cual no se tienen tratamientos disponibles a la fecha.

La 4-aminopiridina (4-AP) es un bloqueador de los canales de potasio Kv 1.1 y Kv 1.2 que incrementa la eficacia de la transmisión sináptica al reducir la salida de potasio de la neurona en la etapa de hiperpolarización provocando que el periodo refractario relativo se reduzca y se pueda generar un nuevo potencial de acción de manera más rápida. Además, genera un aumento en la duración del potencial de acción, lo que provoca un aumento en el tiempo en que la neurona permanece despolarizada y por consecuencia, se produce un mayor influjo de Ca<sup>+</sup> a través de los canales de calcio voltaje-dependientes en las terminales presinápticas y por lo tanto un aumento en la liberación de los neurotransmisores.

El objetivo de esta tesis fue valorar los efectos de la administración de 4-AP en el patrón de la marcha de ratas *taiep* macho adultas de tres meses de edad. Se utilizaron tres grupos experimentales de ratas *taiep* que fueron administradas con 4-AP por vía intraperitoneal: ocho ratas recibieron la dosis de 1 mg/Kg, ocho ratas recibieron la dosis de 1.5 mg/kg y otras ocho ratas recibieron la dosis de 2 mg/kg. Cada rata sirvió como su propio control. Adicionalmente, se evaluaron los efectos de la administración de 4-AP en seis ratas Sprague-Dawley con una dosis de 2 mg/kg. Se evaluó el patrón de la marcha en el equipo CatWalk™ (Noldus Technologies, Países Bajos) analizando la cadencia, la coordinación, la velocidad, la longitud de la zancada, las fases de balanceo y de soporte de ambos grupos.

Nuestros resultados muestran que la 4-AP mejora los diferentes parámetros del patrón de la marcha como es la duración de la fase de soporte en las extremidades anteriores, la duración de la fase de balanceo en las extremidades, la coordinación

y la velocidad de la marcha, obteniendo los mejores resultados con la dosis más alta de 2 mg/Kg. Asimismo, se obtuvieron cambios en las ratas Sprague-Dawley tras la administración de 4-AP, aunque estos no fueron beneficiosos para el patrón de la marcha.

En conclusión, nuestros resultados respaldan que la 4-AP podría ser una opción terapéutica en pacientes con enfermedad H-ABC o pacientes con enfermedades desmielinizantes como las leucodistrofias, o adquiridas como son los traumas o autoinmunes como la esclerosis múltiple.

# INTRODUCCIÓN.

## 1. La marcha.

El patrón de la marcha es una serie de movimientos rítmicos y alternantes generados por contracciones de los músculos flexores y extensores de las extremidades inferiores y superiores, regulados tanto a nivel cerebral como de la médula espinal, con el objetivo de desplazarnos de un sitio a otro (Kandel et al., 2021) y cumple diferentes funciones como la del forrajeo, búsqueda de pareja o de un lugar de refugio.

### 1.1. Fisiología de la marcha.

El primer paso es la volición de iniciar la marcha, ya sea por un proceso volitivo (consciente), o bien, por un proceso emocional (inconsciente) como el que sucede cuando estamos en una situación de pelea o huida. En cualquiera de los casos, este impulso tiene un origen en la corteza cerebral (Takakusaki, 2013).

El área motora primaria (área 4 de Brodmann) envía las señales motoras comando de los movimientos voluntarios hacia los músculos a través del tracto cortico-espinal (Kandel et al., 2021), y recibe señales de dos áreas para la regulación de la marcha, el área cortical premotora, la cual integra la información visual para la planificación de la marcha; y el área motora suplementaria, que se encarga del control postural anticipatorio preparando al cuerpo para realizar el movimiento (Takakusaki, 2013).

Una vez iniciado el proceso de marcha por las regiones corticales, es la región locomotora mesencefálica (RLM), conformado por dos núcleos: el pedúnculo-pontino (NPP) y el núcleo cuneiforme (NC), la cual regula la velocidad del patrón de la marcha (Dautan et al., 2021). Las neuronas glutamatérgicas del NC regulan los movimientos rápidos y sincrónicos, como son el galope y el salto; mientras que, las neuronas glutamatérgicas del NPP controlan la locomoción más lenta y alternante, como lo es la caminata o el trote (Caggiano et al., 2018).

A nivel medular, la RLM activa redes de interneuronas responsables de producir la alternancia rítmica de flexión y extensión de las extremidades, estas redes son conocidas como generadores centrales de patrones (GCP; Minassian et al., 2017). Estos simplifican el control supraespinal haciendo que la corteza cerebral no tenga que controlar cada detalle de la marcha, sino que modula la actividad del GCP para ajustar la velocidad y el ritmo del patrón de la marcha según los requerimientos (Minassian et al., 2017).

Durante el proceso de locomoción, la información sensorial de los músculos, las articulaciones y la piel, es esencial para ajustar la marcha a las condiciones cambiantes del entorno (Takakusaki, 2013). Esta información viaja hacia el cerebelo a través de la vía espino-cerebelosa, donde se integran las señales de adaptación de la marcha para evitar obstáculos y adecuarse a los cambios en el terreno, así como para la detección y corrección de las discordancias entre los movimientos planificados y los ejecutados (Takakusaki, 2013).

## 1.2. El análisis del patrón de la marcha.

El análisis de la marcha ha sido de gran interés a lo largo de los siglos y no solo para los médicos o los fisiólogos, de tal forma que exponentes como el famoso pintor Leonardo Da Vinci (1452-1519) o el matemático italiano Giovanni Borelli (1608-1679) fueron de los primeros científicos en considerar el movimiento corporal reconociendo su funcionamiento como un sistema de palancas activadas por los músculos que actúan sobre los huesos, con una visión mecanicista (Paul, 1998).

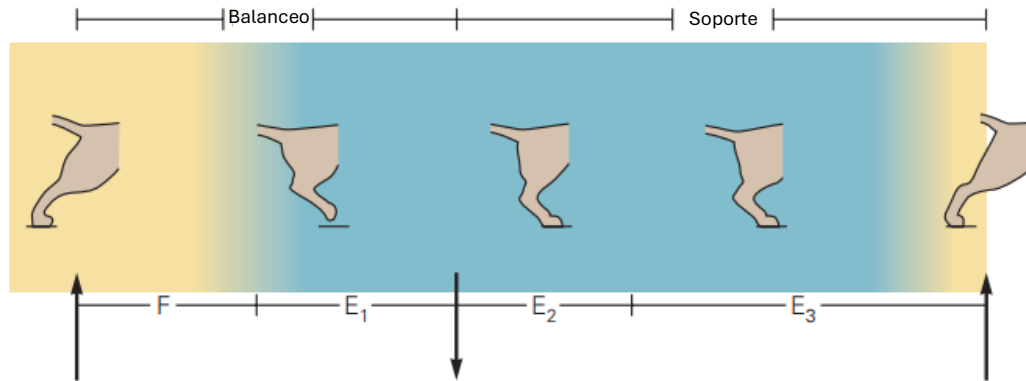
Los hermanos Weber (1836) en sus investigaciones demostraron que existe una relación entre la velocidad de la marcha y la longitud de la zancada, analizando cuál es la forma más eficiente de caminar una distancia específica con respecto a la longitud de la zancada y el número de pasos, conocida esta última hoy en día como la cadencia de la marcha (Paul, 1998). Adicionalmente, analizaron el despegue del pie respecto al suelo (fase de balanceo) y propusieron teorías que, a pesar de no

estar del todo correctas, sentaron las bases para la medición cuantitativa de los parámetros de la locomoción (Paul, 1998).

Un precursor más fue Eadweard Muybridge (1860), un fotógrafo e investigador británico quien contribuyó significativamente al estudio del movimiento empleando fotografías seriales para su investigación, inicialmente enfocándose en el galope de los caballos para determinar si en algún momento mantenían todas sus patas separadas del suelo (Stillman et al., 1882). Con el paso de los años, estos sistemas se fueron perfeccionando, incorporando tecnologías más avanzadas, lo que ha dado lugar a los modernos y sofisticados sistemas de análisis de la marcha disponibles en la actualidad (Haro, 2014).

Se debe destacar que gracias a los avances tecnológicos en el análisis del patrón de la marcha, se ha podido mostrar que esta es un patrón de movimiento rítmico y coordinado entre los miembros de los animales vertebrados, que implica una secuencia de flexión y extensión de las extremidades en un ciclo continuo (Guyton y Hall, 2021).

El patrón de la marcha se puede estudiar a partir de cuatro fases: la flexión (F), la primera extensión (E1), la segunda extensión (E2) y la tercera extensión (E3). Las fases F y E1 componen lo que se conoce como la fase de balanceo, la cual se produce mientras el pie no se encuentra en contacto con el suelo, y las fases E2 y E3 componen la denominada fase de soporte, en la que el pie se encuentra tocando el suelo (Kandel et al., 2021).



**Figura 1. Las cuatro fases del ciclo de la marcha.** Se ilustra el ciclo motor de un gato durante el patrón de la marcha, cuyas fases se clasifican en la fase de balanceo (F y E1) y en la fase de soporte (E2 y E3; Modificado de Kandel, 2021).

Aunque el patrón de la marcha en los animales cuadrúpedos claramente difiere de la marcha bípeda del humano, la base conceptual para su análisis es análoga entre ambas, ya que cuando se tiene una lesión de la extremidad o algún déficit nervioso, se obtiene como resultado un patrón de la marcha alterado. Adicionalmente, diversos mecanismos compensatorios de la marcha son compartidos por cuadrúpedos y bípedos, como es el patrón de los pasos cuando se arrastra una extremidad también denominada cojera (Jacobs et al., 2014).

El patrón de la marcha en los roedores es de suma importancia debido a que existe una gran variedad de modelos murinos utilizados para la investigación de enfermedades y trastornos de la locomoción; así como para evaluar la eficacia y seguridad de nuevas opciones terapéuticas (Lakes y Allen, 2016). Sin embargo, una de las principales limitaciones radica en la incapacidad de estos animales para expresar el dolor o malestar de manera explícita, aunado a que la velocidad naturalmente elevada de la marcha en los roedores representa un desafío adicional, ya que puede complicar la captura detallada y el análisis de patrones específicos de movimiento y postura (Lakes y Allen, 2016).

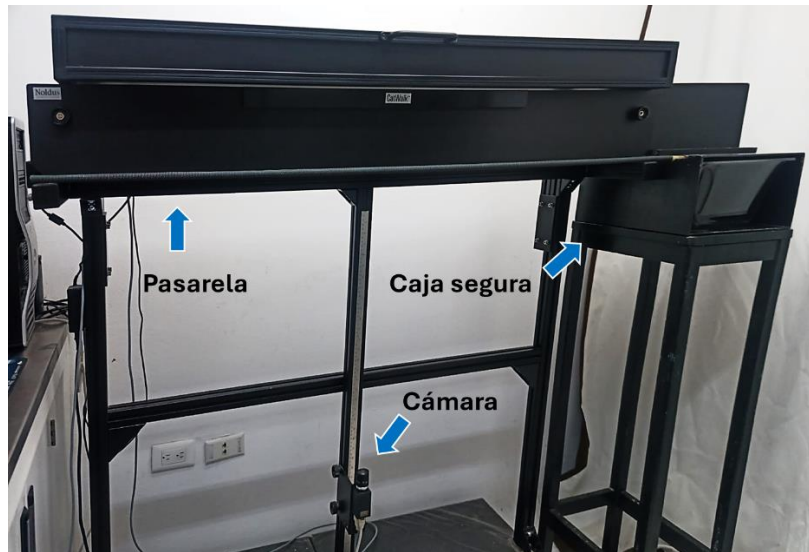
Lo anterior respalda la utilización de equipos cada vez más sofisticados para el análisis del patrón de la marcha, mediante la integración de las nuevas tecnologías como son el uso de grabación de video a distintas velocidades y las plataformas capaces de identificar el contacto de las extremidades con una superficie en la fase

de soporte, ya que esto es fundamental para determinar el patrón de la marcha y analizar sus alteraciones.

### 1.2.1. Equipo de pasarela CatWalk para el análisis de la marcha.

El sistema tipo pasarela denominado CatWalk™ fabricado por la empresa Noldus Technologies de los Países Bajos, permite la obtención y el análisis de videos de la marcha en roedores, de los que se extraen más de 200 parámetros espacio-temporales una vez que se han identificado todas las huellas después de pasar a través de una pasarela de 120 cm de largo (Timotius et al., 2023). Durante la prueba, el animal se desplaza libremente sobre una pasarela con paredes de acrílico negro de 5 mm de espesor, el techo contiene una lámpara de diodos emisores de luz roja, y el piso es una plataforma de vidrio de 6 mm de grosor. Al final su recorrido, el animal llega a la caja de recompensa donde encuentra un reforzador positivo para motivar su paso a través de la pasarela, y todo este recorrido es grabado con una cámara de alta velocidad de la marca Gevicam modelo GP-2360C (EUA) ubicada en la parte inferior de la plataforma (véase Figura 2).

La tecnología de iluminación LED verde se refleja internamente en la placa de vidrio, excepto en los puntos de contacto, lo cual permite que solo las huellas durante el soporte sean captadas y analizadas por el programa de cómputo, asegurando una alta precisión en la identificación de los parámetros de la marcha (van den Heuvel, 2023).



**Figura 2. Vista anterior del equipo tipo pasarela CatWalk y sus componentes.**

El equipo se conforma de una pasarela donde la rata camina hasta llegar a la caja de recompensa en la que se encuentra un reforzador positivo para impulsar la caminata que queda grabada por la cámara de alta velocidad ubicada por debajo de la pasarela.

Este equipo ha sido utilizado para la investigación de enfermedades o lesiones relacionadas con el sistema nervioso y el control del patrón de la marcha, como son la lesión de la médula espinal, la artritis, la enfermedad de Parkinson, la lesión cerebral traumática, la ataxia, entre muchas otras (Timotius et al., 2023). Cabe mencionar que el sistema CatWalk es el equipo comercial más utilizado en estudios publicados sobre la marcha, lo que da soporte a su confiabilidad y replicabilidad, y es el único que se actualiza constantemente y que brinda soporte técnico (Timotius et al., 2023).

### 1.3. Ataxia.

La ataxia es un trastorno neurológico que afecta la coordinación y el equilibrio debido a una disfunción del cerebelo y sus conexiones, esto provoca que los pacientes con ataxia presenten una marcha inestable y dificultades para realizar movimientos precisos (Manto et al., 2023). Sus causas son resultado de una

variedad de factores que van desde enfermedades neurodegenerativas, hasta eventos agudos como son los accidentes cerebro-vasculares (Manto et al., 2023).

Las alteraciones motoras que caracterizan a la ataxia se pueden enlistar de la siguiente manera:

- Dismetría: Es la incapacidad de realizar los movimientos con las métricas adecuadas, es decir, los pacientes pueden presentar hipermetría, esto es movimientos excesivos; o hipometría, que son movimientos insuficientes.
- Temblor: Es una oscilación involuntaria y rítmica que aparece durante la ejecución de un movimiento.
- Disartria atáxica: Es un trastorno del habla que se caracteriza por una articulación imprecisa e irregular del lenguaje.
- Lateropulsión: Es una inclinación o desvío del cuerpo hacia un lado (Manto, 2022).

Debido a estas alteraciones motoras, encontramos características distintivas de la marcha atáxica:

- Reducción de la velocidad y la cadencia del patrón de la marcha: los pasos de los pacientes con ataxia son mas lentos y con menor frecuencia por minuto.
- Disminución de la longitud de la zancada: los pasos son más cortos.
- Aumento de la base de soporte: como un mecanismo de compensación de la inestabilidad, los pacientes caminan con una base de sustentación más amplia, es decir, con las piernas y los pies más separados.
- Aumento en la duración de la fase de soporte: los pacientes pasan mas tiempo con los pies en contacto con el suelo.
- Reducción de la fase de balanceo: Los pacientes pasan menos tiempo con los pies despegados del suelo (Buckley et al., 2018).

## 2. Leucodistrofias.

La palabra leucodistrofía proviene del latín *leuko*, que significa blanco, y *distrofia*, que significa crecimiento imperfecto (The Children's Hospital of Philadelphia, 2020). Las leucodistrofias son un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas raras que afectan la materia blanca del sistema nervioso central, específicamente la mielina, cuya alteración interrumpe la transmisión del impulso saltatorio nervioso provocando una amplia variedad de síntomas neurológicos que varían en gravedad y en la edad de inicio (Bonkowsky et al., 2021).

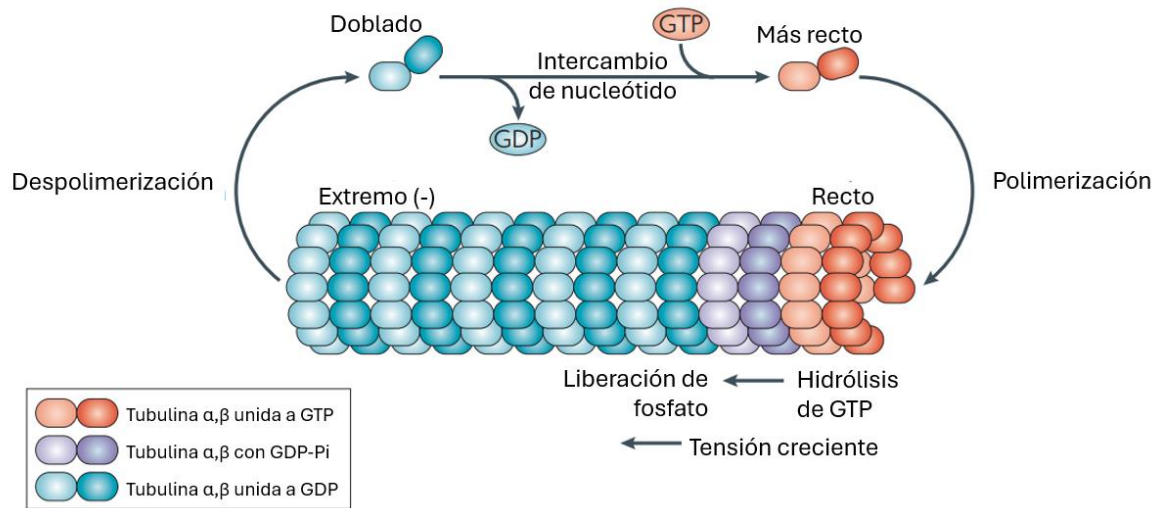
Usualmente, las leucodistrofias se clasifican según sus características clínicas y de imagenología (Bonkowsky et al., 2021), principalmente la resonancia magnética que ha permitido el primer diagnóstico al evaluar la composición de la mielina (Matchar et al., 2004). Sin embargo, los avances en las pruebas genéticas han llevado a una comprensión más profunda de estas enfermedades (Adang et al., 2024), revelando que las mutaciones en genes que codifican para diversas proteínas, incluidas las tubulinas, pueden ser clasificadas dentro de las leucodistrofias (Nahhas et al., 2016).

### 2.1. Tubulinopatías.

Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de tubulina se ensamblan para formar un heterodímero estable que constituye la unidad básica del microtúbulo (Desai y Mitchison, 1997). Estos dímeros se asocian longitudinalmente para generar protofilamentos lineales y trece de ellos se ensamblan lateralmente para crear un microtúbulo, el cual presenta polaridad inherente con un extremo "más" de crecimiento rápido y un extremo "menos" de crecimiento lento, lo que es determinado por la orientación de los dímeros, siendo la subunidad  $\beta$  la que apunta hacia el extremo "más" (Desai y Mitchison, 1997).

La longitud y estabilidad de los microtúbulos se regula por su ensamblaje y desensamblaje en un proceso conocido como inestabilidad dinámica, la cual alterna entre fases de polimerización y despolimerización que requieren energía derivada

de la hidrólisis del guanosín trifosfato (GTP), el cual ocurre cuando el GTP, unido a la subunidad  $\beta$ , se convierte en guanosín difosfato (GDP) tras la incorporación del dímero al microtúbulo, esto debilita las uniones entre los dímeros facilitando su desensamblaje (véase Figura 3; Howard y Hyman, 2009).



**Figura 3. Ciclo de polimerización y despolimerización de un microtúbulo.** El heterodímero de tubulina unido a GDP se encuentra doblado en el citoplasma, y el intercambio del nucleótido GDP por GTP vuelve más recto al heterodímero. Este se endereza completamente cuando se une al microtúbulo tras la polimerización. Después de la hidrólisis de GTP, el dímero de tubulina-GDP se empieza a tensionar y esta tensión es la que favorece el proceso de despolimerización (modificado de Howard y Hyman, 2009)

La estabilidad de los microtúbulos favorece el funcionamiento eficiente de las proteínas motoras llamadas kinesinas y dineínas, las cuales utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para moverse a lo largo de los microtúbulos, transportando diversas cargas como orgánulos, vesículas y complejos proteicos, pero se distinguen por sus direcciones de movimiento (Vale, 2003). Las kinesinas generalmente se mueven del extremo menos al extremo más transportando del núcleo a la periferia, mientras que las dineínas se mueven en el sentido contrario, del extremo más al extremo menos transportando de la periferia al núcleo (Vale, 2003).

Las tubulinopatías son un grupo diverso de trastornos causados por mutaciones en los genes de las tubulinas, lo que conlleva a una disfunción de los microtúbulos y, en consecuencia a una amplia gama de trastornos del desarrollo neurológico (Maillard et al., 2023). Uno de los problemas que pueden generar las tubulinopatías es el transporte axonal interrumpido, esto quiere decir que, los microtúbulos al actuar como las vías para el transporte de proteínas esenciales a lo largo de los axones, no completan de manera adecuada su función (Maillard et al., 2023)

Dentro de las tubulinopatías que afectan a la sustancia blanca se encuentran las relacionadas con el gen tubulina  $\beta$ 4a (*TUBB4A*) que codifica para la proteína tubulina  $\beta$ 4a (*TUBB4A*), entre las que se incluye la enfermedad llamada hipomielinización con atrofia de los ganglios basales y cerebelo (de sus siglas en inglés H-ABC; Nahhas et al., 2016).

