



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Diseño de una prueba motora que evalúe la función de los movimientos finos en los modelos agudo y crónico de degeneración de las neuronas motoras lumbares por excitotoxicidad mediada por AMPA.

TESIS
Que para obtener el grado académico de
Biólogo

Presenta
Diana Elizabeth Colín Martínez

Dr. Ricardo Tapia Ibarguengoytia
División de Neurociencias, Instituto
de Fisiología Celular-UNAM
Director de tesis

Dra. Leticia Morales Ledesma
Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza
Asesora interna



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y particularmente a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, sede en la que realicé mis estudios de licenciatura.

Al instituto de Fisiología celular por brindarme la oportunidad de elaborar esta tesis en sus instalaciones.

Esta tesis forma parte de los proyectos de investigación apoyados por el CONACYT (Proyecto 249817) y Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (Proyecto IN204516) en el laboratorio del Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoytia (IN204516)

A los directores que asesoraron el desarrollo de esta tesis:

Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoytia

Dra. Leticia Morales Ledesma

A los miembros del jurado:

Dra. Juana Monroy Moreno

Dra. Elizabeth Vieyra Valdez

Dra. Deyra de los Ángeles Ramírez Hernández

Al coordinador de la asignatura Laboratorio de Prácticas de Biología de Animales II en la Facultad de Ciencias, UNAM, Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, por permitirme el uso del equipo que permitió el desarrollo de la prueba motora sujeto de este estudio.

Agradecimientos personales

En un principio, agradezco que esta sección sea coloquial, en lo personal siempre había amado escribir hasta que me encontré en la necesidad de hacerlo en un estilo formal (la temible tesis).

Desde que tengo memoria enfoque mis metas en estudiar una Licenciatura, miro con desconcierto este momento, momento en que finalmente me titulo. Jamás me dijeron que este paso es solo el comienzo.

Estoy profundamente agradecida por haber tenido la oportunidad de trabajar bajo la tutoría del Dr. Ricardo Tapia. Recordaré con cariño el día en que me citó para decidir si sería o no mi mentor, las pilas de papel en su oficina y su semblante sereno, reflejo de toda una vida dedicada a la ciencia, despertaron en mi la ansiedad de aprender de él todo lo posible. Hoy tengo la certeza de que ha sido un gran maestro. Gracias por darme la oportunidad de crecer dirigida por sus enseñanzas.

Uri Nimrod, has sido mi pilar, en lo académico y en lo personal. Gracias por compartir conmigo tu pasión por la ciencia, por limpiar mis lagrimas cuando la frustración se atravesó en mi trayecto y nubló mis objetivos. Gracias por permitirme caminar de tu mano, juntos somos fortaleza.

Angélica Colín, siempre has sido mi inspiración, mi ejemplo y mi límite a superar, donde quiera que llegue debes saber que estaré ahí gracias a que eres mi hermana.

Hugo Colín, tu apresurado paso me hace sentir la necesidad de correr, es decir, de ser mejor cada día para así quizás ser tu ejemplo.

Armando Colín, guardo en mi corazón el amor que de ti he recibido, la fuerza en mi espíritu fue construida gracias a ti.

Esmeralda Martínez, para ti mis logros nunca fueron sorpresas, eran más bien el inevitable curso que las cosas debían tomar si estaban en mis manos. Tu confianza en mí ha sido tan grande que un día cualquiera se convirtió en mi propia seguridad.

Gerardo Colín, el hombre más admirable que existe, debes saber que mi principal objetivo es ser incluso más grande que tú, te dedico este que es el primer peldaño para conseguirlo.

Y finalmente, gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, hogar que cobija y acrecienta mis sueños.

La mayoría de la gente dice que el intelecto es lo que hace a un gran científico, están equivocados: es el carácter.

Albert Einstein

Índice

I.- Resumen.....	1
II.- Lista de abreviaturas.....	3
III.- Introducción.....	4
La médula espinal.....	5
Neuronas motoras espinales.....	5
Neurotransmisores en la médula espinal.....	8
Transmisión neuromuscular.....	8
Enfermedades que afectan a la médula espinal.....	12
Neurotransmisión glutamatérgica.....	14
Excitotoxicidad.....	15
IV.- Antecedentes.....	16
Modelos de degeneración de MNs.....	16
Pruebas motoras utilizadas en el laboratorio.....	17
Desventajas de las pruebas motoras usadas en el laboratorio.....	19
V.- Hipótesis.....	20
VI.- Objetivos.....	20
VII.- Método.....	21
VIII.- Resultados.....	25
IX.- Discusión.....	41
X.- Conclusión.....	45
XI.-Referencias.....	45