## 2.2. Enfermedad H-ABC.

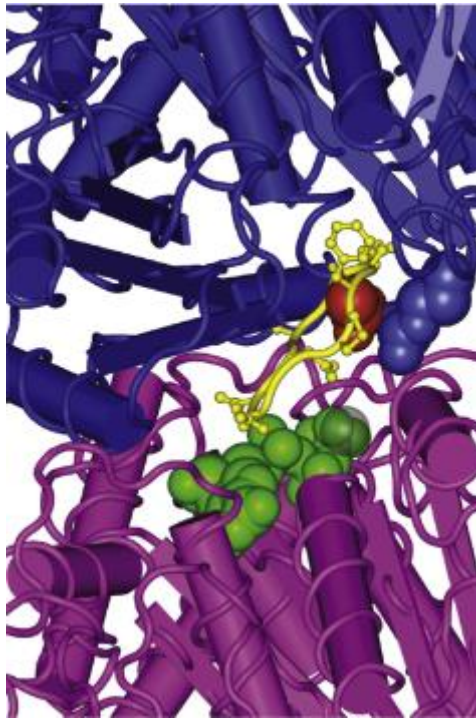
La enfermedad H-ABC es una tubulinopatía rara que se caracteriza por una deficiencia de mielina asociada a atrofia de los ganglios basales, especialmente el putamen, y atrofia cerebelosa, identificada por primera vez en el año 2002 mediante estudios de resonancia magnética que se caracterizan por los hallazgos de hipomielinización de los principales tractos del encéfalo como el cuerpo calloso, la comisura anterior o los pedúnculos cerebelosos (Hamilton et al., 2014). En 2013, la secuenciación del exoma completo de 11 pacientes con H-ABC reveló que todos tenían una mutación *de novo* en el gen de la *TUBB4A* (Simons et al., 2013). Este hallazgo marcó un paso importante en la comprensión de la enfermedad y sentó las bases para nuevas formas de investigación y desarrollo de posibles tratamientos.

### 2.2.1. Fisiopatología.

Diferentes mutaciones en el gen que codifica para la *TUBB4A* pueden tener efectos específicos en la morfología y la expresión génica (Curiel et al., 2017). La mutación

más común de la H-ABC es p.Asp249Asn, esta altera la morfología de las neuronas y de los oligodendrocitos, ya que la mayoría de la tubulina  $\beta$ 4A se expresan en los oligodendrocitos aproximadamente en un 70% y el resto en las neuronas, lo que se traduce en una afectación combinada en ambos tipos celulares (Simons et al., 2013).

Se ha mostrado que la mutación p.Asp249Asn se encuentra dentro del bucle T7 de la proteína TUBB4A, una región fundamental para la interacción longitudinal entre las subunidades de tubulina, para la formación de los heterodímeros de alfa-beta tubulina y el ensamblaje de los microtúbulos (véase Figura 4; Simons et al., 2013).



**Figura 4. Vista magnificada de la interfaz intradimérica que muestra el papel de Asp249 en la coordinación de la interacción entre el bucle T7 y el guanósín trifosfato (GTP) unido a la  $\alpha$ -tubulina. Se puede observar GTP (verde) unido en la interfaz de  $\alpha$ -tubulina (magenta) y  $\beta$ -tubulina (azul). El residuo Asp249 se muestra como esferas rojas, su socio de interacción Arg2 se muestra como esferas azules, y el resto del bucle T7 se muestra en amarillo (modificado de Simons et al., 2013).**

Estudios *in vitro* han demostrado que la mutación p.Asp249Asn provoca anomalías morfológicas en las neuronas granulares del cerebelo. Estas neuronas presentan axones más cortos, un menor número de dendritas y una menor ramificación de sus arborizaciones dendríticas (Curiel et al., 2017).

La afectación neuronal puede contribuir a la atrofia de los ganglios basales y el cerebelo, mientras que la disfunción de los oligodendrocitos da como resultado una hipomielinización (Hamilton et al., 2014). La gravedad y el espectro de síntomas clínicos en la H-ABC dependen del tipo de mutación en la TUBB4A (Hamilton et al., 2014; Krajka et al., 2022).

### 2.2.2. Signos y síntomas.

Los pacientes que presentan la enfermedad H-ABC se han caracterizado principalmente por los siguientes hallazgos imagenológicos:

- Hipomielinización: Es la característica distintiva de H-ABC y se observa como una disminución de la señal T1 y T2 en la sustancia blanca del cerebro en las imágenes de resonancia magnética.
- Atrofia de los ganglios basales: Se observa principalmente en el putamen, y se manifiesta como una reducción del tamaño de dichas estructuras.
- Atrofia cerebelosa: Afecta especialmente al vermis cerebeloso y se encuentra una disminución del tamaño del cerebelo.
- Adelgazamiento del cuerpo calloso: En algunos casos, se puede observar un adelgazamiento del cuerpo calloso (Alata et al., 2021; Hamilton et al., 2014; Simons et al., 2013).

En cuanto a los síntomas que presentan estos pacientes destacan los nombrados en el siguiente listado:

- Distonía.
- Temblor.
- Espasticidad.
- Ataxia.

- Discapacidad Intelectual.
- Convulsiones.
- Problemas de crecimiento, baja estatura o bajo peso (Hamilton et al., 2014; Tonducci et al., 2016).

### 2.2.3. Diagnóstico y tratamiento.

El primer diagnóstico de la enfermedad H-ABC se realiza basado en los hallazgos clínicos e imagenológicos previamente mencionados. Una vez que se tiene este diagnóstico, se debe de confirmar mediante pruebas genéticas la secuenciación del exoma o de todo el genoma mediante la identificación de una de las variantes patógenas del gen *TUBB4A* (Simons et al., 2013).

En cuanto al tratamiento, no existe actualmente una cura para la enfermedad H-ABC, por lo que el tratamiento está basado en el manejo de los síntomas de manera rutinaria y la prevención de complicaciones secundarias, así como el apoyo a los familiares (Nahhas et al., 2016).

Algunas de las indicaciones para la prevención de complicaciones secundarias son:

- Se recomiendan suplementos de calcio y vitamina D para prevenir la osteoporosis.
- El cuidado de la piel y el reposicionamiento frecuente son esenciales para prevenir las úlceras por presión en pacientes con movilidad reducida.
- Se recomienda la vacunación anual contra la influenza y COVID-19.
- Prevención de caídas, el equipo adaptable y la fisioterapia pueden ayudar a prevenir lesiones secundarias (Nahhas et al., 2016; Simons et al., 2013).

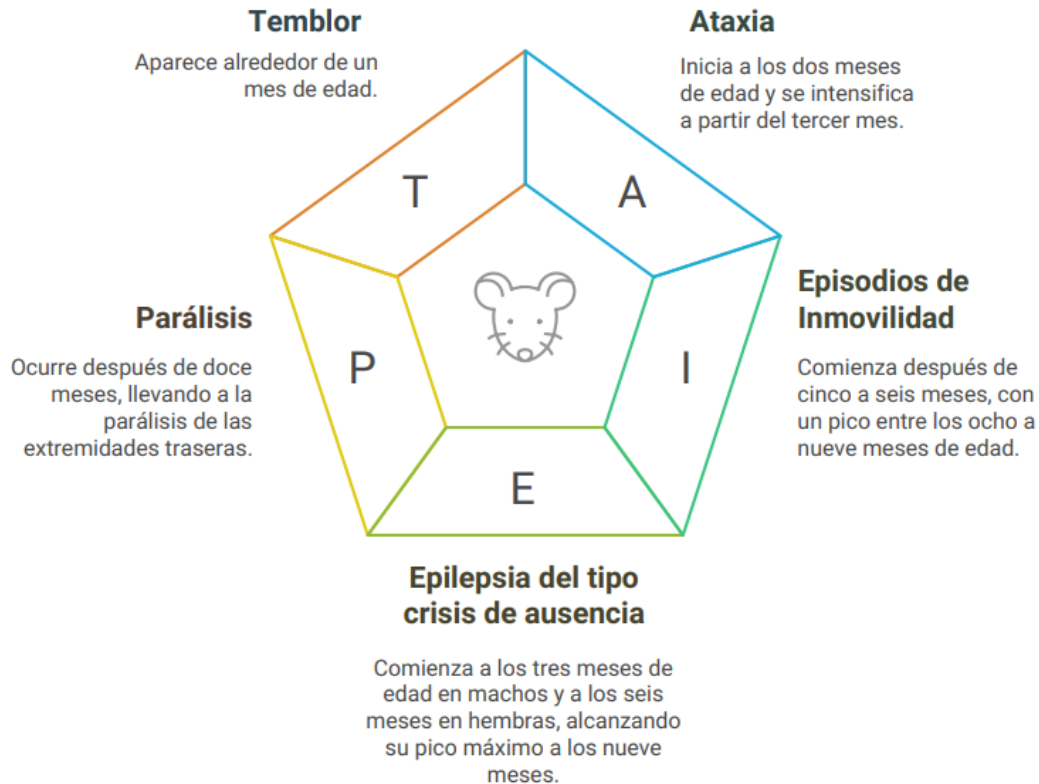
En cuanto al apoyo a la familia se puede mencionar la asistencia a terapia psicológica y la asistencia a grupos de ayuda como apoyo psicosocial (Nahhas et al., 2016).

### 2.3. La rata *taiep* como un modelo de H-ABC.

La rata *taiep* es el primer modelo animal con una alta expectativa de vida para analizar la enfermedad H-ABC (Cortés et al., 2005).

La rata *taiep* se originó como una mutación espontánea dentro 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 durante el proceso de selección para obtener una rata con una alta frecuencia de bostezos espontáneos (Urbá-Holmgren et al., 1990). Durante este proceso, se obtuvo que una camada de la generación F4 presentaban un temblor fino en la cola y la parte proximal de las extremidades posteriores al destetarlas al mes de edad (Holmgren et al., 1989).

A través de cruzamientos entre mutantes y sanos, se estableció la rata *taiep*, nombre que proviene del acrónimo de los signos motores progresivos que presenta a lo largo de su vida (Holmgren et al., 1989):



**Figura 5. Evolución del conjunto de signos en la rata *taiep*.** El nombre de la rata *taiep* es el acrónimo de los signos motores progresivos que presenta. Se incluyen las edades en las que se presenta cada signo (Hernández Alvarado, 2021; Holmgren et al., 1989).

La mutación genética que causa este síndrome se hereda de forma autosómica recesiva y se ha localizado en el gen *tubb4a* que codifica para la tubulina  $\beta 4A$  (Garduno-Robles et al., 2020; Holmgren et al., 1989). Esta mutación cambia una alanina por treonina en la posición 302 (Ala302Thr), esta región, a pesar de no encontrarse en la interface entre las subunidades de tubulina, es esencial para la actividad con otras proteínas que regulan la dinámica de interacción de los microtúbulos (Garduno-Robles et al., 2020; Lopez-Juarez et al., 2021).

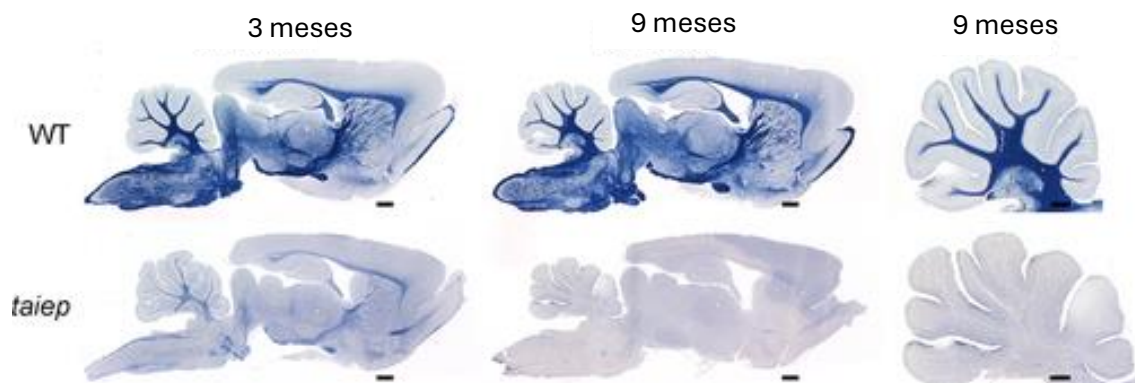
Esta mutación lo que provoca es una acumulación anormal de microtúbulos en los oligodendrocitos, específicamente en el cuerpo celular y en las prolongaciones (Duncan y cols., 1992). Esta acumulación no se encuentra al inicio de la mielinización del nervio óptico a los siete días de edad, pero se observa en la médula espinal a edades tempranas, debido a la mielinización activa en etapas tempranas del desarrollo (Lunn et al., 1997).

La acumulación de microtúbulos en los oligodendrocitos también afecta al transporte de proteínas y ácido ribonucleico mensajero (ARNm) indispensables para la formación y el mantenimiento correcto de la mielina (Cortés et al., 2005). En la rata *taiep* se ha reportado una disminución progresiva en los niveles de proteínas específicas de la mielina como son: la proteína básica de la mielina (PBM), la proteína proteolípida (PLP), la 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa y la glicoproteína asociada a la mielina (GAM; Möller et al., 1997).

Adicionalmente, Eguibar y colaboradores en 2012, reportaron que las ratas *taiep* de ocho meses de edad tienen una disminución significativa en el contenido de lípidos en varias áreas del sistema nervioso central, con un 82% de disminución en el tronco encefálico, un 72% de disminución en la médula espinal, y un 50% de disminución en la corteza cerebral y el cerebelo (Eguibar et al., 2012).

Estas alteraciones en conjunto, conducen a una hipomielinización inicial seguida de una desmielinización progresiva, afectando principalmente al cerebelo, el cuerpo calloso, los ganglios basales y la médula espinal (Alata et al., 2021; Garduno-Robles et al., 2020).

El examen macroscópico de cortes de cerebro en el plano parasagital de ratas *taiep* de dos a tres meses de edad mostró que la mielina estaba presente en los principales tractos de la sustancia blanca, por ejemplo, a nivel de la médula espinal y la folia cerebelosas y en el cuerpo calloso, pero con una clara hipomielinización (Lunn et al., 1997). Sin embargo, entre los nueve y los doce meses, se presenta una pérdida sustancial de la mielina en todo el cerebro debido a la desmielinización progresiva (véase Figura 6). Las principales anomalías observadas en las secciones cerebrales de *taiep* fueron la hipomielinización, seguida de una desmielinización sin que se presente su gliosis reactiva (León-Chávez et al., 2001).



**Figura 6. Cortes parasagittales del cerebro y del cerebelo de ratas Sprague-Dawley (WT) y las que corresponden a ratas *taiep*.** En los primeros tres meses de vida, las ratas *taiep* presentan hipomielinización y desmielinización que empeora con la edad. Escala de la barra: cerebelo 0.5 mm, cerebro 1 mm (modificado de Duncan et al., 2017)

Debido a que la enfermedad H-ABC en humanos también es originada por una mutación en el gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina 4A, los hallazgos clínicos y de imagen encontrados en la rata *taiep* y los encontrados en pacientes que padecen H-ABC son muy similares en los siguientes aspectos:

- Hipomielinización: Tanto la rata *taiep* como los pacientes con H-ABC presentan una deficiencia de mielina en el sistema nervioso central.
- Atrofia cerebelosa: El cerebelo de las ratas *taiep* se reduce con la edad, similar a lo que se ha reportado en pacientes con H-ABC.
- Atrofia de los ganglios basales: La atrofia de estas estructuras caracterizan a los pacientes y a este modelo animal.
- Ataxia: se presenta en la rata *taiep* y en los pacientes con H-ABC desde etapas tempranas del desarrollo.
- Temblor: El temblor es el primer signo que aparece en la rata *taiep* y también se puede tener en pacientes con H-ABC (Alata et al., 2021; Garduno-Robles et al., 2020).

Lo anterior aporta evidencia que soporta que la rata *taiep* es un modelo de la tubulinopatía H-ABC, el cual ofrece diferentes ventajas que respaldan su uso en la investigación, como lo es su expectativa de vida de 18 a 24 meses, no requiere de cuidados especiales, y la amplia experiencia que tenemos en su manejo, adicionalmente:

- La rata *taiep* permite realizar estudios longitudinales para analizar la progresión de la enfermedad, ya que tiene una expectativa de vida normal para ratas de laboratorio, entre 18 a 24 meses.
- Es un modelo valioso para probar nuevas terapias farmacológicas o genéticas para la H-ABC.
- Facilita la investigación de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la H-ABC.
- Debido a que no se le realiza ninguna manipulación genética a esta rata, nos permite evaluar la enfermedad desde el nacimiento hasta su muerte natural (Cortés et al., 2005; Eguibar y Cortés, 2010; Garduno-Robles et al., 2020).

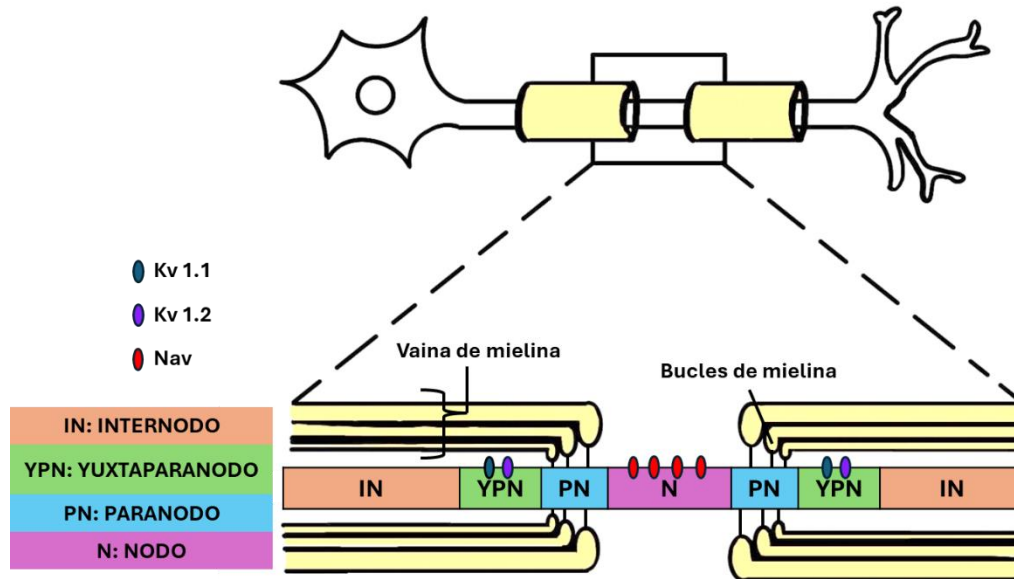
### 3. Los canales de potasio tipo Kv 1.1 y 1.2.

Los canales de potasio Kv1.1 y Kv1.2 son subunidades de canales de potasio dependientes de voltaje que pertenecen a la subfamilia Kv1, específicamente son canales de rectificación tardía, lo que significa que se activan en respuesta a la despolarización de la membrana y contribuyen a la repolarización de la membrana después de un potencial de acción (Wang et al., 1993).

Estos canales son proteínas transmembrana que se ensamblan como tetrámeros, y cada subunidad está compuesta por seis dominios transmembranales con la región del poro formada por los dominios S5 y S6 de las cuatro subunidades que lo conforman (McGahan y Keener, 2022).

Las subunidades Kv1.1 y Kv1.2 pueden formar canales homoméricos, es decir, canales compuestos por cuatro subunidades idénticas, o pueden formar canales heteroméricos, compuestos por una combinación de las subunidades Kv1.1 y Kv1.2 (McGahan y Keener, 2022).

En el sistema nervioso central encontramos las zonas con más alta densidad de canales Kv 1.1 y 1.2, particularmente en la región yuxtaparanodal (YPN) de los axones (véase Figura 7) , en los segmentos iniciales del axón, en el bulbo olfatorio primario, en el hipocampo y en las células en forma de canasta del cerebelo (Lorincz y Nusser, 2008; Robbins y Tempel, 2012). Además, se ha reportado una baja expresión de canales Kv 1.1 en el túbulo contorneado distal (Glaudemans et al., 2009), y en las aurículas del corazón (Glasscock et al., 2015).



**Figura 7. Regiones del axón alrededor de un nodo de Ranvier.** Se muestran las diferentes regiones circundantes al nodo (N): el paranodo (PN), el yuxtaparanodo (YPN) y el internodo (IN), así como su respectiva expresión de canales de potasio (Kv 1.1 y Kv 1.2) y sodio voltaje-dependientes (Nav).

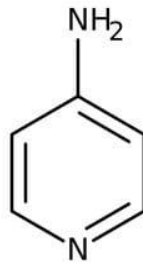
Los canales Kv 1.1 y Kv 1.2 se ha demostrado que regulan los patrones de disparo de los potenciales de acción en las regiones del sistema nervioso central en las que se encuentran, contribuyen a la fase de repolarización del potencial de acción, además regulan la duración del potencial de acción (Judge y Bever, 2006)

## 4. La 4-Aminopiridina.

La 4-aminopiridina (4-AP) es un bloqueador no selectivo de los canales de potasio voltaje-dependientes con valores de  $IC_{50}$  de  $590 \mu M$  y  $290 \mu M$  para Kv 1.1 y Kv 1.2, respectivamente (Gutman et al., 2005). Es un fármaco liposoluble capaz de cruzar la barrera hematoencefálica utilizado típicamente para reducir la fase de hiperpolarización del potencial de acción en axones no mielinizados (European Medicines Agency, 2011).