I.- Resumen

La muerte selectiva de neuronas es la principal característica de las enfermedades neurodegenerativas. La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se distingue por la degeneración de las neuronas motoras (MNs) de la corteza cerebral, el tallo cerebral y la médula espinal. Consecuentemente, los pacientes desarrollan debilidad muscular, espasticidad, parálisis y finalmente muerte por falla respiratoria después de 3 a 5 años del diagnóstico. Interesantemente, tanto en pacientes como en modelos transgénicos se identificaron grupos musculares que son propensos a la denervación desde etapas asintomáticas de la enfermedad, los cuales están compuestos de fibras tipo FR y FF. Por el contrario, se identificaron grupos musculares que son resistentes a la denervación incluso en etapas sintomáticas de la enfermedad, una de las características que tienen en común es que están conformados preferentemente con fibras tipo 1. Lo anterior nos enfatiza la relación entre los diferentes grupos musculares y la progresión de la enfermedad, resaltando la importancia de la evaluación de la capacidad motora asociada a cada grupo.

Los eventos causales de la ELA no han sido dilucidados, sin embargo, se han descrito diversos mecanismos asociados a la degeneración de las MNs, en este laboratorio nos hemos enfocados en el proceso de excitotoxicidad. Basados en que la sobre-activación de receptores para glutamato tipo AMPA (receptor ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) en la médula espinal de rata conduce a la muerte de MNs mediada por un proceso de excitotoxicidad se diseñaron dos modelos de neurodegeneración. Un modelo de administración aguda de AMPA en rata mediante el uso de microdiálisis, que ocasiona degeneración de las MNs espinales y parálisis de la pata ipsilateral a la administración. Y un modelo crónico en el que se utilizan mini bombas osmóticas como medio de administración, el cual causa progresiva degeneración de MNs y déficit motor que culmina en parálisis bilateral de los cuartos traseros.

Las pruebas conductuales que se han empleado para cuantificar el déficit motor son el rotarod, el medidor de fuerza de agarre (GSM), y la resistencia de agarre de la pata (PGE). Que evalúan principalmente la funcionalidad de los músculos correspondientes a la tibia, fíbula y fémur; compuestos preferentemente por fibras tipo S y FR. Sin embargo, en etapas tempranas de la parálisis causada por la administración crónica de AMPA hemos observado un claro déficit motor en los músculos correspondientes a las falanges, el metatarso y el tarso (formados preferentemente fibras tipo FR y FF) que no ha sido cuantificado con las pruebas mencionadas y se ha recurrido a métodos cualitativos para

reportarlo. Por ello, hemos considerado necesario el diseño de una prueba motora capaz de cuantificar primordialmente el déficit motor en los músculos distales de los cuartos traseros, objetivo principal de esta tesis.

La prueba *el registro de la tensión muscular ejercida por las falanges* (RTF), consiste en medir la tensión con la que la rata presiona un bulbo conectado a un transductor de fuerza; evaluando la tensión ejercida por los músculos correspondientes a las falanges, el metatarso y el tarso, pero no a la ejercida por los músculos correspondientes a la tibia, fíbula y fémur. Este test se utilizó para cuantificar el déficit motor de los cuartos traseros de ratas tratadas aguda y crónicamente con AMPA 6 mM y 7.5 mM, respectivamente.

El grupo administrado agudamente desarrolló un déficit motriz en ambas patas traseras pero de diferente magnitud, siendo mayor en la pata ipsilateral y menor en la contralateral. El grupo cuya administración crónica se realizó en la región lumbar L4-L5, presentó un déficit motor que inició en los músculos distales correspondientes a las falanges, el metatarso y el tarso, a partir del primer día post-cirugía en la pata ipsilateral y desde el tercer día en la pata contralateral. Un tercer grupo experimental tratado crónicamente con AMPA 7.5 mM pero en la región lumbar L2-L3 presentó evidente déficit motor de los músculos correspondientes a la tibia, la fíbula y el fémur pero no de los correspondientes al tarso, el metatarso y las falanges. Presumiblemente los resultados de la prueba RTF de este grupo no fueron distintos a los obtenidos por el grupo control, sin embargo, el tiempo que tardaron en caer del rotarod sí disminuyó respecto al control, indicando que la prueba RTF evalúa principalmente la motricidad de los músculos distales del miembro y no evalúa la motricidad de los músculos proximales.

Concluimos que la prueba RTF es suficientemente sensible para permitirnos evaluar el déficit motor de los músculos distales de las extremidades posteriores; conformados principalmente por fibras tipo FR y FF. La relación entre déficit motor y tipo de fibra muscular podría ayudar a entender el mecanismo de degeneración de las MNs en la ELA y también ayudar al diseño de estrategias para prevenir y atenuar la pérdida de las MNs en esta enfermedad.