#### 4.1. Composición química.

El nombre químico de 4-AP es piridina-4-amina, ya que contiene un anillo de piridina acoplado a un grupo amino en la posición 4 (véase Figura 8), cuya fórmula molecular es  $C_5H_6N_2$  con una masa molecular de 94.11 g/mol, se encuentra en forma de cristales blanquecinos solubles en agua a concentraciones hasta 83 g/L (Sigma-Aldrich, EUA 2024)

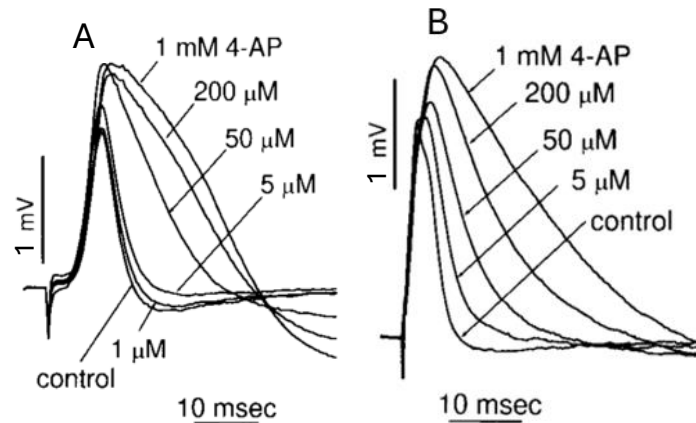


**Figura 8. Estructura química de la 4-aminopiridina.** Este fármaco está conformado por una piridina y un grupo amino en la posición 4 como se ilustra.

#### 4.2. Mecanismo de acción de la 4-aminopiridina.

La 4-AP es un bloqueador de los canales de potasio Kv 1.1 y 1.2, reduce la salida de potasio de la neurona en la etapa de hiperpolarización, provocando que el periodo refractario relativo se reduzca y se pueda generar un nuevo potencial de acción de manera más rápida (European Medicines Agency, 2011).

También se obtiene un aumento en la duración del potencial de acción, lo que provoca un aumento en el tiempo en que la neurona permanece despolarizada. Esto provoca que exista un mayor influjo de  $Ca^{+2}$  a través de los canales de calcio voltaje-dependientes en las terminales presinápticas y por lo tanto un aumento en la liberación de los neurotransmisores (Véase Figura 9; Verbny et al., 2002; Waddell et al., 1989).



**Figura 9. Efectos de la 4-aminopiridina (4-AP) en los potenciales de acción compuestos en el nervio óptico.** Se muestran los potenciales de acción compuestos a diferentes dosis de 4-AP en preparaciones de nervio óptico de ratón neonatal A) y adulto B). Note que los efectos varían con la edad del ratón (Modificado de Verbny et al., 2002).

Este mecanismo es beneficioso en condiciones de desmielinización y demielinización, ya que se produce una salida excesiva de potasio causada por la exposición de los canales Kv 1.1 y 1.2 hacia el espacio extracelular, lo que conduce a un exceso de la hiperpolarización y una interrupción de la conducción nerviosa (European Medicines Agency, 2011).

### 4.3. Farmacodinamia.

La prolongación del potencial de acción genera una corriente entrante de  $\text{Ca}^{2+}$  superior a lo normal en las terminales presinápticas, lo que conlleva a un aumento en la liberación de neurotransmisores desde las terminales nerviosas y a una mayor transmisión neuro-neuronal o neuro-muscular (Kostadinova y Danchev, 2019). Además, se ha demostrado que la administración de 4-AP produce un incremento dependiente de la dosis en la cantidad de acetilcolina liberada por las terminales

nerviosas neuromusculares (Paskov et al., 1986). La 4-AP también aumenta la generación de potenciales de acción y regula la descarga repetitiva de las células piramidales corticales, estimulando la liberación de glutamato y acetilcolina (Kostadinova y Danchev, 2019).

#### 4.4. Farmacocinética.

La farmacocinética de 4-AP sigue un modelo lineal, lo que indica que se absorbe de manera proporcional a la dosis, sin que se tenga una acumulación del fármaco después de dosis repetidas y adicionalmente no se une a las proteínas plasmáticas, lo que aumenta su biodisponibilidad (European Medicines Agency, 2011).

En un estudio realizado por Sindhurakar y colaboradores en 2017, midiendo las concentraciones plasmáticas de 4-AP en ratas Sprague-Dawley durante 5 horas posteriores a la administración de bolos de 0.48 mg/Kg o de 0.32 mg/Kg administrados por vía intraperitoneal, se mostró que con ambas dosis el pico plasmático se da antes de los primeros 90 minutos (Sindhurakar et al., 2017), similar a lo encontrado en humanos con picos plasmáticos alrededor de 1.3 horas después de su administración por vía oral (European Medicines Agency, 2011)

Este fármaco es eliminado casi en su totalidad a través de la orina con una vida media de 6 horas y la mayor parte de la fracción recuperada corresponde al fármaco sin cambios, dado que no se metaboliza (European Medicines Agency, 2011). En la orina se han encontrado dos metabolitos inactivos, la 3-hidroxi-4-aminopiridina y un compuesto sulfatado, estos mostraron un efecto 30 veces menor para bloquear los canales de potasio por lo que se asume que no contribuyen a la actividad farmacológica de la 4-AP. También se obtuvo el metabolito 4-AP N-óxido en ratas, pero aún no se ha confirmado la presencia de este metabolito en humanos (European Medicines Agency, 2011).

## 4.5. Toxicología.

Los estudios de seguridad farmacológica de la 4-AP en animales han mostrado un perfil de seguridad aceptable y amplio. La toxicidad se evaluó mediante estudios de dosis única por vía oral en ratas, conejos y perros, y estudios con administración de dosis repetidas en ratones, ratas y perros durante períodos de hasta doce meses. En ratas, la dosis letal 50 fue de entre 14 mg/Kg y 22 mg/Kg, pero incrementa hasta 40 mg/Kg cuando la dosis diaria se divide en 4 sub-dosis administradas cada 6 horas; mientras que, en conejos fue de 23 mg/Kg y en perros no se detectaron toxicidades evidentes con dosis de hasta 5 mg/Kg administradas cuatro veces al día (European Medicines Agency, 2011).

Los estudios de dosis repetidas en ratas y perros mostraron efectos secundarios en el sistema nervioso central, tales como temblores, convulsiones y otros síntomas neurológicos que disminuyen con el tiempo o tras suspender el tratamiento. Estos efectos adversos están relacionados con la actividad farmacológica de la 4-AP y se presentan en su mayoría poco después de la administración de dosis mayores a los 2 mg/Kg en ratas (Kostadinova y Danchev, 2019; Smith et al., 2000).

Adicionalmente, la 4-AP fue evaluada para determinar potenciales efectos genotóxicos y carcinogénicos, y en los estudios realizados no se obtuvo evidencia de genotoxicidad en pruebas *in vitro*, ni de efectos neoplásicos significativos en estudios de dos años de seguimiento en ratones y ratas (Kostadinova y Danchev, 2019).

## ANTECEDENTES.

La rata *taiep* es un mutante de tubulinas que se originó por una mutación espontánea en el proceso de selección endogámica de ratas con una alta frecuencia de bostezo (Urbá-Holmgren et al., 1990). Recibe su nombre del acrónimo de los signos motores progresivos que presenta a lo largo de su vida: temblor, ataxia, inmovilidad, epilepsia y parálisis (Holmgren et al., 1989).

La mutación presente en esta rata se ha reportado como una mutación puntual en el gen *tubb4a* que codifica para la tubulina  $\beta$ 4A (TUBB4A) presente en los oligodendrocitos, haciendo que se desarrolle una enfermedad neurológica resultado de la hipomielinización seguida de una desmielinización progresiva del cerebro, los nervios ópticos y ciertos tractos de la médula espinal (Garduno-Robles et al., 2020; Lunn et al., 1997). La acumulación progresiva de microtúbulos en los oligodendrocitos se correlacionó con el retraso en el desarrollo normal de la mielina y su posterior desmielinización (Couve et al., 1997; Duncan et al., 2017).

Asimismo, se han encontrado cambios morfológicos en la rata *taiep* que coinciden con lo encontrado en pacientes humanos que presentan la leucodistrofia hipomielinización con atrofia de los ganglios basales y cerebelo (H-ABC; Garduno-Robles et al., 2020; Lopez-Juarez et al., 2021), una enfermedad causada, de igual forma, por una mutación en el gen para la tubulina  $\beta$ 4A. Estas similitudes entre los signos y los síntomas de los pacientes con H-ABC y los de la rata *taiep*, convierte a este último en un modelo animal ideal para el estudio específico de la enfermedad H-ABC y que tiene una alta expectativa de vida, llegando a vivir de 18 a 24 meses (Cortés et al., 2005).

Actualmente, existen tres modelos animales que presentan características pertenecientes a la leucodistrofia H-ABC: la rata *taiep* y dos modelos de ratones con mutaciones en el gen *tubb4a* (*tubb4aD249N* y *tubb4aN414K*) (Fertuzinhos et al., 2022; Sase et al., 2020). A diferencia de los modelos de ratones, la rata *taiep* tiene una expectativa de vida normal, de 18 a 24 meses, lo que permite realizar estudios a lo largo del tiempo para analizar la progresión de la enfermedad y evaluar terapias

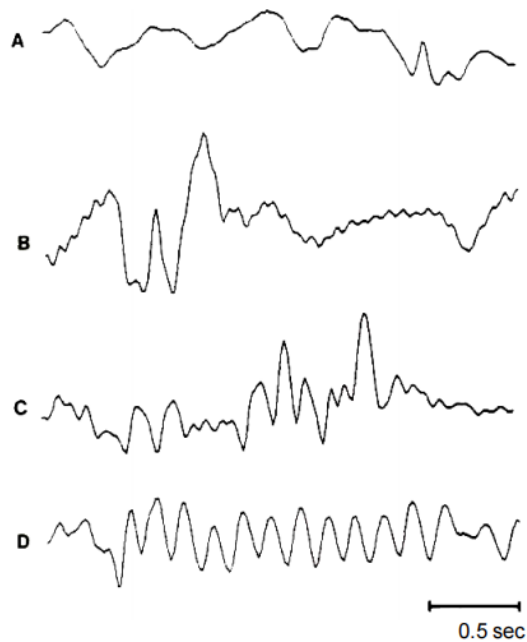
a largo plazo (Cortés et al., 2005). Adicionalmente, al ser un modelo natural y no manipulado genéticamente, la rata *taiep* ofrece la oportunidad de estudiar la enfermedad desde el nacimiento hasta la muerte natural, lo que la convierte en un modelo valioso para investigar los mecanismos moleculares y celulares subyacentes a la H-ABC.

Por otro lado, los modelos de ratones *tubb4aD249N* y *tubb4aN414K* han sido desarrollados mediante ingeniería genética para recapitular mutaciones específicas asociadas con la H-ABC en humanos. El modelo *tubb4aD249N*, que presenta una mutación en la posición 249 (Asp249Asn), muestra hipomielinización, pérdida de neuronas en el estriado y en el cerebelo, y déficits motores progresivos. Sin embargo, este modelo tiene una expectativa de vida extremadamente corta, con una supervivencia máxima de 35 a 40 días postnatales, lo que limita su utilidad para estudios a largo plazo (Sase et al., 2020).

De manera similar, el modelo *tubb4aN414K*, que presenta una mutación en la posición 414 (Asn414Lys), desarrolla hipomielinización severa y degeneración progresiva de las neuronas granulares del cerebelo, y aunque este modelo muestra una progresión más lenta que el *tubb4aD249N*, los ratones homocigotos mueren alrededor de las 7 semanas de edad (Fertuzinhos et al., 2022).

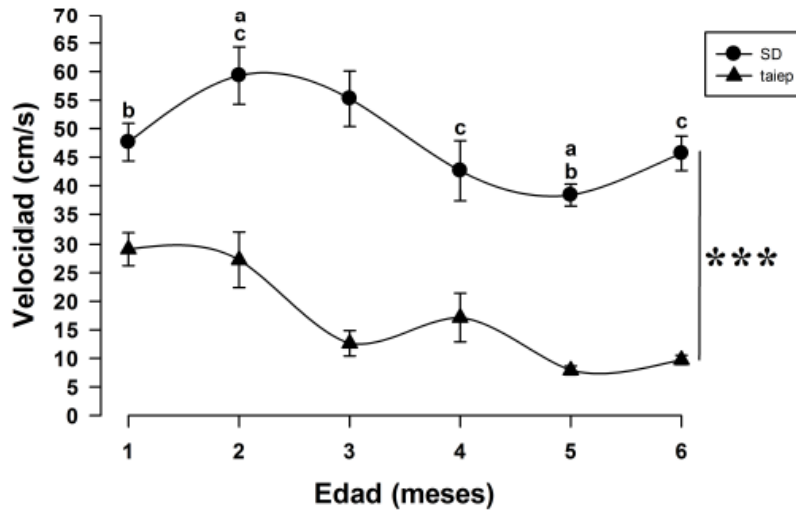
A pesar de que los modelos de ratones son útiles para estudiar los efectos específicos de mutaciones puntuales en *tubb4a*, su corta expectativa de vida impide el conocimiento detallado de la progresión de su enfermedad, a diferencia de la rata *taiep* de la cual su progresión está bien caracterizada y no requiere de cuidados especiales. Por lo tanto, la rata *taiep* sigue siendo un modelo ideal para la investigación de la H-ABC, especialmente en el contexto de estudios longitudinales y terapéuticos, como es el caso de esta tesis.

Como se mencionó anteriormente, la rata *taiep* muestra alteraciones motoras que afectan diversas funciones, incluido el patrón de la marcha. La primera anomalía caracterizada del mutante de tubulinas que afecta su conducta locomotora es el temblor, reportado por Holmgren y colaboradores desde 1989 (véase Figura 10).



**Figura 10. Registro del temblor de la rata *taiep* a diferentes edades. A)** Rata Sprague-Dawley normal a los 45 días de nacida. **B), C) y D)** Ratas *taiep* macho a las edades de 30, 60 y 9 días de edad, respectivamente. Los principales picos de temblor fueron a 14.2 Hz al primer mes de edad, a los 60 días se obtienen dos picos, el primero a 6.5 y un armónico a 11.5 Hz, y a los 90 días un pico de tan solo 6 Hz (Modificado de Holmgren et al., 1989).

Una de las características más notables de la marcha de la rata *taiep* es su lentitud en comparación con las ratas Sprague-Dawley (SD) desde el primer mes de vida volviéndose más pronunciada con la edad de los animales (Alata et al., 2021; Rocha Reyna, 2013).



**Figura 11. Velocidad promedio por edad de las ratas *taiep* respecto de las Sprague-Dawley.** El M. en C. Rocha reportó una disminución estadísticamente significativa en la velocidad promedio de las ratas *taiep* respecto a las ratas SD, y esta disminución se incrementa progresivamente con la edad de los animales (Modificado de Rocha Reyna, 2013).

Rocha también caracterizó otros elementos de la marcha en la rata *taiep* en comparación con ratas Sprague-Dawley, encontrando una disminución en la longitud de zancada, aumento del ancho de la base de soporte, fragmentación de la fase de apoyo, aumento en la fase de apoyo y la fase de balanceo de las cuatro extremidades y una disminución de la cadencia y la coordinación de la marcha (Rocha Reyna, 2013).

También en nuestro laboratorio, Juan Carlos Ahumada en el año 2020, evaluó el efecto de la administración de agentes dopaminérgicos o serotoninérgicos en el patrón de la marcha de las ratas *taiep*. Ahumada obtuvo resultados que indicaron un beneficio en la locomoción de la rata *taiep* con la administración de pramipexol, 8-OH-DPAT o quipazina ( véase Figura 12; Ahumada Juárez, 2020);

Fármaco	Receptor	Soporte	Balaceo	Longitud de zancada	Índice de regularidad	Cadencia	Velocidad	Área de contacto
Pramipexol	D2	↓	↓	↓	=	↑	↓ ↓	↑
8-OH-DPAT	5HT <sub>1A</sub>	↓	↓	=	↑	↑	=	↓
Quipacina	5HT <sub>2A</sub>	=	=	↓	↑	=	↑	↑ ↓

**Figura 12. Efectos de los agonistas serotoninérgicos o dopaminérgicos en el patrón de la marcha en ratas *taiep* macho adultas.** El análisis del patrón de la marcha muestra qué parámetros pueden disminuir (flechas rojas) o aumentar (flechas verdes) o mantenerse sin cambios respecto a las ratas *taiep* control, posterior a la inyección de cada uno de los fármacos probados (Modificado de Ahumada Juárez, 2020)

Otro de los parámetros que han sido evaluados en la rata *taiep* respecto al patrón de la marcha, es el número de ciclos completos de pasos, con el que se encontró una disminución significativa entre los 21 a 90 días postnatales (DPN) (Ahumada Juárez, 2020; Alata et al., 2021). Adicionalmente, la duración del patrón de pasos aumenta significativamente con la edad de los sujetos y es importante destacar que el índice de regularidad, que es una medida de la coordinación entre las cuatro extremidades, disminuye significativamente (Ahumada Juárez, 2020; Alata et al., 2021).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las malformaciones del desarrollo cortical debido a alteraciones en los microtúbulos pueden causar una morbilidad significativa a cualquier edad, pero la aparición más común de los síntomas varía desde la infancia hasta la edad adulta temprana, manifestándose como epilepsia, distonía, trastornos de la marcha, retraso en el desarrollo, discapacidad intelectual o parálisis cerebral (Maillard et al., 2023).

Desde el primer descubrimiento del gen *tuba1a* que codifica para la tubulina  $\alpha$ 1A (TUBA1A) en 2007 como un nuevo gen para diversas enfermedades del neurodesarrollo (véase Tabla 1), los genes que codifican para las tubulinas alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) ahora se reconocen por su importante participación en las malformaciones del desarrollo cortical, y estos trastornos actualmente se denominan colectivamente como tubulinopatías (Maillard et al., 2023).

**Tabla 1.** Lista de enfermedades del neurodesarrollo y sus tubulinas afectadas.

Enfermedad	Tubulina afectada	Descripción
<b>Agiria (liscencefalia completa)</b>	Tubulina $\alpha$ 1A Tubulina $\beta$ 2B	Ausencia total de giros cerebrales.
<b>Paquigiria (liscencefalia parcial)</b>	Tubulina $\alpha$ 1A Tubulina $\beta$ 2B	Giros cerebrales anormalmente grandes y mal definidos.
<b>Polimicrogiria</b>	Tubulina $\alpha$ 1A Tubulina $\beta$ 2B Tubulina $\beta$ 3	Cantidad excesiva de giros cerebrales pequeños y desorganizados.
<b>Microcefalia</b>	Tubulina $\alpha$ 1A Tubulina $\beta$ 2B Tubulina $\beta$ 5	Tamaño cerebral significativamente pequeño.

Se muestran las alteraciones del desarrollo cortical asociadas a mutaciones en los genes de las tubulinas, estas afectan la organización y el tamaño de los giros cerebrales (Breuss y Keays, 2014).

Las tubulinopatías entran en una clasificación de enfermedades genéticas que afectan a la materia blanca del sistema nervioso central denominadas leucodistrofias, de las cuales se reportó en un estudio basado en una población grande que la incidencia es de 1:7,663 nacidos vivos (Bonkowsky et al., 2010). Sin embargo, esta determinación dependió de su identificación clínica, por lo que es probable que haya sido subestimada debido a las complicaciones que conlleva realizar un diagnóstico preciso de estas enfermedades (Bonkowsky et al., 2010).

Recientemente, Soderholm y colaboradores (2020), en bases de datos de secuencias genómicas de leucodistrofias no específicas, reportaron una incidencia de 1:4,733 nacidos vivos (Soderholm et al., 2020). Estos datos muestran que la incidencia de leucodistrofias es mucho mayor, por lo que es necesario sensibilizar a los médicos generales, neurólogos, imagenólogos de alcanzar un diagnóstico certero.

Un estudio longitudinal basado en la revisión de historias clínicas de bases de datos de diferentes hospitales y de material publicado, que se realizó este año, reportó un total de 216 pacientes con tubulinopatía asociada al gen *tubb4a*, de los cuales 46 presentaron la mutación p.Asp249Asn clásica de la H-ABC. Los autores mencionan que el diagnóstico de tubulinopatías es complejo debido a que los síntomas iniciales pueden ser sutiles o atípicos, lo que conlleva a diagnósticos erróneos (Gavazzi et al., 2025).

En el pasado, los pacientes con leucodistrofia de causa desconocida lograron un diagnóstico en menos de un 46% de los casos después de extensas pruebas clínicas convencionales. Incluso cuando se logra un diagnóstico, este toma un promedio de 8 años y da como resultado cargos económicos por pruebas a los pacientes y aseguradoras que superan los 8,000 dólares americanos en promedio por paciente (NINDS, 2022).

Adicionalmente, existe escasa información de los mecanismos últimos causales de la enfermedad en la mayoría de las leucodistrofias de causa conocida, como es el caso de la enfermedad H-ABC, hasta ahora se da un manejo sintomático y, por lo tanto, se dispone de estándares de atención limitados para el manejo de estos

pacientes (Vanderver, 2023). De acuerdo con información del Hospital Infantil de Filadelfia en los Estados Unidos de América, el cual cuenta con un Centro de leucodistrofia reconocido a nivel mundial, no existe una cura conocida para el H-ABC, pero hay tratamientos disponibles para controlar sus síntomas (The Children's Hospital of Philadelphia, 2024). En la actualidad, sabemos que H-ABC es un defecto de los microtúbulos resultante de las mutaciones del gen *tubb4a* que afecta principalmente a los oligodendrocitos, con efectos secundarios sobre la glía que dan lugar a cambios en la vaina de mielina (Hamilton et al., 2014).