II.- Lista de abreviaturas

AME: Atrofia muscular espinal

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

ELAF: Esclerosis lateral amiotrófica Familiar

ELAS: Esclerosis lateral amiotrófica esporádica

FF: Fibra muscular tipo 2B

FR: Fibra muscular tipo 2A

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

GSM: Grip strength meter

Ia: Neuronas dorsales que inervan el huso muscular

Ib: Neuronas dorsales que inervan el órgano de Golgi

II: Neuronas dorsales sensoriales que inervan el huso muscular

MNs: Neuronas motoras

NMDA: N-metil-D-aspartato

PB: Buffer de fosfato

PGE: Paw grip endurance task

Q: glutamina

R: Arginina

RTF: Registro de la tensión muscular ejercida por las falanges

S: Fibra muscular tipo 1

SMI 32: Filamento pesado fosforilado

SMN1: Gen de supervivencia de MNs

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

UMs: Unidades motoras

III.- Introducción

La médula espinal.

El sistema nervioso está dividido en central (SNC) y periférico (SNP). El SNC está constituido por el cerebro y la médula espinal, el periférico esta formado por los nervios que salen del SNC hacia los diferentes órganos del cuerpo. La médula espinal se divide longitudinalmente en cervical, lumbar, torácica, sacra y coxígea; cada región controla el movimiento de secciones particulares del cuerpo. En este estudio nos enfocamos en los segmentos lumbares, responsables del movimiento de las extremidades posteriores de la rata o bien de los miembros inferiores en el humano. En la rata la médula espinal se divide en 34 segmentos: 8 cervicales, 13 torácicos, 6 lumbares, 4 sacros y 3 coxígeos, mientras que en el humano se divide en 31 segmentos: 8 cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacros y un segmento coxígeo (Watson et al., 2009).

En un corte transversal de la médula espinal se observa con claridad a la materia gris que por su forma recuerda a la letra H mayúscula en donde los brazos son llamados astas dorsales y ventrales, también se puede distinguir a la materia blanca que recubre a la materia gris formando los funículos posterior, lateral y anterior. La materia gris adquiere esta tonalidad debido a que está compuesta de somas de neuronas, dendritas, células gliales y algunos axones. La materia blanca tiene este color debido a que está formada por axones y células gliales (Watson et al., 2009). En la figura 1 se ejemplifican las características mencionadas.

En la médula espinal las MNs se ubican en el asta ventral, desde donde proyectan sus axones hacia la periferia formando a las raíces ventrales. La raíz dorsal está formada por neuronas cuyo soma se encuentra en el ganglio de la raíz dorsal, uno de sus axones recibe impulsos sensoriales provenientes de la periferia y los lleva a su pericarion, el otro se dirige al asta dorsal para hacer sinapsis con las neuronas dorsales. El conjunto de una raíz dorsal y una ventral forma a los nervios espinales. Cada segmento de la médula espinal tiene un par de nervios espinales que viajan largas distancias hasta hacer contacto con sus respectivas fibras musculares (Cho, 2015; Watson et al., 2009), (figura 1).

Las neuronas e interneuronas de la médula espinal están organizadas en conjuntos, por ello se han identificado 9 capas celulares llamadas laminas I-IX y una región alrededor del canal central denominada lamina X. La lamina IX es de nuestro particular interés, siendo aquí donde se ubican los conjuntos de MNs (Cho, 2015; Watson et al., 2009).

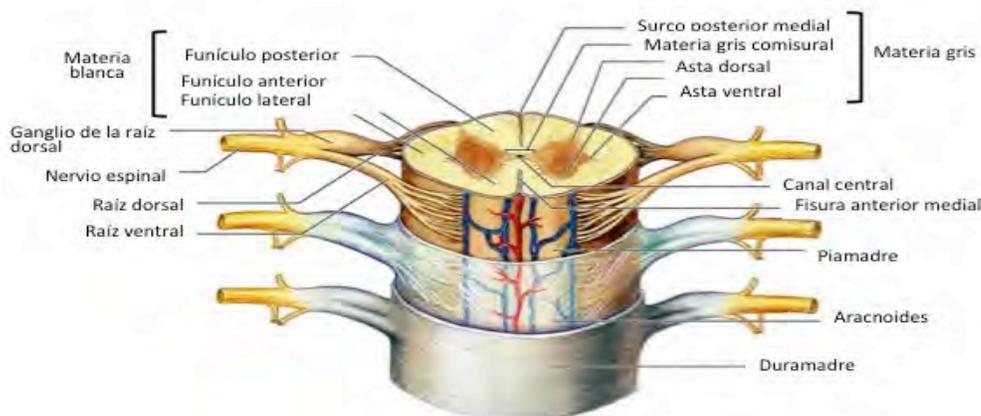


Figura 1. Anatomía de la médula espinal. Esquema de la médula espinal donde se ejemplifican las raíces dorsales y ventrales, el ganglio de la raíz dorsal, los funículos en que se divide la materia blanca, las astas dorsal y ventral de la materia gris y las meninges (piamadre, aracnoides y duramadre) que recubren a la médula espinal. Tomada y modificada de <http://2.bp.blogspot.com>.

Neuronas motoras espinales

La actividad de las MNs es modulada por la acción de fibras descendentes como el tracto corticoespinal (conjunto de axones que viajan desde la corteza motora), interneuronas espinales aledañas e impulsos desde la periferia. En los segmentos lumbares de humano las interneuronas superan en número a las MNs, se ha estimado que en una rebanada de 15 μm de grosor hay alrededor de 45 interneuronas y 20 MNs (Mai y Paxinos, 2011).

Las MNs espinales tienen una organización somatotópica, es decir, se ubican en los segmentos medulares de acuerdo a la posición antero-posterior del músculo al que inervan y están distribuidas en conjuntos o pools. En la región lumbar se diferencian cuatro conjuntos: ventromedial, central, ventrolateral y dorsolateral. Las dendritas de estas MNs corren juntas formando ramilletes longitudinales, esto permite la sincronización de la activación específica de grupos musculares. Un ejemplo de ello son los músculos distales de las extremidades que se encargan de los movimientos finos de las falanges que

requieren de una activación muscular precisa y coordinada. Esta activación es posible debido a que las MNs de músculos distales se encuentran en la columna dorsolateral y tienen dendritas poco ramificadas lo que disminuye el contacto con neuronas adyacentes. Por otro lado, las MNs que se distribuyen más dorsalmente dentro de estos conjuntos inervan a músculos flexores y las que se localizan más ventralmente inervan a músculos extensores (Mai y Paxinos, 2011), (figura 2).

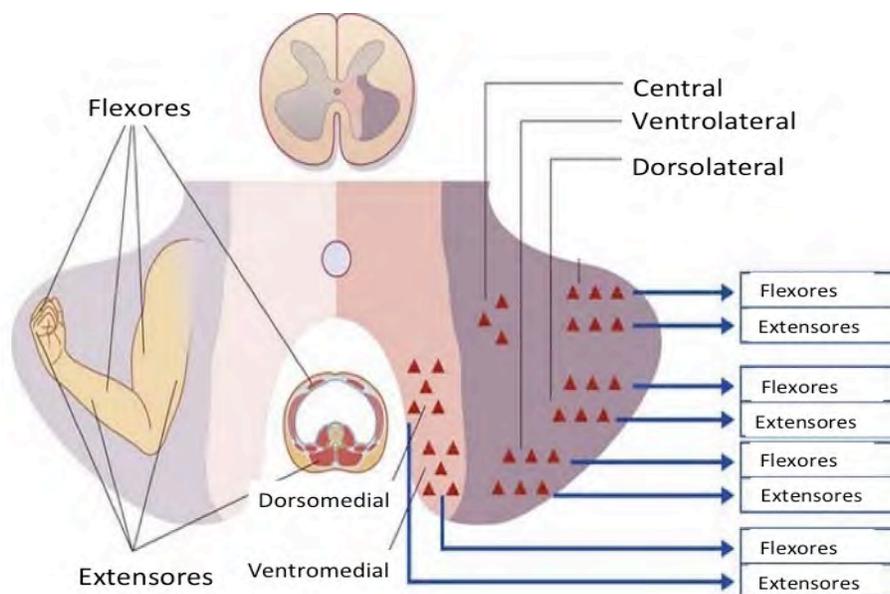


Figura 2. Organización somatotópica de los conjuntos de MNs lumbares. En la lámina IX las MNs se distribuyen en 4 conjuntos: ventromedial, central, ventrolateral y dorsolateral. Dentro de estos conjuntos, las MNs que inervan a músculos flexores se localizan más dorsalmente y las que inervan a músculos extensores se sitúan más ventralmente. Tomada y modificada de <https://www.google.com.mx/url2Fspinal-cord>.