Lo anterior respalda el uso de modelos experimentales animales, ya que estos permiten aumentar el conocimiento sobre la patología del sistema nervioso central. Los estudios en la rata *taiep* como el primer modelo animal de H-ABC con una larga expectativa de vida permitirá conocer lo que la enfermedad representa y cómo pueden darse distintas opciones terapéuticas.

## JUSTIFICACIÓN.

Debido a la falta de tratamientos disponibles para la enfermedad H-ABC y en general para las leucodistrofias, proponemos como un medicamento para mejorar el patrón de la marcha a la 4-aminopiridina (4-AP), un potente bloqueador no selectivo de los canales de potasio dependientes de voltaje Kv 1.1 y Kv 1.2 (Gutman et al., 2005). Estos canales se localizan en las regiones yuxtaparanodales del axón, estas regiones se encuentran normalmente cubiertas por la vaina de mielina, sin embargo, en procesos de desmielinización, estos canales quedan expuestos al medio extraaxonal a lo largo del axón desmielinizado (Sinha et al., 2006).

Eguibar y colaboradores (2024), con este mismo fármaco, mostraron un aumento de la amplitud de los potenciales provocados somatosensoriales y redujeron sus latencias en ratas *taiep* macho a los tres meses de edad, un efecto similar a los datos obtenidos en pacientes con secciones transversales de la médula espinal (Eguibar et al., 2024). Adicionalmente, la 4-AP aumentó los episodios de ambulación en ratas *taiep*, pero no de sus desplazamientos verticales ni del número de episodios de temblor (Eguibar et al., 2024).

Empleando la 4-AP aplicada a modelos desmielinizantes, bloqueamos canales Kv 1.1 y Kv 1.2 que normalmente están cubiertos por mielina para reducir la fuga de la corriente iónica a través de estos canales, prolongando su repolarización y mejorando así la formación de potenciales de acción en los axones desmielinizados y la función neurológica motora (European Medicines Agency, 2020).

## HIPÓTESIS.

H1: La administración sistémica del bloqueador de canales de potasio 4-aminopiridina, en la rata *taiep* mejorará los parámetros de la marcha.

## OBJETIVO GENERAL.

- Evaluar el efecto que tiene la administración sistémica de 4-aminopiridina en el patrón de la marcha de la rata *taiep*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar los siguientes parámetros de la marcha en ratas *taiep* macho de  $90 \pm 2$  días postnatales (DPN), antes y después de la administración de 4-AP: duración de la fase de soporte y la fase de balanceo en extremidades anteriores y posteriores, la longitud de la zancada en extremidades anteriores y posteriores, la cadencia de la marcha, la velocidad y la coordinación de las extremidades.
- Evaluar los efectos que tiene la administración sistémica de 1, 1.5 y 2 mg/Kg de 4-AP en los parámetros de la marcha de la rata *taiep*.
- Determinar los parámetros de la marcha en ratas Sprague-Dawley antes y después de la administración de 4-AP.
- Evaluar los efectos de la administración sistémica de 2 mg/Kg de 4-AP en la marcha de ratas Sprague-Dawley machos de tres meses de edad.
- Comparar los parámetros de la marcha obtenidos de las ratas *taiep* entre sí y con los de las ratas Sprague-Dawley.
- Proponer una dosis óptima de 4-AP en función de la mejora de los parámetros de la marcha sin efectos secundarios evidentes.

# METODOLOGÍA.

## 1. Animales.

Los animales empleados fueron ocho ratas *taiep* macho de tres meses de edad para cada uno de los diferentes grupos de dosis de 4-AP, 1, 1.5 y 2 mg/Kg, y seis ratas Sprague-Dawley (SD) macho de tres meses de edad para la administración de 2 mg/Kg de 4-AP, obtenidas del Bioterio de Investigación del Laboratorio Neurofisiología de la Conducta y Control Motor del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Se mantuvieron en un cuarto con un ciclo luz-oscuridad 12:12 con encendido de la luz a las 1900 horas, en condiciones ambientales controladas  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  y humedad relativa de 40-60%. Se colocaron de 2 a 3 ratas por jaula de acrílico de 6 mm de grosor (32 cm x 47 cm x 20 cm), con libre acceso a 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 Estados Unidos de América para el cuidado y uso de animales de laboratorio (85-23, revisado en 1985). El protocolo de investigación ha sido aprobado en el CICUAL-BUAP No 000225.

## 2. Droga.

Se utilizó 4-aminopiridina obtenida del laboratorio Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido) a dosis de 1, 1.5 y 2 mg/Kg por vía intraperitoneal, diluido en agua estéril para uso inyectable (Laboratorios PiSA, México).

### 3. Análisis del patrón de la marcha.

La marcha se registró mediante el equipo tipo pasarela CatWalk™ (Noldus Technologies, Países Bajos). Se analizaron las fases de balanceo, fases de soporte, y longitud de la zancada de las extremidades anteriores y posteriores, así como la coordinación, cadencia y velocidad de la marcha.

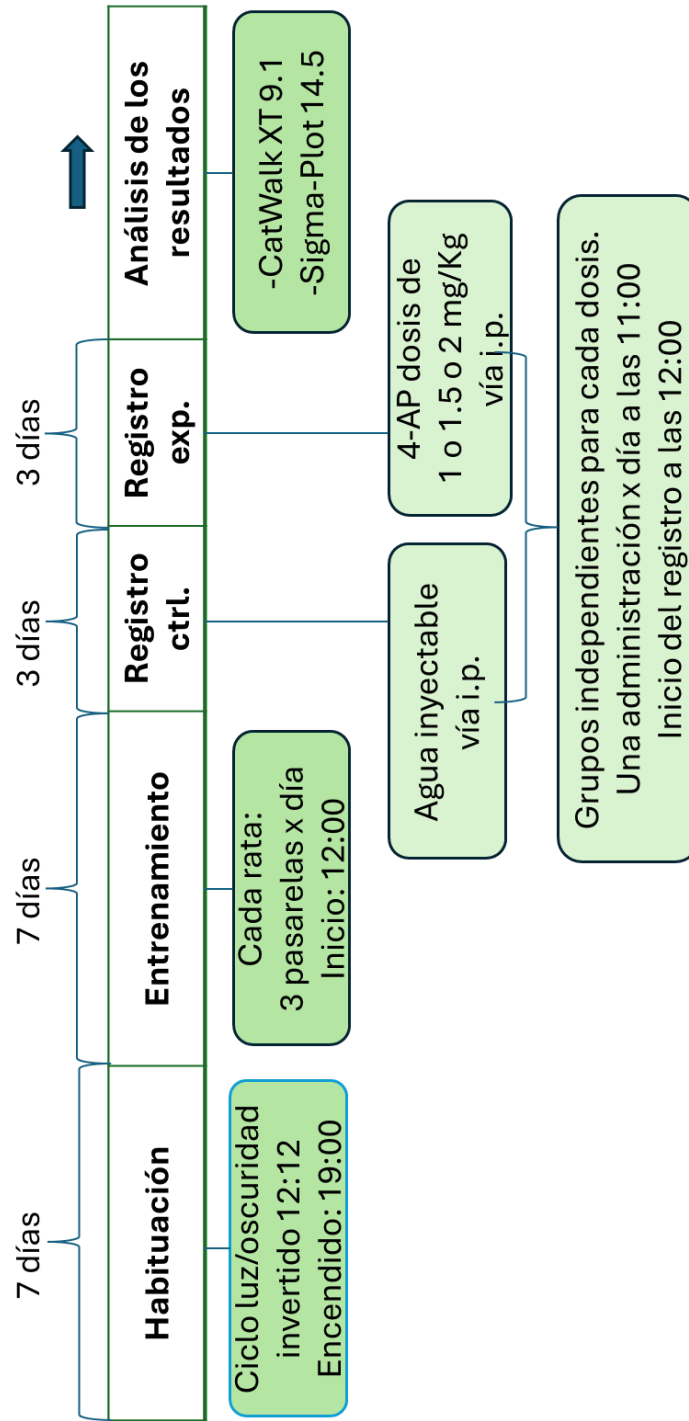
Para obtener un patrón de pasos regular, todos los animales se entrenaron tres veces al día a las en la fase oscura durante siete días seguidos antes de comenzar los registros de la marcha. Con el fin de que las ratas aprendieran la conducta de atravesar la pasarela sin detenerse. Se adaptó al CatWalk una caja de recompensa (8 cm x 24.5 cm x 15 cm) para promover el paso hasta el final de la pasarela donde a la rata se le proporcionó un cereal Froot Loops™ (Kellogg's, México) como un reforzador positivo.

Se analizaron los datos de los parámetros del patrón de la marcha mediante el programa de cómputo CatWalk™ versión 9.1 bajo el sistema operativo Windows 10 Home y se almacenaron en un servidor modelo Dell Precision T3500.

### 4. Análisis estadístico.

Se utilizó el programa Sigma-Plot versión 14.5 y dado que los resultados obtenidos no siguieron una distribución normal, se compararon los grupos con el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba de Dunn. La significancia se fijó de  $P < 0.05$ .

## 5. Diagrama del diseño experimental empleado.



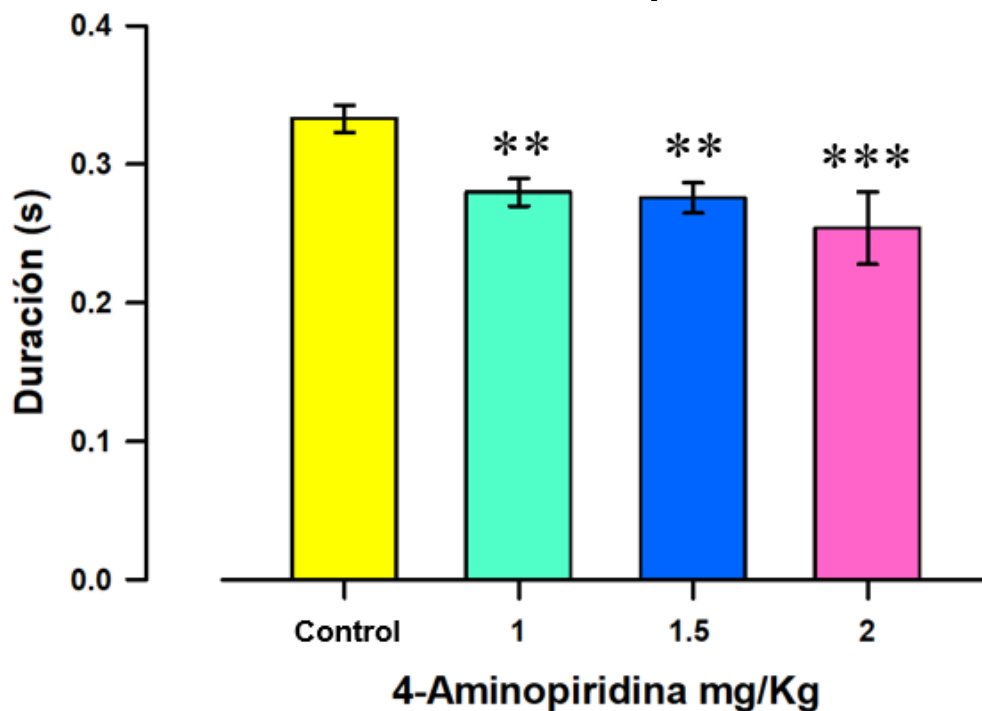
## RESULTADOS.

Los resultados experimentales obtenidos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). A todos los grupos se les realizó un registro control, el cual sirvió como referencia para la comparación de los resultados experimentales.

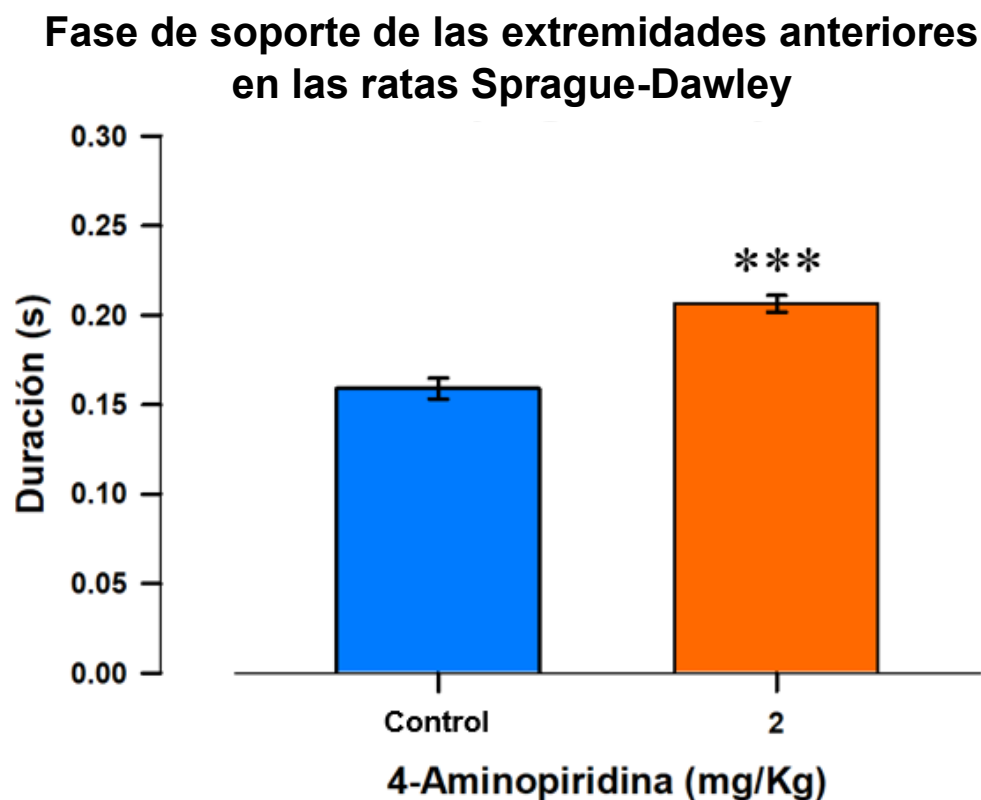
Se registró el patrón de la marcha de ocho ratas *taiep* machos de  $90 \pm 2$  DPN en cada grupo con cada dosis evaluada: 1, 1.5 y 2 mg/Kg de 4-aminopiridina (4-AP). Asimismo, se registraron seis ratas Sprague-Dawley con la dosis de 2 mg/Kg de 4-AP y su respectivo control.

En el análisis de la duración de la fase de soporte, obtuvimos resultados significativos al disminuir su duración en las ratas *taiep* que recibieron 4-AP, la cual tiene su mayor efecto con la dosis de 2 mg/Kg (véase Figura 13); mientras que, en el caso de las ratas Sprague-Dawley, la 4-AP produjo un aumento de la duración como se muestra en la Figura 14.

### Fase de soporte de las extremidades anteriores en las ratas *taiep*

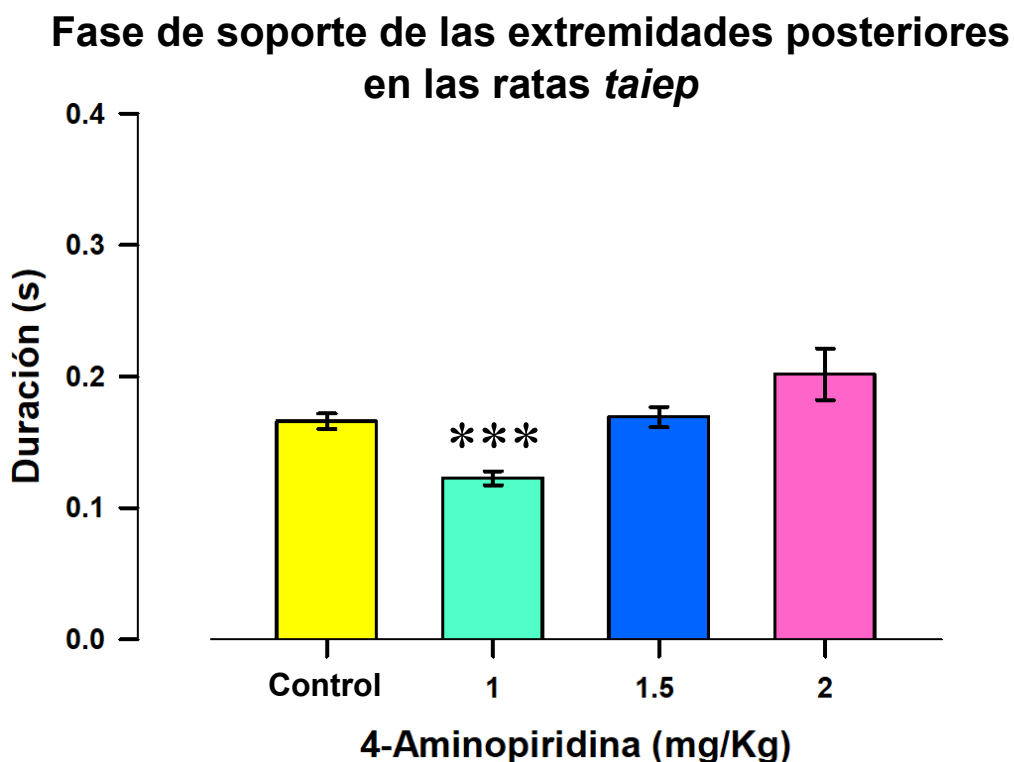


**Figura 13. Efecto de la 4-aminopiridina en la duración de la fase de soporte de las extremidades anteriores de las ratas *taiep* macho adultas.** La administración de 4-AP con las tres dosis disminuyó significativamente la duración de la fase de soporte de las extremidades anteriores, siendo la dosis de 2 mg/Kg la que generó una mayor disminución respecto al grupo control (Kruskal-Wallis,  $H = 27.092$ ,  $gl = 3$ ,  $P < 0.001$ , seguido de la prueba de Dunn,  $q = 3.3$ ,  $**P < 0.01$ ;  $q = 3.36$ ,  $**P < 0.01$ ;  $q = 4.4$ ,  $***P < 0.001$ ).

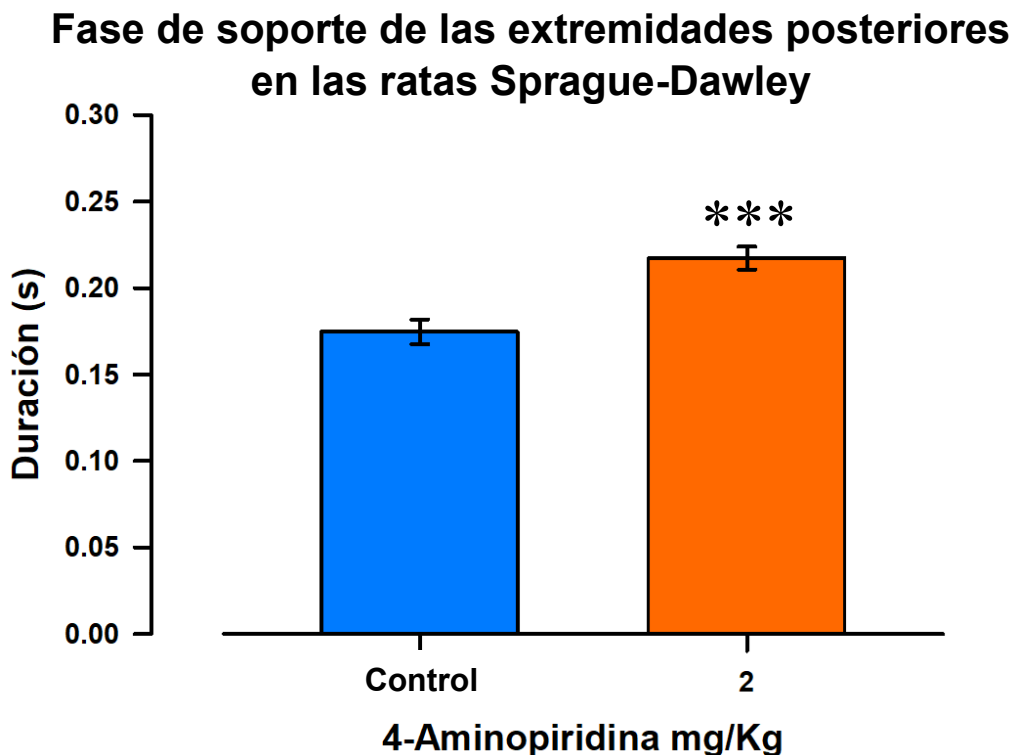


**Figura 14. Efecto de la 4-aminopiridina en la duración de la fase de soporte de las extremidades anteriores en las ratas Sprague-Dawley.** La administración de 2 mg/Kg de 4-AP aumentó de manera significativa la duración de la fase de soporte de las extremidades anteriores en las ratas Sprague-Dawley respecto a sus controles (t de Student,  $t = -6.26$ ,  $gl = 50$ ,  $***P < 0.001$ ).

La Figura 15 muestra los cambios obtenidos en la duración de la fase de soporte de las extremidades posteriores tras la administración de 4-AP. Los datos indican una diferencia significativa en las ratas *taiep*, respecto a su control, cuando se administró la dosis de 1 mg/Kg. Por otra parte, en las ratas Sprague-Dawley se obtuvo el efecto contrario, un aumento en la duración de esta fase (véase Figura 16).