En la tabla 1 se presenta un resumen de los segmentos lumbares en que se encuentran los somas de las MNs que inervan a los músculos de las extremidades posteriores de tres especies (ratón, rata y humano) y la función de cada músculo (Drake et al., 2015; Mohan et al., 2015; Watson et al., 2009). Complementario a lo anterior, en la figura 3A se ilustra la región de la médula espinal de rata donde se ubican las MNs que inervan a las extremidades posteriores y en la 3B los músculos de los miembros inferiores del humano.

Las MNs se clasifican en alfa, beta y gamma. Las MNs alfa tienen un alto umbral de activación, disparan a alta frecuencia y sus axones densamente mielinizados tienen un diámetro de 10 a 20 μm . Inervan a las fibras extrafusales de tipo 2A y 2B (FR y FF, por sus siglas en inglés), distinguidas por ser de contracción rápida y fatigables. Las MNs

gamma tienen un bajo umbral de activación, disparan a baja frecuencia y sus axones levemente mielinizados tienen un diámetro de 5 μm . Inervan a las fibras intrafusales de tipo I (S, por sus siglas en inglés) caracterizadas por ser de lenta contracción y resistentes a la fatiga. Las MNs beta envían sus proyecciones a fibras musculares extrafusales e intrafusales (Mai y Paxinos, 2011; Watson et al., 2009). Más adelante se retomarán las características de los tipos de fibras y se explicará su relación con la degeneración de las MNs.

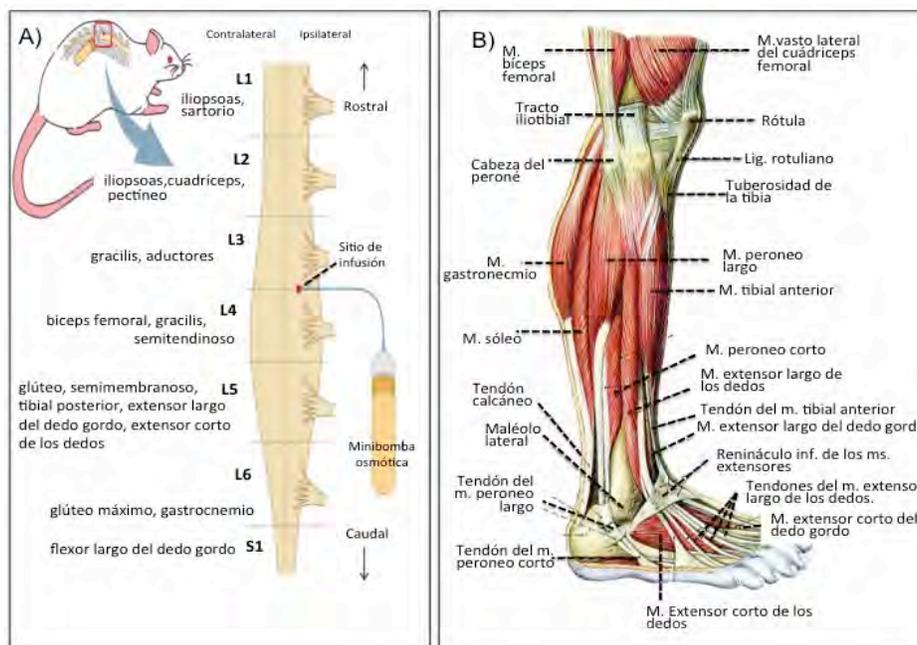


Figura 3. Músculos inervados por las MNs de los segmentos lumbares de la médula espinal. A) Se ilustran los segmentos lumbares y sacros en donde se sitúan las MNs que inervan a los músculos de los cuartos traseros de la rata, además se ilustra el sitio en el que se inserta la cánula conectada a la mini bomba osmótica, implante empleado en el modelo crónico de AMPA. (Tomada y modificada de (Lazo-Gomez y Tapia, 2017). B) Se esquematizan algunos de los músculos localizados en los miembros inferiores de humano que son inervados por MNs de los segmentos lumbares. (Tomada y modificada de <https://www.google.com.mx/urlsa>.)

Tabla 1. Distribución somatotópica de las MNs que inervan a los músculos de los miembros posteriores del ratón, la rata y el humano (Recabado de (Drake et al., 2015; Mohan et al., 2015; Watson et al., 2009).

Músculo	Segmentos en el ratón	Segmentos en la rata	Segmentos en el humano	Acción del músculo
Gastrocnemio	L2	L4-S1	S1, S2	Flexión plantar del pie y flexión de la rodilla. Motor en la propulsión al iniciar la marcha.
Cuádriceps	L1-L3			Extensión de rodilla y flexor de cadera.
Sóleo	L3, L4		S1,S2	Flexión plantar del pie.
Plantar	L3, L4		S1,S2	Flexión plantar del pie y flexiona la rodilla.
Aductor	L1-L3		L2-L4	Gira el muslo en la articulación de la cadera.
Grácil	L1-L3	L2-L5	L2, L3	Aducción y flexión de la cadera, la pierna en articulación de la rodilla
Iliaco			L2, L3	Flexiona el muslo en la unión a la cadera.
Bíceps femoral	L3, L4	L2-L5	L5-S2	Flexiona la pierna en la articulación de la rodilla; extiende y gira lateralmente el muslo en la articulación de la cadera y gira lateralmente la pierna en la articulación de la rodilla.
Semitendinoso		L4-L5	L5-S2	Flexiona la pierna en la articulación de la rodilla, extiende muslo en la articulación de la cadera.
Tibial anterior	L3	L3-L5	L4-L5	Flexión dorsal del pie en el tobillo e inversión del pie, soporte del arco del pie.
Extensor largo de los dedos	L3		L5,S1	Extensión de los cuatro dedos laterales y flexión dorsal del pie.
Extensor largo del dedo gordo	L3	L5-S1	L5,S1	Extensión del dedo gordo y flexión dorsal del pie.
Flexor largo de los dedos	L3, L4		S2,S3	Flexiona los cuatro dedos laterales, controla el movimiento de los dedos durante la marcha.
Flexor largo del dedo gordo	L3, L4	S1, S2	S2,S3	Flexiona el dedo gordo del pie, participa en la flexión plantar, involucrado en el movimiento del dedo gordo durante la marcha.
Tibial posterior	L3, L4		L4,L5	Flexión plantar del pie, apoyo del arco medial del pie al caminar.
Músculos interóseos		S2, S3	S2, S3	Aducción de los dedos
Extensor corto de los dedos		L5, S1	S1, S2	Extensión de los dedos II-IV
Flexor corto de los dedos		S2, S3	S1-S3	Flexiona los dedos del II-V en la segunda articulación interfalángica.

Neurotransmisores en la médula espinal

Las neuronas e interneuronas de la médula espinal utilizan diversos neurotransmisores: acetilcolina, glutamato, GABA (ácido gamma-aminobutírico), glicina, aspartato, sustancia P, serotonina, dopamina, noradrenalina, neuropéptido Y, péptidos opioides, entre otros (Mai y Paxinos, 2011; Watson et al., 2009). Acetilcolina es el neurotransmisor que las MNs emplean en la sinapsis neuromuscular con la placa motora. Por otro lado, el resto de los neurotransmisores mencionados son empleados por las interneuronas, de los cuales sobresale la función del glutamato y el aspartato como excitadores y del GABA y la glicina como inhibidores (Ramirez-Jarquín et al., 2014). Más adelante abordaremos algunas características del glutamato y sus receptores.

Transmisión neuromuscular

La comunicación entre MN y músculo se conoce como transmisión neuromuscular y consta de una sinapsis química entre las MNs y las fibras musculares. Acetilcolina, que es liberado desde la presinapsis, activa a sus receptores en la postsinapsis, esto permite la entrada de Na^+ al citoplasma desencadenando un potencial de acción en la membrana del músculo esquelético que activa a los canales de calcio sensibles a voltaje en la membrana del retículo sarcoplásmico, también llamados receptores de dihidropiridina, así el calcio necesario para la contracción de las fibras musculares sale al citoplasma (Keynes et al., 2011).

Las fibras musculares están formadas por miofibrillas compuestas de filamentos de actina, miosina y las proteínas tropomiosina y troponina. Para que ocurra la contracción de la fibra muscular el filamento de actina se desliza sobre los filamentos de miosina. Troponina tiene un sitio de unión a Ca^{2+} y está unida a tropomiosina quien a su vez se une al filamento de actina. Tropomiosina obstruye el sitio en la actina que tiene afinidad a la cabeza de miosina, cuando el Ca^{2+} se encuentra en el citoplasma se une a troponina y provoca cambios conformacionales que ocasionan que tropomiosina deje expuestos los sitios de actina afines a miosina, así la cabeza de miosina se une al filamento de actina.

La cabeza de miosina tiene actividad de ATPasa y un sitio de unión a ATP. Cuando la cabeza de miosina y el filamento de actina están unidos una molécula de ATP se une a la cabeza de miosina quien a su vez la hidroliza. Consecuentemente la cabeza de miosina se separa del filamento de actina. En cada ciclo de unión y desunión entre la actina y la miosina el filamento de actina se desliza sobre las cabezas de miosina provocando la contracción. La contracción se detiene cuando los niveles de Ca^{2+} disminuyen, esto pasa en consecuencia de la repolarización de la fibra muscular y la

recaptura del calcio en el retículo sarcoplásmico por medio de la bomba de Ca^{2+} (Gardiner, 2001; Keynes et al., 2011).