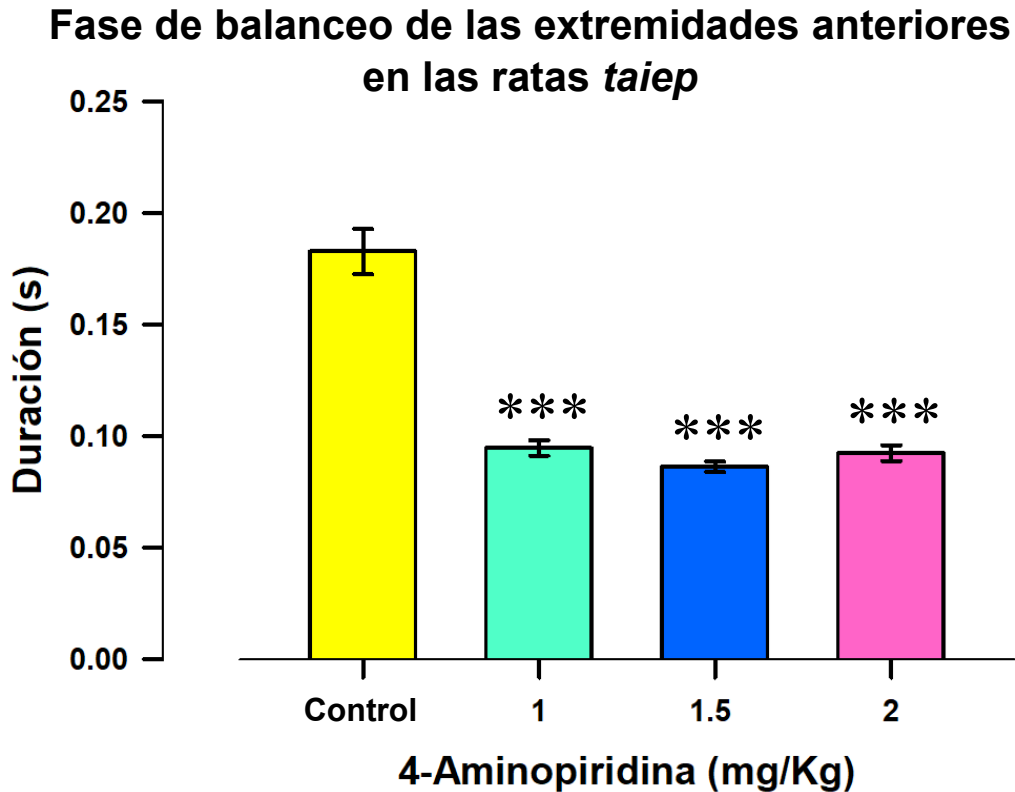


**Figura 15. Efecto de la 4-aminopiridina en la duración de la fase de soporte de las extremidades posteriores de las ratas *taiep*.** La administración de 4-AP a la dosis de 1 mg/Kg en ratas *taiep* macho de tres meses de edad disminuye significativamente la duración de la fase de soporte de las extremidades posteriores respecto a sus controles (Kruskal-Wallis,  $H = 44.91$ ,  $gl = 3$ ,  $P < 0.001$ , seguido de la prueba de Dunn,  $q = 5.74$ ,  $***P < 0.001$ ). Pero no tuvo efectos significativos con las otras dos dosis probadas.

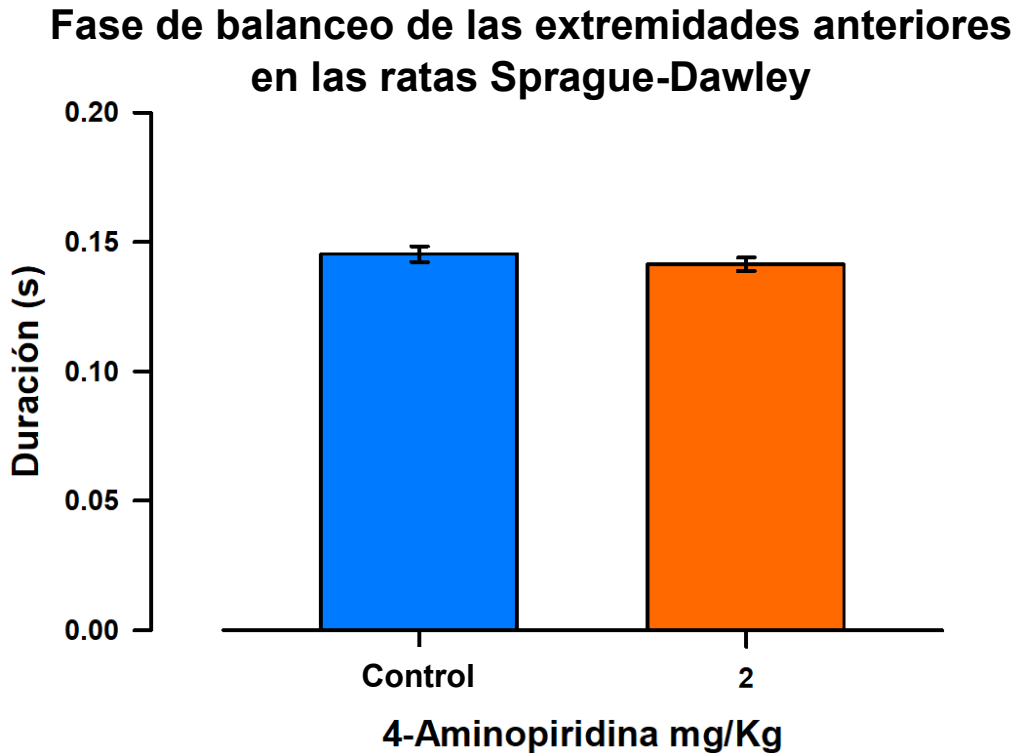


**Figura 16. Efecto de la 4-aminopiridina en la duración de la fase de soporte de las extremidades posteriores de las ratas Sprague-Dawley.** Al administrar 4-AP a la dosis de 2 mg/Kg aumenta de manera significativa la duración de la fase de soporte en las extremidades posteriores de las ratas Sprague-Dawley respecto a su control (t de Student,  $t = -4.36$ ,  $gl = 49.99$ ,  $***P < 0.001$ ).

La duración de la fase de balanceo de las extremidades anteriores disminuyó significativamente con la 4-AP en las ratas *taiep*, independientemente de la dosis que se les administró, como se observa en la Figura 17. Esto no sucedió con el grupo de las ratas Sprague-Dawley, ya que no se obtuvieron diferencias significativas respecto al grupo control (véase Figura 18).



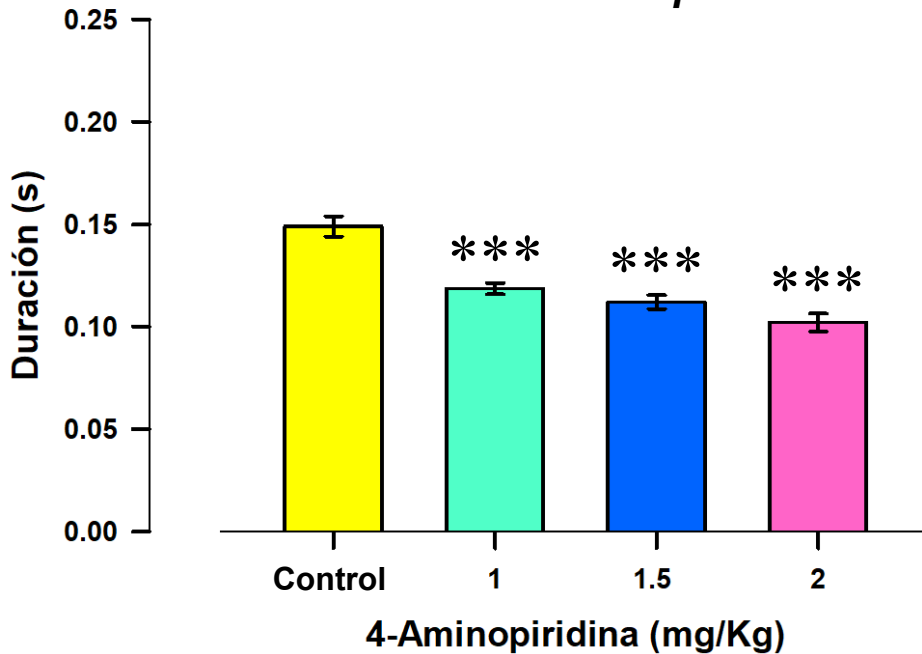
**Figura 17. Efecto de la 4-aminopiridina en la duración de la fase de balanceo de las extremidades anteriores de las ratas *taiep*.** La administración de 4-AP disminuye significativamente la duración de la fase de balanceo de las extremidades anteriores respecto al grupo control (Kruskal-Wallis,  $H = 127.86$ ,  $gl = 3$ ,  $P < 0.001$ , seguido de la prueba de Dunn,  $q=9$ ,  $***P < 0.001$ ;  $q=9.1$ ,  $***P < 0.001$ ;  $q=6.45$ ,  $***P < 0.001$ ).



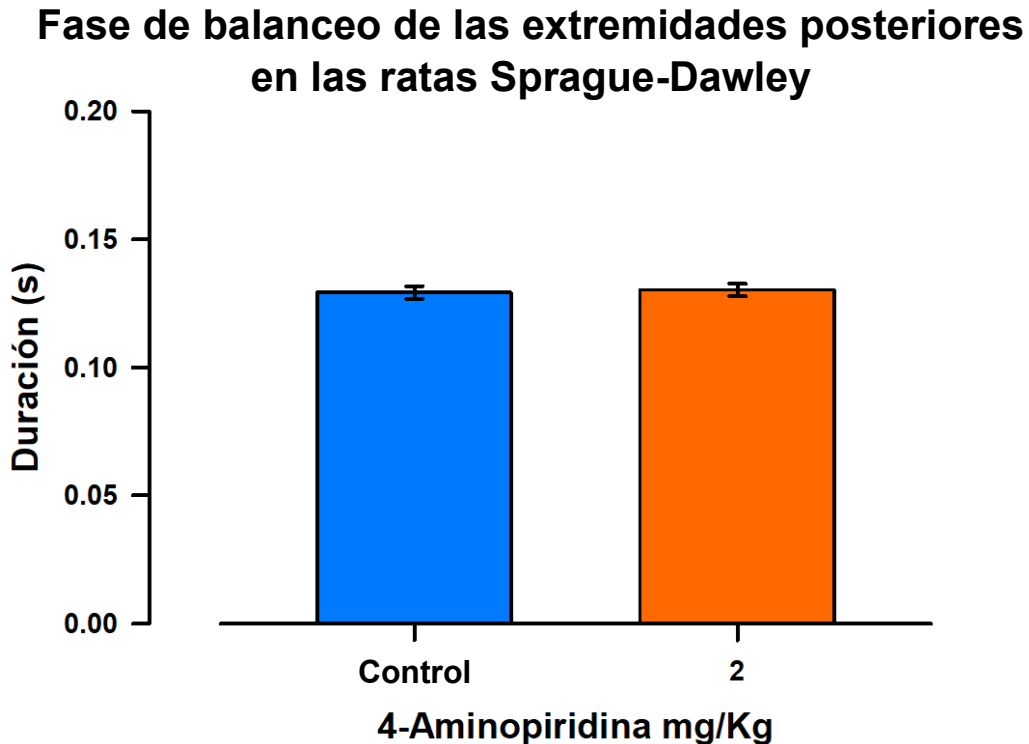
**Figura 18. Efecto de la 4-aminopiridina en la duración de la fase de balanceo de las extremidades anteriores de las ratas Sprague-Dawley.** No se obtuvieron diferencias significativas entre las ratas control Sprague-Dawley y las que fueron administradas con 2 mg/Kg de 4-AP (t de Student,  $t = 0.94$ ,  $gl = 50$ ,  $P = 0.35$ ).

Las ratas *taiep* a las que se les administró 4-AP, con cualesquiera de las dosis probadas, también disminuyeron la duración de la fase de balanceo de las extremidades posteriores respecto a su grupo control (véase Figura 19); mientras que, en las ratas Sprague-Dawley no se obtuvo ningún cambio significativo con la administración de 4-AP en la duración de esta fase respecto a sus controles (véase Figura 20).

### Fase de balanceo de las extremidades posteriores en las ratas *taiep*



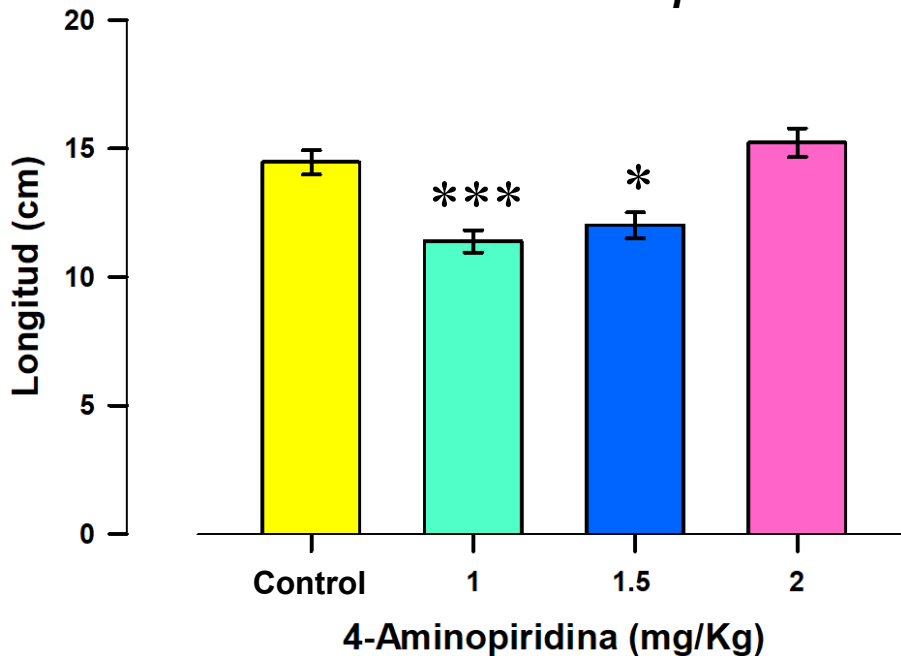
**Figura 19. Efecto de la 4-aminopiridina en la duración de la fase de balanceo de las extremidades posteriores de las ratas *taiep*.** La administración de 4-AP disminuye significativamente la duración de la fase de balanceo de las extremidades posteriores de las ratas *taiep* respecto del grupo control (Kruskal-Wallis,  $H = 48.36$ ,  $gl = 3$ ,  $P < 0.001$ , seguido de la prueba de Dunn,  $q = 4.03$ ,  $***P < 0.001$ ;  $q = 4.9$ ,  $***P < 0.001$ ;  $q = 5.88$ ,  $***P < 0.001$ ).



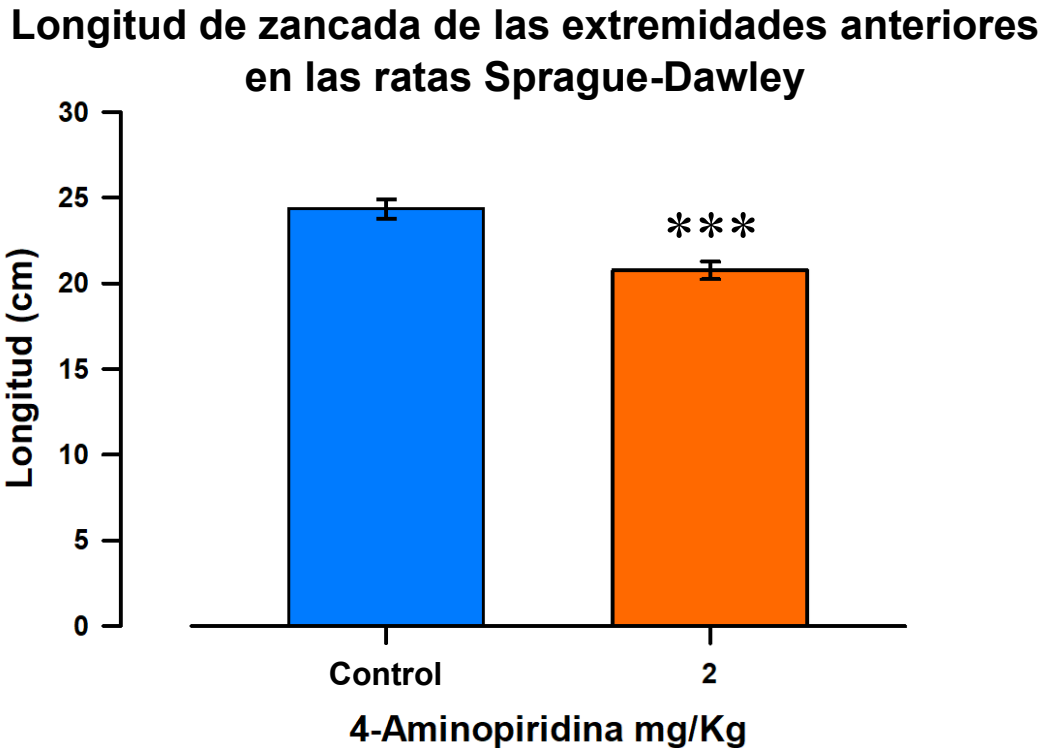
**Figura 20. Efecto de la 4-aminopiridina en la duración de la fase de balanceo de las extremidades posteriores de las ratas Sprague-Dawley.** La administración de 2 mg/Kg de 4-AP en ratas Sprague-Dawley no produjo cambios significativos en la duración de la fase de balanceo de las extremidades posteriores respecto a su grupo control.

Al evaluar la longitud de la zancada de las extremidades anteriores obtuvimos una disminución significativa de este parámetro con las dosis de 1 y 1.5 mg/Kg de 4-AP en ratas *taiep* respecto de sus controles (véase Figura 21). De igual forma, en el grupo de ratas Sprague-Dawley se obtuvo una disminución significativa de la longitud de la zancada al inyectar 2 mg/Kg de 4-AP y compararla con su grupo control (véase Figura 22).

### Longitud de zancada de las extremidades anteriores en las ratas *taiep*



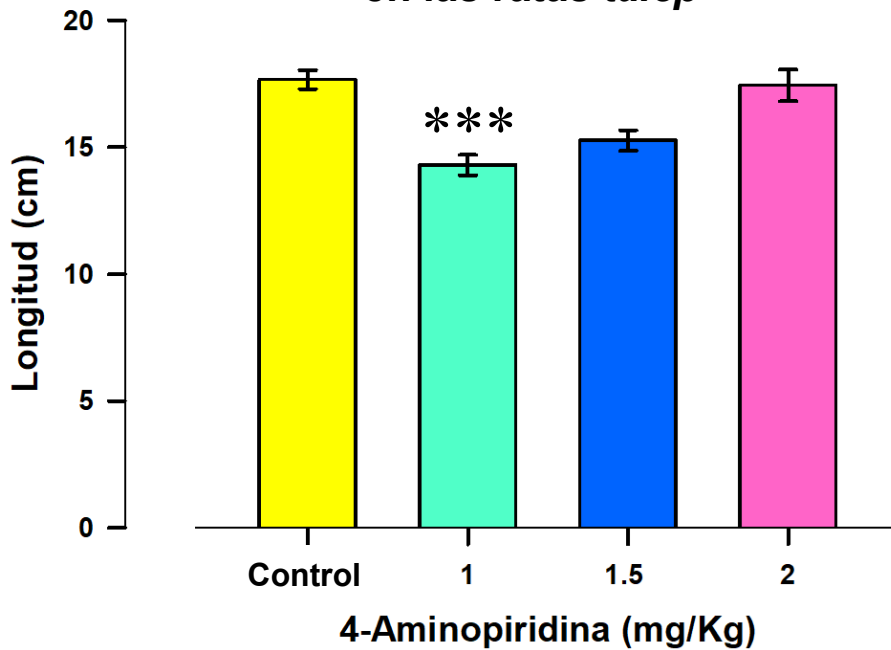
**Figura 21. Efecto de la 4-aminopiridina en la longitud de zancada de las extremidades anteriores de las ratas *taiep*.** La administración de 4-AP con las dosis de 1 y 1.5 mg/Kg en ratas *taiep*, disminuye significativamente la longitud de la zancada de las extremidades anteriores respecto del control (Kruskal-Wallis,  $H = 36.37$ ,  $gl = 3$ ,  $P < 0.001$ , seguido de la prueba de Dunn,  $q = 4.68$ ,  $***P < 0.001$ ;  $q = 3.09$ ,  $*P = 0.012$ ), pero no con la dosis de 2 mg/Kg (véase barra rosa).



**Figura 22. Efecto de la 4-aminopiridina en la longitud de zancada de las extremidades anteriores de las ratas Sprague-Dawley.** La administración de 2 mg/Kg de 4-AP disminuye de manera significativa la longitud de la zancada en las extremidades anteriores de las ratas Sprague-Dawley (t de Student,  $t = 4.64$ ,  $gl = 49.97$ ,  $***P < 0.001$ ).

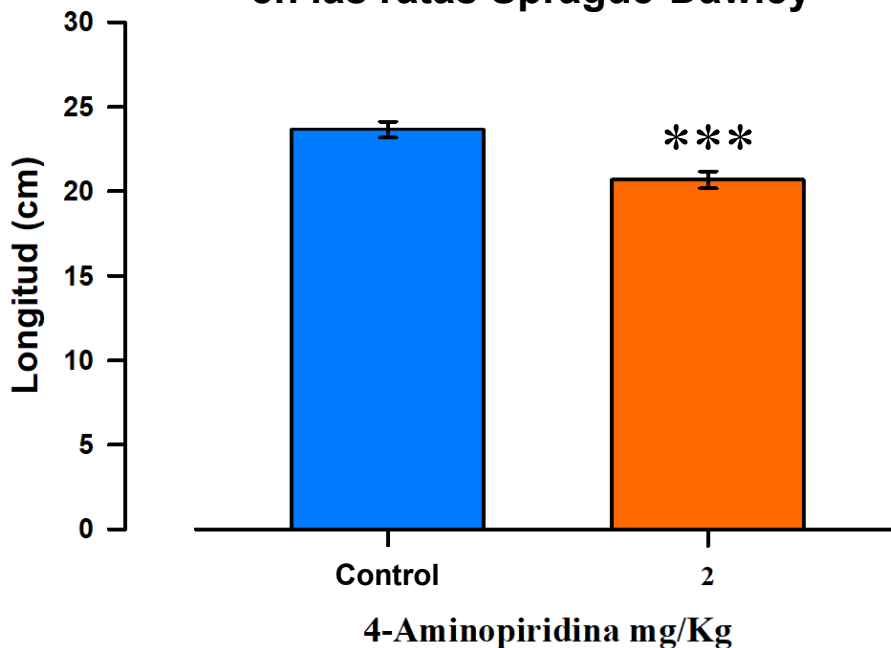
En la Figura 23 se muestran los efectos de la 4-AP sobre la longitud de zancada de las extremidades posteriores de las ratas *taiep*, en las que se obtuvo una disminución significativa de la longitud respecto a sus controles con la dosis de 1 mg/Kg de 4-AP. En las ratas Sprague-Dawley también se obtuvo una disminución significativa en la longitud de la zancada con la administración de 4-AP en comparación con sus respectivos controles (véase Figura 24).

### Longitud de zancada de las extremidades posteriores en las ratas *taiep*



**Figura 23. Efecto de la 4-aminopiridina en la longitud de zancada de las extremidades posteriores de las ratas *taiep*.** La administración de 4-AP a la dosis de 1 mg/Kg en ratas *taiep*, disminuye significativamente la longitud de la zancada de las extremidades posteriores respecto a sus controles (Kruskal-Wallis,  $H = 36.42$ ,  $gl = 3$ ,  $P < 0.001$ , seguido de la prueba de Dunn,  $q = 5.49$ ,  $***P < 0.001$ ).

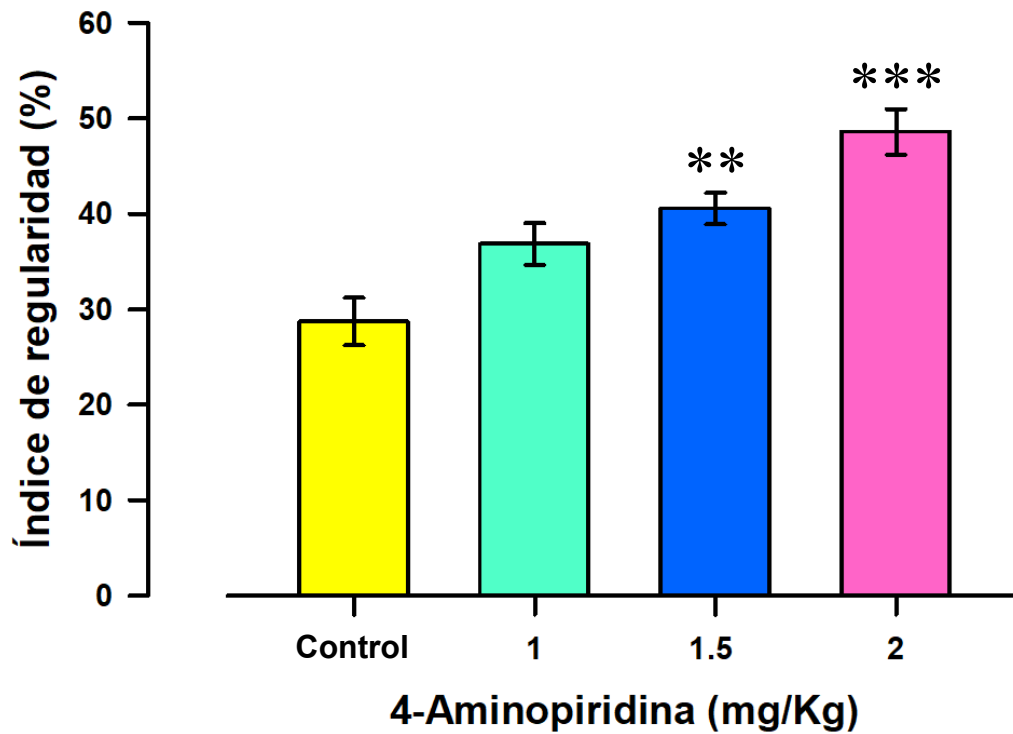
### Longitud de zancada de las extremidades posteriores en las ratas Sprague-Dawley



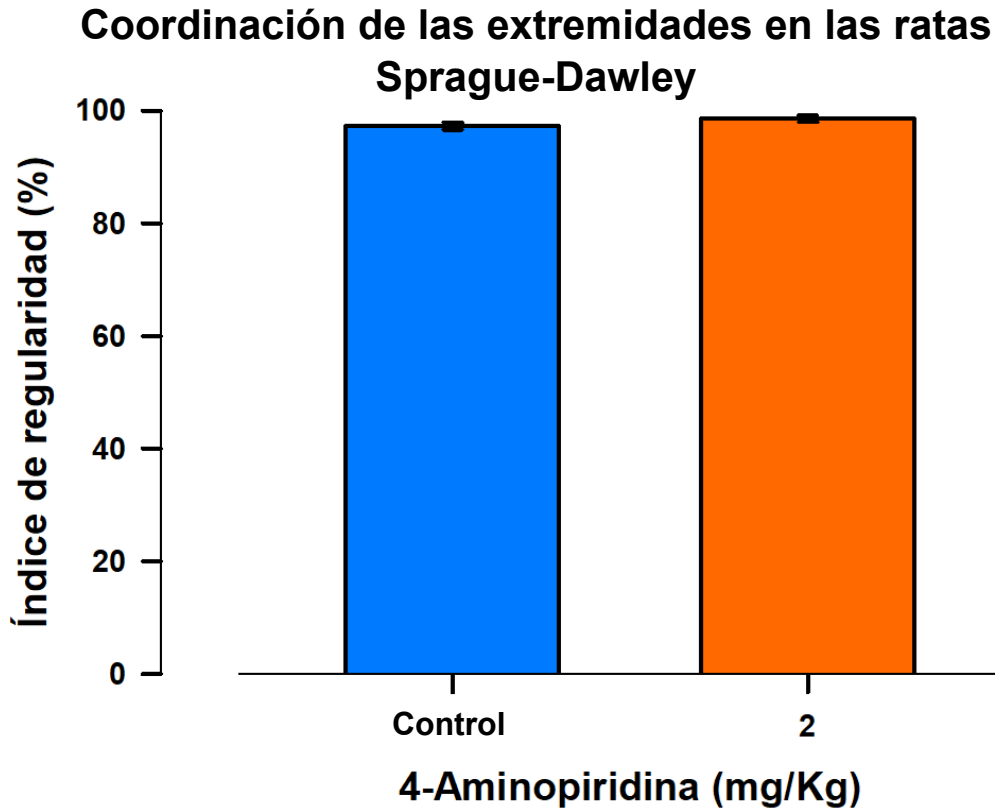
**Figura 24. Efecto de la 4-aminopiridina en la longitud de zancada de las extremidades posteriores de las ratas Sprague-Dawley.** La administración de 2 mg/Kg de 4-AP disminuye de manera significativa la longitud de la zancada en las extremidades posteriores en las ratas Sprague-Dawley (t de Student,  $t = 4.34$ ,  $gl = 49.09$ ,  $***P < 0.001$ ).

En la evaluación de la coordinación entre las extremidades en las ratas *taiep*, con la administración de 4-AP a las dosis de 1.5 y 2 mg/Kg obtuvimos un incremento significativo en el índice de regularidad de la marcha respecto a su grupo control (véase Figura 25). Mientras que, en las ratas Sprague-Dawley no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas tras administrar 4-AP (véase Figura 26).

## Coordinación de las extremidades en las ratas *taiep*



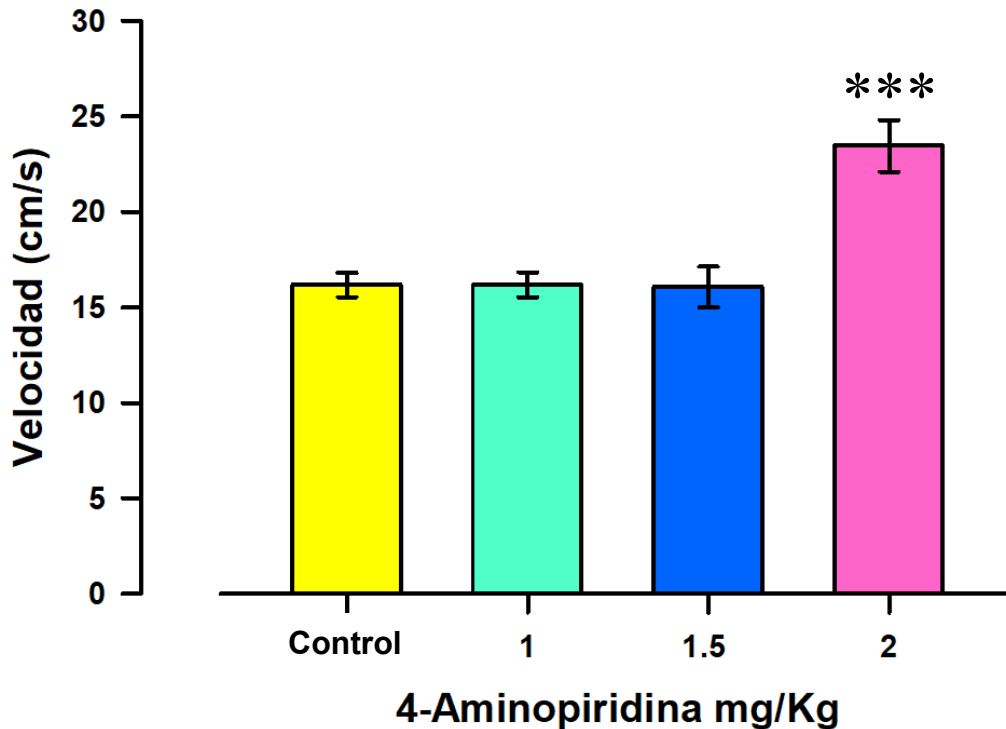
**Figura 25. Efecto de la 4-aminopiridina en la coordinación de las extremidades de las ratas *taiep*.** La administración de 4-AP con las dosis de 1.5 y 2 mg/Kg aumentan de manera significativa el índice de regularidad respecto al grupo control (Kruskal-Wallis,  $H = 27042$ ,  $gl = 3$ ,  $P < 0.001$ , seguido de la prueba de Dunn,  $q = 3.51$ ,  $**P = 0.003$ ;  $q = 4.83$ ,  $***P < 0.001$ , respectivamente).



**Figura 26. Efecto de la 4-aminopiridina en la coordinación de las extremidades de las ratas Sprague-Dawley.** No se encontraron diferencias significativas entre el índice de regularidad en las ratas Sprague-Dawley que recibieron 2 mg/Kg de 4-AP y en las ratas del grupo control.

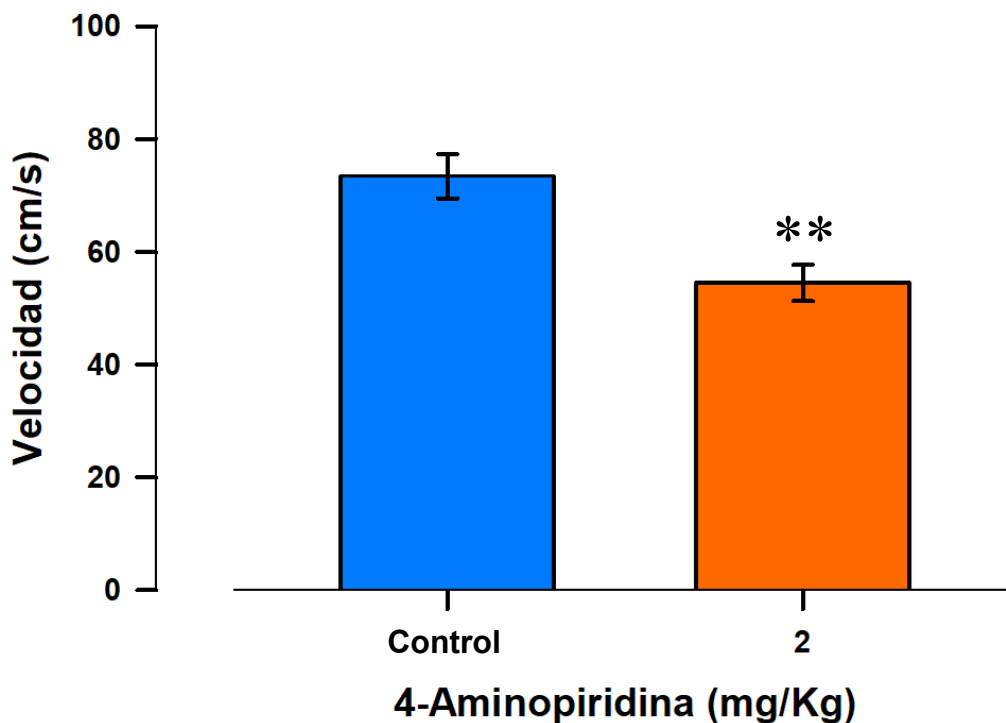
La velocidad del patrón de la marcha de las ratas *taiep* a las que se les administró una dosis de 2 mg/Kg de 4-AP incrementó de manera significativa respecto a su grupo control (véase Figura 27); mientras que, las ratas Sprague-Dawley que recibieron 2 mg/Kg de 4-AP disminuyeron significativamente su velocidad al compararlas con sus respectivos controles (véase Figura 28).

## Velocidad de la marcha en las ratas *taiep*



**Figura 27. Efecto de la 4-aminopiridina en la velocidad del patrón de la marcha de las ratas *taiep*.** La administración de 4-AP con la dosis de 2 mg/Kg en ratas *taiep* aumenta significativamente la velocidad del patrón de la marcha respecto sus controles (Kruskal-Wallis,  $H = 20.44$ ,  $gl = 3$ ,  $P < 0.001$ , seguido de la prueba de Dunn,  $q = 3.79$ ,  $***P < 0.001$ ).

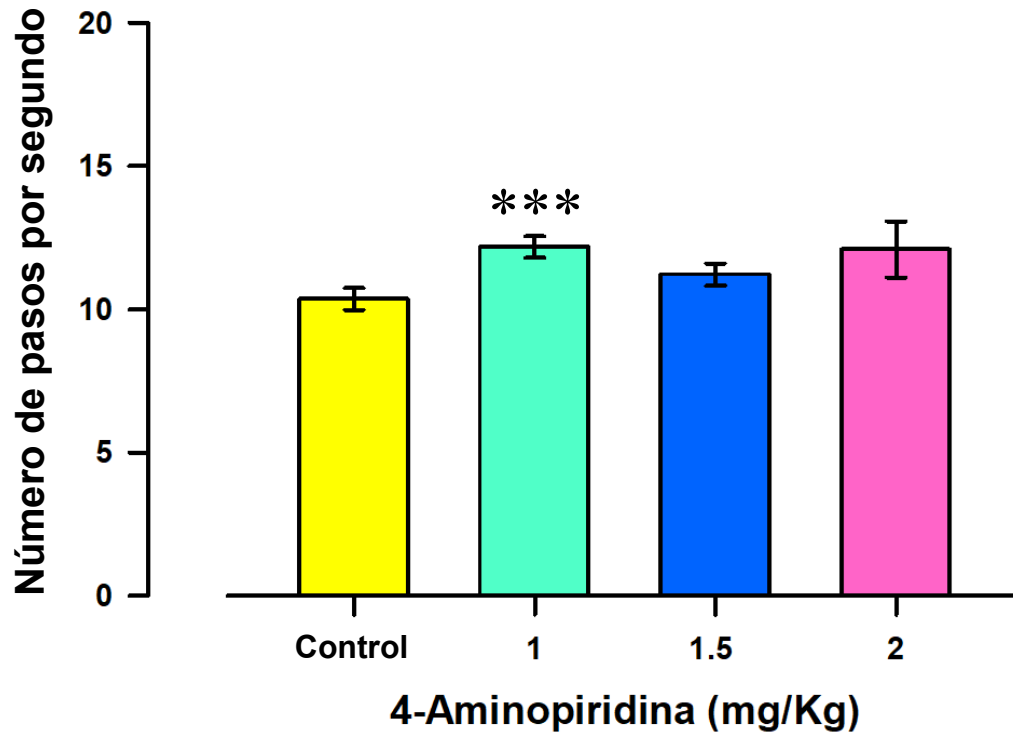
## Velocidad de la marcha en las ratas Sprague-Dawley



**Figura 28. Efecto de la 4-aminopiridina en la velocidad del patrón de la marcha de las ratas Sprague-Dawley.** En las ratas Sprague-Dawley, la administración de 2 mg/Kg de 4-AP disminuye de manera significativa la velocidad de la marcha respecto de sus controles (t de Student,  $t = 3.69$ ,  $gl = 23.69$ ,  $**P=0.001$ ).

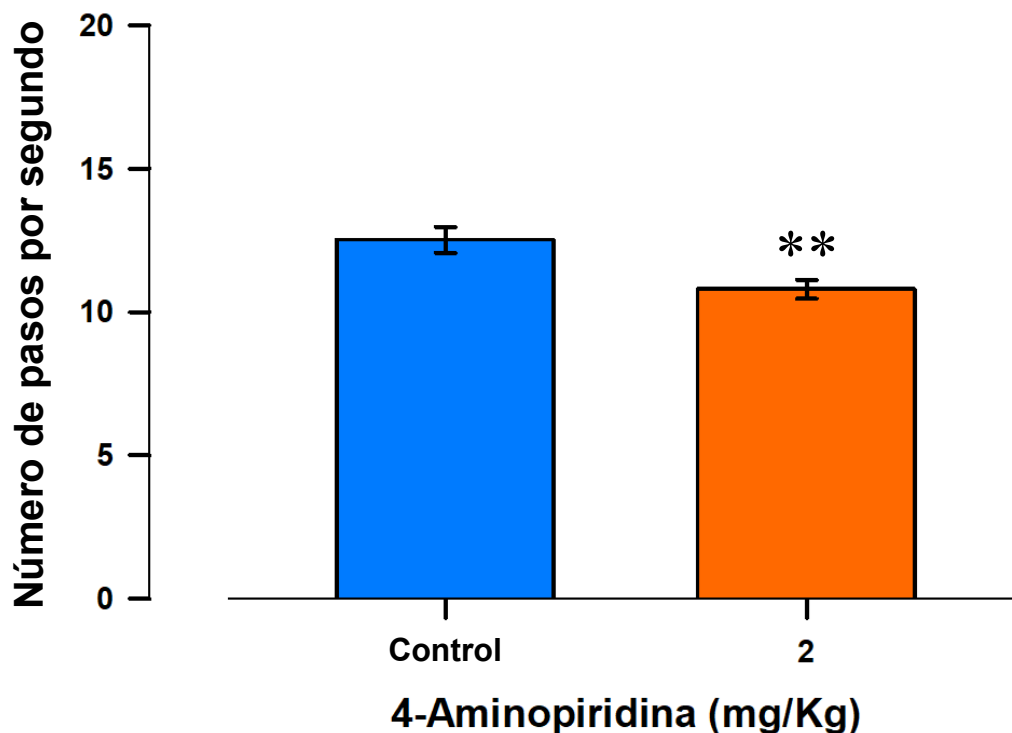
La cadencia del patrón de la marcha también fue evaluada y obtuvimos un aumento significativo en el número de pasos por minuto con la administración de 1 mg/Kg de 4-AP en ratas *taiep* respecto de la cadencia desplegada por sus respectivos controles (véase Figura 29). En el grupo de ratas Sprague-Dawley obtuvimos una disminución significativa de la cadencia del patrón de la marcha al comparar con su grupo control (véase Figura 30).

## Cadencia de la marcha en las ratas *taiep*



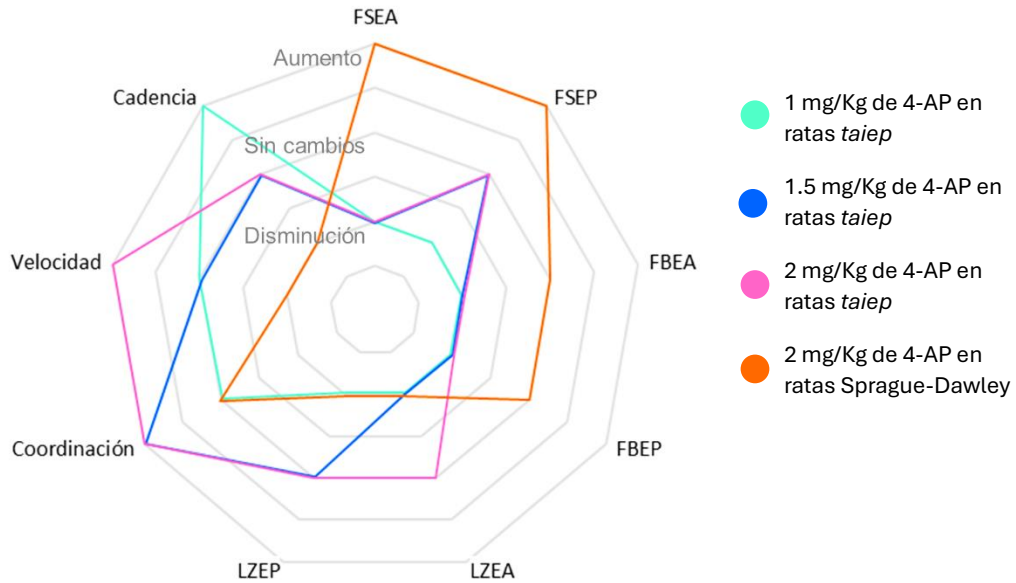
**Figura 29. Efecto de la 4-aminopiridina en la cadencia de la marcha de las ratas *taiep*.** La administración de 4-AP a la dosis de 1 mg/Kg en ratas *taiep*, aumenta significativamente la cadencia del patrón de la marcha respecto del grupo control (Kruskal-Wallis,  $H = 17.5$ ,  $gl = 3$ ,  $P < 0.001$ ; seguido de la prueba de Dunn,  $q = 3.91$ ,  $***P < 0.01$ ), pero no con las otras dosis probadas.