A la unión entre axón y fibra muscular se le conoce como unión neuromuscular. Un mismo axón es capaz de inervar a más de una fibra muscular y a este arreglo se le conoce como unidad motora (UM), de esta manera la activación de un axón estimula coordinadamente a varias fibras musculares. La locomoción requiere de la contracción (activación) de un músculo determinado y la relajación (inhibición) del músculo opuesto a este. En este proceso participan diversos elementos: MNs alfa, beta y gama, interneuronas excitadoras e inhibitoras, neuronas aferentes sensoriales del huso muscular y en el órgano del tendón de Golgi y vías descendentes como el tracto corticoespinal (Kandel et al., 2000; Keynes et al., 2011; Per Brodal, 2010).

El órgano del tendón de Golgi se encuentra en la unión entre el tendón y el músculo, está compuesto de fibras de colágeno entrelazadas con axones de las neuronas dorsales aferentes (*Ib*, por sus siglas en inglés). Cuando el músculo se contrae ocurre un cambio en la distensión de estas fibras que genera un potencial de acción el cual es conducido por las *Ib* al asta dorsal de la médula espinal (Kandel et al., 2000).

El huso muscular está compuesto de axones aferentes y eferentes en contacto con las fibras intrafusales del músculo. Las fibras aferentes son las neuronas dorsales que inervan el huso muscular (*Ia*, por sus siglas en inglés) y las neuronas dorsales sensoriales que inervan el huso muscular (*II*), los axones eferentes corresponden a las MNs gamma. Las *Ia* se enrollan en las fibras intrafusales y censan que tan estirado está un músculo.

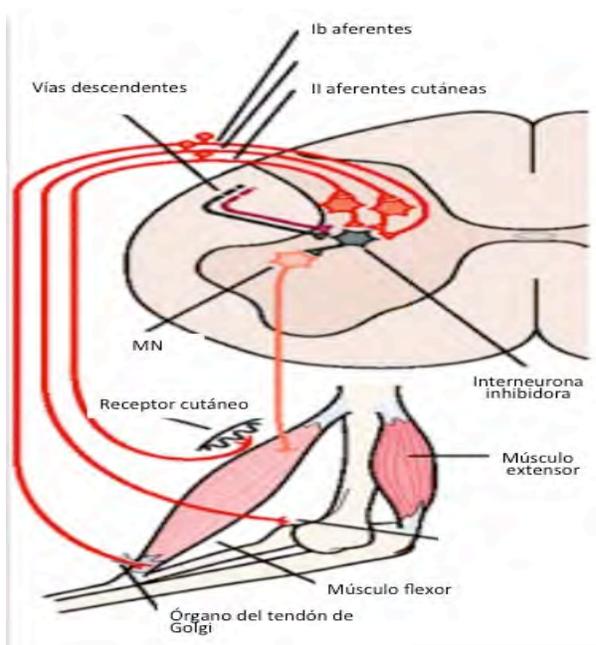


Figura 4. Circuitos que participan en el Reflejo de estiramiento.

Las MNs en la médula espinal reciben proyecciones que modulan su activación o inhibición y consecuentemente la contracción o relajación de un músculo. Estas proyecciones son: las fibras aferentes *Ia* y *II* del huso muscular, las *Ib* del órgano del tendón de Golgi, fibras aferentes de las articulaciones, y fibras descendentes, tomado y modificado de (Kandel et al., 2000).

Las terminales de las // pueden estar en forma libre o modificadas en receptores sensoriales especializados. Las /a y las // viajan por la raíz dorsal y forman interacciones polisinápticas con interneuronas o directamente con las MNs. Ambas fibras aferentes inervan tanto a MNs del músculo homónimo como a MNs del músculo opuesto, de esta manera al mismo tiempo que un músculo es activado el opuesto es inhibido. Los axones eferentes modulan la tasa de disparo de las fibras aferentes e inervan a las fibras intrafusales (figura 4)(Kandel et. al., 2000).

Los músculos que llevan a cabo movimientos finos requieren de un alto grado de control motor pero poca tensión (fuerza), como es el caso de los músculos intrínsecos de la mano o los músculos encargados del movimiento de los ojos, los cuales tienen como característica estar conformados por UMs pequeñas (decenas de fibras musculares inervadas por una sola MN). Por otro lado, los músculos que generan mayor tensión requieren que un mayor número de fibras musculares se activen al mismo tiempo, como es el caso del músculo cuádriceps, por ello están conformados por UMs grandes (cientos de fibras musculares que son inervadas por una sola MN) (Per Brodal, 2010).