## Cadencia de la marcha en las ratas Sprague-Dawley

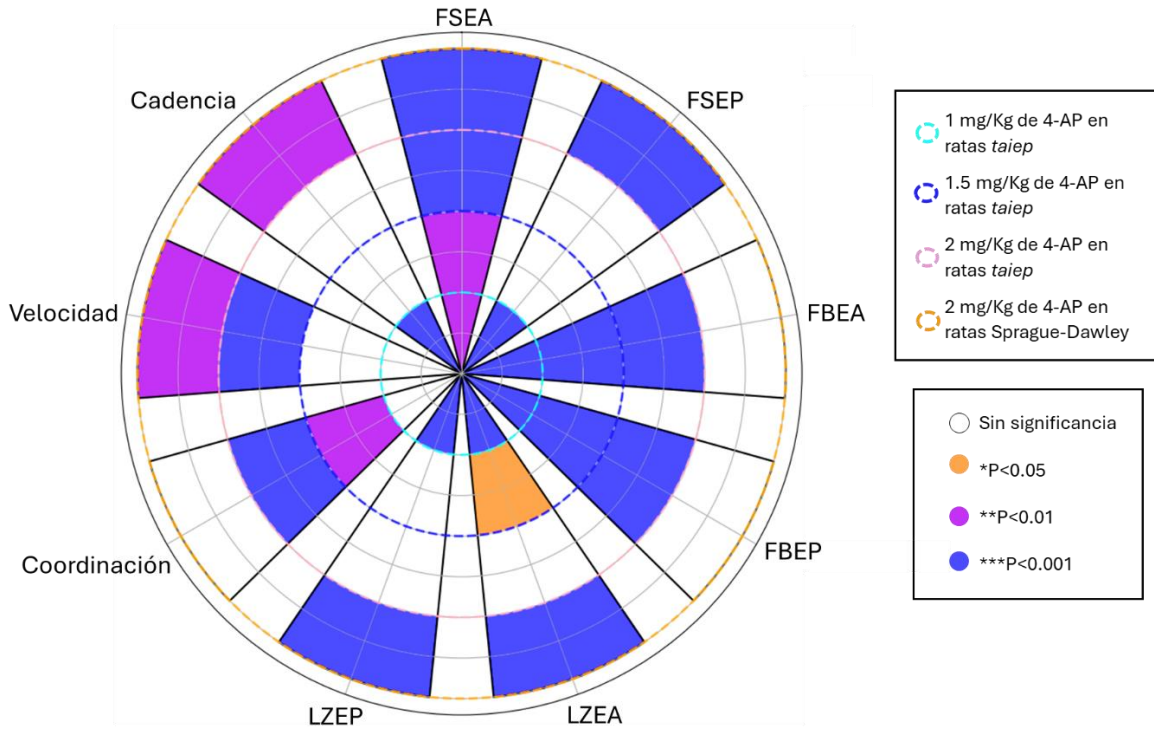


**Figura 30. Efecto de la 4-aminopiridina en la cadencia de la marcha de las ratas Sprague-Dawley.** La administración de 2 mg/Kg de 4-AP en ratas Sprague-Dawley disminuye de manera significativa la cadencia del patrón de la marcha respecto de sus respectivos controles ( $t$  de Student,  $t = 3.07$ ,  $gl = 23.01$ ,  $**P=0.005$ ).

A continuación, se muestra la gráfica polar de cómo se modifican los diferentes parámetros del patrón de la marcha tras la administración de 4-aminopiridina en las ratas *taiep* y en las ratas Sprague-Dawley (véase Figura 31); así como la significancia estadística obtenida de los cambios en los parámetros del patrón de la marcha (véase Figura 32). Note que el efecto de la 4-AP en algunos parámetros del patrón de la marcha es similar con las diferentes dosis probadas y pueden variar en el nivel de significancia estadística.



**Figura 31. Efectos en los parámetros del patrón de la marcha tras la administración de 4-aminopiridina en las ratas *taiep* y en las ratas Sprague-Dawley.** La administración de 4-AP en las ratas *taiep* o en las Sprague-Dawley tiene efectos dependientes de la dosis. FSEA, Fase de soporte de las extremidades anteriores; FSEP, fase de soporte de las extremidades posteriores; FBEA, fase de balanceo de las extremidades anteriores; FBEP, fase de balanceo de las extremidades posteriores; LZEA, longitud de zancada de las extremidades anteriores; LZEP, longitud de zancada de las extremidades posteriores.



**Figura 32. Niveles de significancia estadística de los efectos en los parámetros del patrón de la marcha tras la administración de 4-aminopiridina en las ratas *taiep* y en las ratas Sprague-Dawley.** Cada barra corresponde a un parámetro del patrón de la marcha y se divide en cuatro segmentos marcados por círculos punteados de diferentes colores, donde cada círculo encierra la significancia estadística correspondiente a una de las dosis administradas de 4-AP, y el valor de la significancia se muestra por el color de cada segmento. FSEA, Fase de soporte de las extremidades anteriores; FSEP, fase de soporte de las extremidades posteriores; FBEA, fase de balanceo de las extremidades anteriores; FBEP, fase de balanceo de las extremidades posteriores; LZEA, longitud de zancada de las extremidades anteriores; LZEP, longitud de zancada de las extremidades posteriores.

La Figura 31 muestra cómo cambia cada parámetro de la marcha en función de la dosis administrada de 4-AP en las ratas *taiep* y en las Sprague-Dawley. Su utilidad radica en visualizar tendencias generales como aumentos o disminuciones en los parámetros dependientes de la dosis administrada de 4-AP, y esta figura resume los

efectos relevantes del tratamiento, facilitando la interpretación general de los resultados.

Aunque todos los cambios reportados en la Figura 31 son significativos, la Figura 32 muestra los niveles de significancia de cada uno, permitiendo visualizar los efectos que fueron más robustos para priorizar los hallazgos más consistentes y reconocer la magnitud del impacto de las diferentes dosis evaluadas de 4-AP.

Con solo las últimas dos gráficas de esta investigación (véase Figuras 31 y 32) podemos resumir de manera efectiva todos los resultados obtenidos, ya que permiten visualizar claramente los efectos de las diferentes dosis de 4-aminopiridina en los parámetros del patrón de la marcha de las ratas *taiep* y las Sprague-Dawley, y facilitan la comprensión de los cambios observados destacando la significancia estadística de cada uno de ellos.

## DISCUSIÓN.

La rata *taiep* es el primer modelo animal con una larga expectativa de vida de la leucodistrofia en humanos denominada hipomielinización con atrofia de los ganglios basales y cerebelo (Cortés et al., 2005; Eguibar et al., 2021). Las coincidencias en los signos imagenológicos y genéticos hacen que este modelo sea ideal para la investigación de nuevas opciones terapéuticas para las enfermedades de la mielina (Alata et al., 2021; Eguibar et al., 2024; Garduno-Robles et al., 2020; López Juárez et al., 2021).

En este trabajo de tesis propusimos a la 4-aminopiridina (4-AP) como un fármaco capaz de mejorar la transmisión de los impulsos nerviosos en la rata *taiep* debido a su principal efecto, que es el de bloquear a los canales de potasio del tipo Kv 1.1 y Kv 1.2, que se localizan en su mayoría en la región yuxtaparanodal de los axones en diferentes áreas del cerebro (Kostadinova y Danchev, 2019).

Se ha mostrado en trabajos previos que este fármaco tiene la capacidad de restaurar parcialmente las respuestas locomotoras en pacientes con esclerosis múltiple y en otras enfermedades que afectan a la mielina, como es la lesión de la médula espinal (Fujihara y Miyoshi, 1998; Paredes-Cruz et al., 2022). Además, es capaz de mejorar los potenciales provocados somatosensoriales en este biomodelo animal que utilizamos para este trabajo, la rata *taiep* (Eguibar et al., 2024).

También, la 4-AP ha sido estudiada como un posible modulador de la neurotransmisión en diversas enfermedades neurológicas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Andreani, 2000). Su mecanismo de acción como bloqueador de los canales de potasio le permite prolongar la duración del potencial de acción en las neuronas, facilitando la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina, y dado que la disminución del tono colinérgico es una característica clave en la fisiopatología del Alzheimer, se han explorado estrategias terapéuticas enfocadas a mejorar la transmisión colinérgica (Andreani, 2000; Singh et al., 2018).

Al evaluar los efectos de la 4-AP con diferentes dosis en la rata *taiep* se obtuvieron resultados significativos en todos los parámetros evaluados del patrón de la marcha, como son la duración de las fases de soporte y de balanceo de las extremidades anteriores y de las posteriores, la longitud de la zancada de las extremidades anteriores y de las posteriores, así como la coordinación, la cadencia y la velocidad de la marcha. También se obtuvieron diferencias significativas en las ratas Sprague-Dawley a pesar de no ser un modelo con alteración en el patrón de la marcha.

La disminución de la duración de la fase de soporte de las extremidades anteriores y posteriores obtenidas tras la administración de 4-AP sugieren que la rata *taiep* tiene un mayor equilibrio, ya que disminuye el tiempo que el animal pasa en contacto con la superficie, y se ha reportado que un aumento en la duración de esta fase se relaciona con alteraciones en el patrón locomotor (Cucarián et al., 2017), lo que concuerda con lo obtenido en los controles de la rata *taiep*, que presentan una duración de la fase de soporte aumentada en comparación con ratas Sprague-Dawley controles. Por lo tanto, la disminución en este parámetro debería mejorar el desplazamiento horizontal (véase Figuras 13 y 15).

La administración de 4-AP en modelos animales mielinizados, a pesar de encontrarse los canales Kv 1.1 y Kv 1.2 cubiertos por la mielina, pueden tener efectos sobre la excitabilidad neuronal (Bostock et al., 1981), como ya se ha mencionado, la 4-AP es capaz de aumentar la liberación de neurotransmisores, lo cual puede resultar en un aumento del tono muscular o rigidez (Jensen et al., 2014), provocando así que se prolongue el tiempo en la fase de soporte de las ratas Sprague-Dawley (véase Figuras 14 y 16).

La disminución de la duración de las fases de balanceo en las extremidades anteriores y posteriores de las ratas *taiep* (véase Figuras 17 y 19) produce una mejoría en el patrón de la marcha debido a que en modelos de lesión espinal o desmielinizantes, como es la rata *taiep*, se presenta un aumento de la duración de esta fase (Ahumada Juárez, 2020; Cucarián et al., 2017); por lo que al disminuir este parámetro y tomando en cuenta que no hubo cambios significativos en la

cadencia o en la velocidad del patrón de la marcha, podemos asumir que es un efecto que favorece un patrón de la marcha más estable y robusto.

Respecto a la longitud de zancada solo se vió disminuida con la dosis de 1 mg/Kg de 4-AP (véase Figuras 21 y 23), pero con las dosis más altas ya no se obtuvieron diferencias significativas, probablemente por un efecto de saturación de los canales de potasio. La disminución de la longitud de la zancada se ha relacionado con una alteración del patrón de la marcha debido a que pasos más cortos generan mayor estabilidad y seguridad al caminar (Ahumada Juárez, 2020; Dietz y Colombo, 2004), por lo que la 4-AP con las dosis altas no afecta la estabilidad del patrón de la marcha ya que sus pasos son más estables.

En las ratas Sprague-Dawley se obtuvo una disminución de la longitud de la zancada en las extremidades tras la administración de 2 mg/Kg de 4-AP (véase Figuras 22 y 24), que se puede deber al aumento de la fase de soporte, ya que las ratas compensan con pasos más cortos para tener una mayor estabilidad de los pasos sucesivos, y de igual forma, un aumento en la excitabilidad neuronal puede provocar una desregulación de los circuitos inhibitorios y excitatorios de la médula espinal, reduciendo de esta forma la amplitud de los movimientos (Smith et al., 2000).

La coordinación entre las cuatro extremidades es uno de los parámetros más importantes para el patrón de la marcha de la rata *taiep*, ya que éste se encuentra estrechamente relacionado con la organización y la coordinación de los pasos sucesivos que son el reflejo de como operan los generadores centrales de patrones. La coordinación se evaluó mediante el índice de regularidad, el cual se obtiene de la suma de patrones normales que tiene una rata durante su paso a través de la pasarela y se correlaciona con el número total de pasos dados en la plataforma de 120 cm de largo. El valor de este índice en ratas normales es cercano a 100 (Noldus, 2011).

Tras la administración de 4-AP se produjo un aumento del valor del índice de regularidad desde 25.39 hasta 45.45 con la dosis más alta de 4-AP (véase Figura 25). Estos hallazgos muestran que la 4-AP mejora la neurotransmisión sináptica

debido a que los circuitos de coordinación motora a nivel cervical y lumbar, como los generadores centrales de patrones, dependen de una comunicación neuronal eficiente para realizar la marcha de una manera rítmica y alternante (Nashmi y Fehlings, 2001).

La velocidad de desplazamiento de la rata *taiep* solo tras la administración de 2 mg/Kg de 4-AP logramos un aumento significativo en la velocidad de desplazamiento pasando desde una velocidad promedio de 15 cm/s hasta alcanzar 22.8 cm/s (véase Figura 27). Esto puede relacionarse con la mejoría del patrón de la marcha y del equilibrio del sujeto, ya que no obtuvimos un aumento en la longitud de la zancada, pero si una mejora de la coordinación, lo que favorece que la secuencia de pasos sea más fluida, por lo que la rata *taiep* puede moverse de manera más rápida y adaptarse mejor al cambio de pasos necesarios para aumentar su velocidad de desplazamiento.

En las ratas Sprague-Dawley se obtuvo una disminución significativa de la velocidad de la marcha (véase Figura 28), este es un resultado esperado si consideramos que la longitud de la zancada y la cadencia del paso disminuyen, ya que un menor número de pasos y de menor longitud producen de manera concomitante un descenso de la velocidad.

La cadencia del patrón de la marcha en la rata *taiep* solo aumentó significativamente con la dosis más baja de 4-AP de 1 mg/Kg (véase Figura 29). Al correlacionar este parámetro con la disminución significativa en la longitud de zancada y la falta de mejora en la coordinación con esta dosis, podemos sugerir que las ratas *taiep* experimentan una menor estabilidad en la locomoción; por lo que una dosis baja de 4-AP podría generar un efecto parcial e insuficiente para mejorar la sincronización motora de los circuitos neuronales de la médula espinal, el tallo cerebral y los ganglios basales, dando como resultado un patrón de la marcha compensatorio caracterizado por pasos más cortos y más frecuentes, lo que explicaría el aumento en la cadencia.

Se debe destacar que los mejores resultados se obtuvieron con la dosis más alta de 4-AP, seguramente debido a que se alcanzó la saturación sobre los canales de

potasio y el consecuente incremento en la liberación de neurotransmisores (Kostadinova y Danchev, 2019), lo cual es consistente con el mecanismo de acción conocido de la 4-AP, que al bloquear los canales de potasio, retrasa la repolarización de la membrana neuronal prolongando la duración del potencial de acción y concomitantemente facilita una mayor liberación de neurotransmisores en las terminales sinápticas neuromusculares (Kostadinova y Danchev, 2019).

Adicionalmente, la propagación del potencial de acción a lo largo del axón y sus ramificaciones depende críticamente del factor de seguridad, un concepto que describe la capacidad del axón para transmitir señales eléctricas de manera confiable (Smith, 1980). En las ramificaciones axonales, donde el diámetro del axón se reduce y la resistencia eléctrica aumenta, el factor de seguridad puede disminuir, lo cual pone en riesgo la propagación del potencial de acción en los axones hijos, por lo tanto, los canales de potasio se vuelven cruciales ya que una apertura excesiva o prematura de estos canales puede hiperpolarizar la membrana y dificultar la propagación del potencial de acción (Smith, 1980). Dado que la 4-AP lo prolonga, facilita la transmisión de impulsos nerviosos.

Esto sugiere que la 4-AP es una opción terapéutica viable en condiciones donde la transmisión sináptica y la propagación del potencial de acción en los axones están comprometidas, como es el caso de las lesiones de la médula espinal o en alteraciones de la mielina genéticas como las leucodistrofias, o las adquiridas por trauma, o las inmunológicas como es el caso de la esclerosis múltiple.

Sin embargo, es importante tomar en cuenta que la dosis de 2 mg/Kg de 4-AP se encuentra en los límites de las dosis terapéuticas, ya que se han reportado efectos adversos a dosis más altas. De hecho, la 4-AP es capaz de bloquear otro tipo de canales de potasio que no solo se expresan en el sistema nervioso, sino que podríamos afectar otros sistemas y provocar la presentación de efectos secundarios, como es el bloqueo del tracto urogenital, la distensión vesical y la dilatación de la pelvis renal (European Medicines Agency, 2011; Gutman et al., 2005).

Estos resultados se suman a los resultados positivos obtenidos previamente con la 4-aminopiridina, pero es necesario realizar más estudios adicionales y pruebas para lograr el objetivo de mejorar el patrón de la marcha en todos sus parámetros, ya que los canales de potasio Kv 1.1 y Kv 1.2 que estamos bloqueando con la 4-AP, solo se expresan en ciertas regiones del sistema nervioso central (Lorincz y Nusser, 2008; Robbins y Tempel, 2012). Se debe considerar que tanto en la rata *taiep*, en todas las leucodistrofias y en específico en la H-ABC, se tienen afectaciones diversas en distintas áreas del sistema nervioso central (Eguibar et al., 2021; Maillard et al., 2023), lo que puede explicar que la 4-AP no mejore de igual forma todos los circuitos involucrados en la locomoción y podrían existir zonas que no mejoren al administrar este fármaco, como es el tronco encefálico o la corteza motora, que son esenciales para lograr un patrón de la marcha estable.

Dicho esto, los hallazgos obtenidos en esta investigación abren la posibilidad de explorar combinaciones terapéuticas que potencien los efectos de la 4-AP o complementen sus mecanismos de acción para obtener mejores resultados. Por ejemplo, en el Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y Control Motor se están llevando a cabo experimentos usando diversos agonistas dopaminérgicos de la familia D2 como la apomorfina, el pramipexol y el quinpirol que mejoran también algunos parámetros de la marcha (Ahumada-Juárez, 2025).

Estos resultados son relevantes ya que desde hace varias décadas se sabe que en distintas preparaciones para evaluar la locomoción, como es el gato descerebrado y la médula espinal de ratas o ratones neonatos, la administración de dopamina induce locomoción ficticia (Grillner y Zangger, 1979; Kiehn y Kjaerulff, 1996; Jiang et al., 1999). Incluso esta amina biogénica induce ritmo de nado en la lamprea o el pez cebra (Poon, 1980; Irons et al., 2012). Estos hallazgos se han llevado a estudios clínicos usando una mezcla de L-dopamina, carbidopa y bupiriona, denominada Spinalon™ por el grupo canadiense liderado por Guertin, los cuales han mostrado que mejora la marcha en pacientes con lesión medular (Guertin, 2017).

Con base en estos resultados, son las terapias combinadas las que tienen mejores efectos sobre el patrón locomotor en pacientes con lesión en la médula espinal. Este

tipo de aproximación con mezclas de fármacos es una opción que queremos explorar en experimentos futuros que incluyan la combinación de fármacos con 4-AP.

Es fundamental señalar que la marcha es el resultado de un proceso complejo que involucra una serie de aferencias y eferencias, reguladas por múltiples áreas del sistema nervioso, como son la corteza motora, los ganglios basales, el cerebelo, el tronco encefálico y la médula espinal (Takakusaki, 2013). Por lo tanto, cualquier intento de mejorar el patrón de la marcha requiere una investigación exhaustiva para analizar nuevas opciones terapéuticas, no solo orientadas a optimizar el patrón de la marcha, sino también a mejorar la calidad de vida de los individuos afectados con leucodistrofias o con otras alteraciones de la mielina.

## CONCLUSIONES.

- 1) La 4-AP mostró mejora de diferentes parámetros del patrón de la marcha como es la duración de la fase de soporte en las extremidades anteriores, la duración de la fase de balanceo en las extremidades, la coordinación y la velocidad de la marcha.
- 2) Con la dosis de 2 mg/Kg se obtuvieron los mejores resultados en las pruebas realizadas.
- 3) Nuestros resultados muestran que la 4-AP es una droga que puede ser utilizada para mejorar el patrón de la marcha de las ratas *taiep*.
- 4) Este trabajo respalda que la 4-AP podría ser una opción terapéutica en pacientes con enfermedad H-ABC o pacientes con enfermedades desmielinizantes como las leucodistrofias, o adquiridas como son los traumas o autoinmunes como la esclerosis múltiple.

## REFERENCIAS.

Adang, L.A., Sevagamoorthy, A., Sherbini, O., Fraser, J.L., Bonkowsky, J.L., Gavazzi, F., D'Aiello, R., Modesti, N.B., Yu, E., Mutua, S., Kotes, E., Shults, J., Vincent, A., Emrick, L.T., Keller, S., Van Haren, K.P., Woidill, S., Barcelos, I., Pizzino, A., Schmidt, J.L., Eichler, F., Fatemi, A., Vanderver, A. (2024). Longitudinal natural history studies based on real-world data in rare diseases: Opportunity and a novel approach. *Molecular Genetics and Metabolism*, **142**: 108453.

Ahumada-Juárez, J.C. (2020). Evaluación del efecto de dopaminérgicos y serotoninérgicos sobre el patrón de la marcha en el mutante de mielina *taiep*: una modelo de esclerosis múltiple. Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas. Instituto de Fisiología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. pp 151.

Ahumada-Juárez, J.C. (2025). Evaluación del efecto de diferentes dopaminérgicos y del análogo de GnRH el acetato de leuprolida en el patrón de la marcha de un modelo de tubulinopatía H-ABC: la rata *taiep*. Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas. Instituto de Fisiología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. pp 163.

Alata, M., González-Vega, A., Piazza, V., Kleinert-Altamirano, A., Cortes, C., Ahumada-Juárez, J.C., Eguibar, J.R., López-Juárez, A., Hernandez, V.H. (2021). Longitudinal Evaluation of Cerebellar Signs of H-ABC Tubulinopathy in a Patient and in the *taiep* Model. *Frontiers in Neurology*. **12**: 702039

Andreani, A. (2000). 4-Aminopyridine derivatives with anti-amnesic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **35**: 77–82.

Bonkowsky, J.L., Keller, S., Capal, J.K., Lotze, T., Shellhaas, R.A., Urion, D.K., Chen, E., Trotter, T.L., Berry, S.A., Burke, L.W., Geleske, T.A., Hamid, R., Hopkin, R.J., Introne, W.J., Lyons, M.J., Scheuerle, A.E., Stoler, J.M. (2021). Leukodystrophies in children: diagnosis, Care, and Treatment. *Pediatrics*. **148**: e2021053126.

Bonkowsky, J.L., Nelson, C., Kingston, J.L., Filloux, F.M., Mundorff, M.B., Srivastava, R. (2010). The burden of inherited leukodystrophies in children. *Neurology*. **75**: 718–725.

Bostock, H., Sears, T.A., Sherratt, R.M. (1981). The effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium ions on normal and demyelinated mammalian nerve fibres. *The Journal of Physiology*. **313**: 301–315.

Breuss, M., Keays, D.A. (2014). Microtubules and neurodevelopmental disease: the movers and the makers. En: *Cellular and Molecular Control of Neuronal Migration*. Edición por Nguyen, L. Springer, Dordrecht, pp. 75–96.

Buckley, E., Mazzà, C., McNeill, A. (2018). A systematic review of the gait characteristics associated with cerebellar ataxia. *Gait & Posture*. **60**: 154–163.

Caggiano, V., Leiras, R., Goñi-Erro, H., Masini, D., Bellardita, C., Bouvier, J., Caldeira, V., Fisone, G., Kiehn, O. (2018). Midbrain circuits that set locomotor speed and gait selection. *Nature*. **553**: 455–460.

CHOP. (2020). Leukodystrophy. Children's Hospital of Philadelphia. Recuperado el 11 de julio de 2024, de <https://www.chop.edu/conditions-diseases/leukodystrophy>.

Cortés, M.D.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.

Couve, E., Cabello, J.F., Krsulovic, J., Roncagliolo, M. (1997). Binding of microtubules to transitional elements in oligodendrocytes of the myelin mutant taiep rat. *Journal of Neurosciense Reserch Res* **47**: 573–581.

Cucarián, J.D., Leon, L.A., Luna, G.A., Torres, M.R., Corredor, K. (2017). Temporal and spatial characterization of gait pattern in rodents as an animal model of cerebrovascular lesion. *Acta Biológica Colombiana* **22**: 307-321.

Curiel, J., Rodríguez Bey, G., Takanohashi, A., Bugiani, M., Fu, X., Wolf, N.I., Nmezi, B., Schiffmann, R., Bugaighis, M., Pierson, T., Helman, G., Simons, C., Van Der

Knaap, M.S., Liu, J., Padiath, Q., Vanderver, A. (2017). TUBB4A mutations result in specific neuronal and oligodendrocytic defects that closely match clinically distinct phenotypes. *Human Molecular Genetics* **26**: 4506–4518.

Dautan, D., Kovács, A., Bayasgalan, T., Diaz-Acevedo, M.A., Pal, B., Mena-Segovia, J. (2021). Modulation of motor behavior by the mesencephalic locomotor region. *Cell Reports* **36**: 109594.

Desai, A., Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annual review of cell and developmental biology*. **13**: 83–117.

Dietz, V., Colombo, G. (2004). Recovery from spinal cord injury — underlying mechanisms and efficacy of rehabilitation, En: *Mechanisms of Secondary Brain Damage from Trauma and Ischemia*. Springer, Vienna, **89**: 95–100.

Duncan, I.D., Bugiani, M., Radcliff, A.B., Moran, J.J., Lopez-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.

Eguibar, J.R., Cortes, C., Ahumada-Juárez, J.C., Piazza, V., Hernandez Gonzalez, V.H. (2021). The myelin mutant taiep rat as a model for developmental brain disorders, En: *Diagnosis, Management and Modeling of Neurodevelopmental Disorders*. Edición por Martin, C.R., Preedy, V.R., Rajendram, R. Academic Press, 557–566.

Eguibar, J.R., Cortes, C., Hernandez, V.H., Lopez-Juarez, A., Piazza, V., Carmona, D., Kleinert-Altamirano, A., Morales-Campos, B., Salceda, E., Roncagliolo, M. (2024). 4-aminopyridine improves evoked potentials and ambulation in the taiep rat: A model of hypomyelination with atrophy of basal ganglia and cerebellum. *PLoS ONE* **19**, e0298208.

Eguibar, J.R., Cortes, M. del 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 Behavior*. **102**: 118–123.

Eguibar, J.R., Cortés, Ma. del C. (2010). El mutante de mielina taiep como un modelo de crisis de ausencia. *Gaceta médica de México*. **146**: 11-18.

European Medicines Agency. (2020). Assessment report Fampridine Accord (Informe de evaluación No. EMA/CHMP/432671/2020). *European Medicines Agency*. Recuperado el 23 de agosto de 2024, de <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/fampridine-accord>

European Medicines Agency. (2011). *Assessment report Fampridine* (Informe de evaluación No. EMA/555661/2011). *European Medicines Agency*. Recuperado el 23 de agosto de 2024, de <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/fampridine-accord>

Fertuzinhos, S., Legué, E., Li, D., Liem, K.F. (2022). A dominant tubulin mutation causes cerebellar neurodegeneration in a genetic model of tubulinopathy. *Science advance*. **8**: eabf7262.

Fujihara, K., Miyoshi, T. (1998). The effects of 4-aminopyridine on motor evoked potentials in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* **159**: 102–106.

Garduno-Robles, A., Alata, M., Piazza, V., Cortes, C., Eguibar, J.R., Pantano, S., Hernandez, V.H. (2020). MRI features in a rat model of H-ABC tubulinopathy. *Frontiers in neuroscience*. **14**: 555.

Gavazzi, F., Charsar, B., Hamilton, E., Eler, J.A., Patel, V., Woidill, S., Sevagamoorthy, A., Helman, G., Schmidt, J., Pizzino, A., Muirhead, K., Takanohashi, A., Bonkowsky, J.L., Meyerhoffer, K., Simons, C., Doi, H., Satoko, M., Matsumoto, N., Delgado, M.R., Sanchez-Castillo, M., Wang, J., De Carvalho, D.R., Tournev, I., Chamova, T., Jordanova, A., Clegg, N.J., Nicita, F., Bertini, E., Teng, M., Williams, D., Tonduti, D., Houlden, H., Stellingwerff, M., Wassmer, E., Garcia-Cazorla, A., Bernard, G., Mirchi, A., Toutouchi, H., Wolf, N.I., Van Der Knaap, M.S., Shults, J., Adang, L.A., Vanderver, A.L. (2025). The natural history of variable subtypes in pediatric-onset TUBB4A-related leukodystrophy. *Molecular Genetics and Metabolism* **144**: 109048.

Glasscock, E., Voigt, N., McCauley, M.D., Sun, Q., Li, N., Chiang, D.Y., Zhou, X.-B., Molina, C.E., Thomas, D., Schmidt, C., Skapura, D.G., Noebels, J.L., Dobrev, D., Wehrens, X.H.T. (2015). Expression and function of Kv1.1 potassium channels in human atria from patients with atrial fibrillation. *Basic research in cardiology*. **110**: 505.

Glaudemans, B., Wijst, J. van der, Scola, R.H., Lorenzoni, P.J., Heister, A., Kemp, A.W. van der, Knoers, N.V., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2009). A missense mutation in the Kv1.1 voltage-gated potassium channel–encoding gene KCNA1 is linked to human autosomal dominant hypomagnesemia. *The Journal of Clinical Investigation*. **119**: 936.

Grillner, S., Zangger, P. (1979). On the central generation of locomotion in the low spinal cat. *Experimental Brain Research*. **34**: 241-261

Guertin, P.A. (2017). Rationale for assessing safety and efficacy of drug candidates alone and in combination with medical devices: the case study of Spinalon™. *Current pharmaceutical design*. **23**: 1778-1788

Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stühmer, W., Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological reviews*. **57**: 473–508.

Guyton, A.C., Hall, J.E. (2021). Funciones motoras de la médula espinal: los reflejos medulares. En: *Tratado de fisiología médica*, Decimotercera ed. Elsevier, España. 1707-1736.

Hamilton, E.M., Polder, E., Vanderver, A., Naidu, S., Schiffmann, R., Fisher, K., Raguž, A.B., Blumkin, L., H-ABC Research Group, Van Berkel, C.G.M., Waisfisz, Q., Simons, C., Taft, R.J., Abbink, T.E.M., Wolf, N.I., Van Der Knaap, M.S. (2014). Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum: further delineation of the phenotype and genotype–phenotype correlation. *Brain* **137**: 1921–1930.

Haro, M. (2014). Laboratorio de análisis de marcha y movimiento. *Revista Médica Clínica Las Condes*. **25**: 237–247.

Hernández Alvarado, E.S. (2021). Caracterización de las crisis de ausencia en la rata *taiep* hembra adulta bajo la administración central de prolactina. Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. 107.

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

Howard, J., Hyman, A.A. (2009). Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends. *Nature reviews molecular cell biology*. **10**: 569–574.

Irons, T.D., Kelly, P.E., Hunter, D.L., Macphail, R.C., Padilla, S. (2013). Acute administration of dopaminergic drugs has differential effects on locomotion in larval zebrafish. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **103**:792-813.

Jacobs, B.Y., Kloefkorn, H.E., Allen, K.D. (2014). Gait analysis methods for rodent models of osteoarthritis. *Current pain and headache reports*. **18**: 456.

Jensen, H.B., Ravnborg, M., Dalgas, U., Stenager, E. (2014). 4-Aminopyridine for symptomatic treatment of multiple sclerosis: a systematic review. *Therapeutic advances in neurological disorders* **7**: 97–113.

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.

Judge, S.I.V., Bever, C.T. (2006). Potassium channel blockers in multiple sclerosis: Neuronal Kv channels and effects of symptomatic treatment. *Pharmacology & Therapeutics*. **111**: 224–259.

Kandel, E.R., Koester, J.D., Mack, S.H., Siegelbaum, S.A. (2021). Principles of sensorimotor control. En: *Principles of Neural Science*, Sexta ed. MC Graw Hill. 713-737.

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.

Kostadinova, I., Danchev, N. (2019). 4-aminopyridine – the new old drug for the treatment of neurodegenerative diseases. *Pharmacia* **66**: 67–74.

Krajka, V., Vulinovic, F., Genova, M., Tanzer, K., Jijumon, A.S., Bodakuntla, S., Tennstedt, S., Mueller-Fielitz, H., Meier, B., Janke, C., Klein, C., Rakovic, A. (2022). H-ABC– and dystonia-causing TUBB4A mutations show distinct pathogenic effects. *Science advances* **8**: eabj9229.

Lakes, E.H., Allen, K.D. (2016). Gait analysis methods for rodent models of arthritic disorders: reviews and recommendations. *Osteoarthritis and cartilage*. **24**: 1837.

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

Lopez-Juarez, A., Gonzalez-Vega, A., Kleinert-Altamirano, A., Piazza, V., Garduno-Robles, A., Alata, M., Villaseñor-Mora, C., Eguibar, J.R., Cortes, C., Padierna, L.C. y Hernandez, V.H. (2021). Auditory impairment in H-ABC tubulinopathy. *Journal of Comparative Neurology*. **529**: pp. 957–968.

Lorincz, A. y Nusser, Z. (2008). Cell-Type-Dependent molecular composition of the axon initial segment. *The Journal of Neuroscience*, **28**: pp. 14329.

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

Maillard, C., Roux, C.J., Charbit-Henrion, F., Steffann, J., Laquerriere, A., Quazza, F. y Buisson, N.B. (2023). Tubulin mutations in human neurodevelopmental disorders. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **137**: pp. 87–95.

Manto, M. (2022). The underpinnings of cerebellar ataxias. *Clinical Neurophysiology Practice*, **7**: pp. 372–387.

Manto, M., Serrao, M., Filippo Castiglia, S., Timmann, D., Tzvi-Minker, E., Pan, M.-K., Kuo, S.-H., Ugawa, Y. (2023). Neurophysiology of cerebellar ataxias and gait disorders. *Clinical Neurophysiology Practice*, **8**: pp. 143–160.

Matchar, D.B., Kulasingam, S.L., Huntington, A., Patwardhan, M. y Mann, L.O. (2004). Positron emission tomography, single photon emission computed tomography, computed tomography, functional magnetic resonance imaging, and magnetic resonance spectroscopy and for the diagnosis and management of Alzheimer's dementia. *AHRQ Technology assessments. Agency for healthcare research and quality*, 30-37.

McGahan, K. y Keener, J. (2022). Modeling the kinetics of heteromeric potassium channels. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **16**: 1036813.

Minassian, K., Hofstoetter, U.S., Dzeladini, F., Guertin, P.A. y Ijspeert, A. (2017). The human central pattern generator for locomotion: Does It exist and contribute to walking? *The Neuroscientist*, **23**: pp. 649–663.

Möller, J.R., Durr, P.G., Quarles, R.H. y Duncan, I.D. (1997). Biochemical Analysis of Myelin Proteins in a novel neurological mutant: The taiep rat. *Journal of Neurochemistry*, **69**: pp. 773–779.

Nahas, N., Conant, A., Hamilton, E., Curiel, J., Simons, C., van der Knaap, M. y Vanderver, A. (2016). TUBB4A-Related Leukodystrophy. Recuperado el 14 de noviembre de 2024 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK385348/>.

Nashmi, R., Fehlings, M.G. (2001). Changes in axonal physiology and morphology after chronic compressive injury of the rat thoracic spinal cord. *Neuroscience* **104**: 235–251.

NINDS. (2022). The Myelin Disorders Biorepository Project. National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Recuperado el 11 de junio de 2024, de: <https://www.ninds.nih.gov/health-information/clinical-trials/myelin-disorders-biorepository-project>.

Noldus. (2011). CatWalk XT Reference Manual Version 9.1.

Paredes-Cruz, M., Grijalva, I., Martínez-López, Y.E., Guizar-Sahagún, G., Colín-Ramírez, E., Rojano-Mejía, D. (2022). Functional improvement in individuals with chronic spinal cord injury treated with 4-aminopyridine: A systematic review. *Frontiers in neurology*. **13**, 1034730.

Paskov, D.S., Agoston, S., Bowman, W.C. (1986). 4-Aminopyridine hydrochloride (Pymadin). En: *New neuromuscular blocking agents: basic and applied aspects*. Springer, pp. 679–717.

Paul, J.P. (1998). History and fundamentals of gait analysis. *Biomedical Materials and Engineering*. **8**: 123–135.

Poon, M. (1980). Induction of swimming in lamprey by L-DOPA and amino acids, *Journal of comparative physiology*. **136**: 337-344.

Robbins, C.A., Tempel, B.L. (2012). Kv1.1 and Kv1.2: Similar channels, different seizure models. *Epilepsia*. **53**: 134–141.

Rocha Reyna, F.A. (2013). 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, México. pp. 101.

Sase, S., Almad, A.A., Boecker, C.A., Guedes-Dias, P., Li, J.J., Takanohashi, A., Patel, A., McCaffrey, T., Patel, H., Sirdeshpande, D., Curiel, J., Shih-Hwa Liu, J., Padiath, Q., Holzbaur, E.L., Scherer, S.S., Vanderver, A. (2020). TUBB4A mutations result in both glial and neuronal degeneration in an H-ABC leukodystrophy mouse model. *eLife*. **9**: 52986.

Sigma-Aldrich. (2024). 4-aminopyridine (Safety data sheet No. Aldrich-A78403), Version 6.12. USA y Canadá.

Simons, C., Wolf, N.I., McNeil, N., Caldovic, L., Devaney, J.M., Takanohashi, A., Crawford, J., Ru, K., Grimmond, S.M., Miller, D., Tonduti, D., Schmidt, J.L., Chudnow, R.S., van Coster, R., Lagae, L., Kisler, J., Sperner, J., van der Knaap, M.S., Schiffmann, R., Taft, R.J., Vanderver, A. (2013). A de novo mutation in the  $\beta$ -tubulin gene TUBB4A results in the leukoencephalopathy hypomyelination with

atrophy of the basal ganglia and cerebellum. *The american journal of human genetics*. **92**: 767–773.

Sindhurakar, A., Mishra, A.M., Gupta, D., Iaci, J.F., Parry, T.J., Carmel, J.B. (2017). Clinically relevant levels of 4-aminopyridine strengthen physiological responses in intact motor circuits in rats, especially after pyramidal tract injury. *Neurorehabilitation Neural Repair*. **31**: 387–396.

Singh, S., Sinha, S. y Shirsat, M. (2018). Design, synthesis and evaluation of 4-aminopyridine analogues as cholinesterase inhibitors for management of alzheimer's diseases. *Indian journal of pharmaceutical education and research*, **52**(4).

Sinha, K., Karimi-Abdolrezaee, S., Velumian, A.A. y Fehlings, M.G. (2006). Functional changes in genetically dysmyelinated spinal cord axons of shiverer mice: role of juxtaparanodal Kv1 family K<sup>+</sup> channels. *Journal of Neurophysiology*, **95**: pp. 1683–1695.

Smith, D.O. (1980). Morphological aspects of the safety factor for action potential propagation at axon branch points in the crayfish. *The Journal of Physiology*, **301**: pp. 261–269.

Smith, K.J., Felts, P.A. y John, G.R. (2000). Effects of 4-aminopyridine on demyelinated axons, synapses and muscle tension. *Brain*, **123**: pp. 171–184.

Soderholm, H.E., Chapin, A.B., Bayrak-Toydemir, P. y Bonkowsky, J.L. (2020). Elevated leukodystrophy incidence predicted from genomics databases. *Pediatric Neurology*, **111**: pp. 66–69.

Stillman, J.D.B., Stillman, J.D.B., Muybridge, E. y Stanford, L. (1882). The horse in motion: as shown by instantaneous photography: with a study on animal mechanics founded on anatomy and the revelations of the camera: in which is demonstrated the theory of quadrupedal locomotion. Osgood, Boston. 15-16.

Takakusaki, K. (2013). Neurophysiology of gait: From the spinal cord to the frontal lobe. *Movement Disorders*, **28**: pp. 1483–1491.

The Children's Hospital of Philadelphia. (2024). Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum (H-ABC). *Children's Hospital of Philadelphia*. Recuperado el 16 de octubre de 2024, en: <https://www.chop.edu/conditions-diseases/hypomyelination-atrophy-basal-ganglia-and-cerebellum-h-abc>

Timotius, I.K., Roelofs, R.F., Richmond-Hacham, B., Noldus, L.P.J.J., von Hörsten, S. y Bikovski, L. (2023). CatWalk XT gait parameters: a review of reported parameters in pre-clinical studies of multiple central nervous system and peripheral nervous system disease models. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, **17**.

Tonduti, D., Aiello, C., Renaldo, F., Dorboz, I., Saaman, S., Rodriguez, D., Fettah, H., Elmaleh, M., Biancheri, R., Barresi, S., Boccone, L., Orcesi, S., Pichiecchio, A., Zangaglia, R., Maurey, H., Rossi, A., Boespflug-Tanguy, O. y Bertini, E. (2016). TUBB4A-related hypomyelinating leukodystrophy: New insights from a series of 12 patients. *European Journal of Paediatric Neurology*, **20**: pp. 323–330.

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

Vale, R.D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, **112**: pp. 467–480.

van den Heuvel, H. (2023). Automatic gait analysis: Cracking the code. Noldus. Recuperado el 31 de octubre de 2024, en: <https://www.noldus.com/blog/catwalk-meta-analysis>

Vanderver, A.L. (2023). *The myelin disorders biorepository project (MDBP)*. CHOP Research Institute. Recuperado el 17 de octubre de 2014, en: <https://www.research.chop.edu/the-myelin-disorders-biorepository-project-mdbp>

Verbny, Y., Zhang, C.-L. y Chiu, S.Y. (2002). Coupling of Calcium Homeostasis to Axonal Sodium in Axons of Mouse Optic Nerve. *Journal of Neurophysiology*, **88**(2): pp. 802–816.

Waddell, P.J., McCarthy, P.W. y Reeh, P.W. (1989). The effect of 4-aminopyridine on action potential shape and firing pattern of rat dorsal root ganglion neurones. *Pflugers Archiv*, **415**(5): pp. 505–512.

Wang, H., Kunkel, D.D., Martin, T.M., Schwartzkroin, P.A., Tempel, B.L. (1993). Heteromultimeric K<sup>+</sup> channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature*. **365**: 75–79.