A simple vista se puede observar que algunos músculos son de color rojo y otros de color blanco, a partir de esta diferencia se determinó que están conformados por diferentes tipos de fibras musculares, las cuales se clasifican en fibras tipo S y FF y FR. Las fibras tipo S son de color rojo debido a su alto contenido de mioglobina, se caracterizan por ser de lenta contracción, capaces de mantener la contracción por periodos largos, resistentes a la fatiga, tienen alto contenido de mitocondrias, menos calsecuestrina (proteína de unión a calcio), un sarcoplasma poco desarrollado, mayor actividad de enzimas del ciclo de Krebs y su principal metabolismo es aerobio.

Las fibras tipo FR y FF son de color blanco, son capaces de ejercer una rápida contracción, metabolismo principalmente anaerobio, tienen menos mioglobina, un retículo sarcoplásmico muy desarrollado, tienen más calsecuestrina, mayor actividad de enzimas de la glucólisis, son inervadas por MNs alfa. Las FR tiene relativamente alta capacidad oxidativa y por ello son relativamente resistentes a la fatiga, las tipo FF tienen baja capacidad oxidativa, por lo que son fatigables (Carvalho y Swash, 2016; Gardiner, 2001; Keynes et al., 2011).

En general los músculos se componen de ambos tipos de fibras en proporciones diferentes de acuerdo a su función. En algunos casos se componen preferentemente de un tipo de fibras, como es el caso del músculo sóleo que mayoritariamente tiene fibras S o

el músculo extensor largo de los dedos compuesto de fibras FF. Los músculos con UM pequeñas contienen fibras FR-FF por el contrario las UM grandes constan principalmente de fibras tipo S (Carvalho y Swash, 2016; Gundersen et al., 1988).

Enfermedades que afectan a la médula espinal

La médula espinal puede ser afectada por infecciones, lesiones, y enfermedades esporádicas o hereditarias, provocando disminución en la capacidad motora del individuo. Como ejemplos hablaremos de la atrofia muscular en la médula espinal (Palastanga et al.), la poliomielitis, la siringomielia y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), haciendo particular énfasis en esta última.

Atrofia muscular en la médula espinal

Es un padecimiento genético causado por la delección en el gen de supervivencia de MNs (SMN1), en consecuencia la proteína que codifica es disfuncional o rápidamente degradada, lo que provoca degeneración de las MNs espinales y déficit motor. La severidad en las alteraciones motoras es proporcional a la edad en que inicia la enfermedad. Basados en ello se han descrito 4 tipos de AME, siendo el tipo 0 el que provoca mayores discapacidades motoras y el tipo 4 el que desarrolla menores alteraciones. En el tipo 0 los síntomas comienzan en etapa neonatal y debido a fallas respiratorias los niños no viven más de 6 meses. En el tipo 4 los síntomas comienzan en la etapa adulta y sólo se afectan las extremidades posteriores por lo que la expectativa de vida no se modifica. El tiempo que tardan en aparecer los síntomas depende del número de copias del gen SMN1 (Kolb y Kissel, 2015).

Poliomielitis

La poliomielitis es causada por el poliovirus. Se transmite de manera oral y se incuba en la faringe y en el intestino, posteriormente se disemina por el torrente sanguíneo hacia el sistema nervioso central, afectando particularmente a las MNs. Los síntomas son faringitis, náuseas, vómito, meningitis, dolor muscular, espasmo muscular, fasciculaciones, debilidad muscular y parálisis. Esta enfermedad fue una epidemia mundial hasta que en 1956 se diseñó la vacuna para la poliomielitis, hoy en día casi se ha erradicado (Kidd et al., 1996).

Siringomielia

La siringomielia puede ser congénita o presentarse después de una infección, tumor o lesión en la médula espinal. En cualquiera de los casos ocurre un desorden en el flujo del líquido cefalorraquídeo que provoca acumulación de líquido en el canal central de la médula llamada quiste o siringe. Los pacientes con siringomielia presentan dolor, debilidad, pérdida de sensibilidad y rigidez en espalda, hombros y extremidades. El tratamiento consiste en una intervención quirúrgica de acuerdo a la etiología del quiste (Vandertop, 2014).

Esclerosis lateral amiotrófica

La ELA fue descrita en 1869 por Jean Martin Charcot, es una enfermedad neurodegenerativa que afecta selectivamente a las MNs del tallo cerebral, la médula espinal, y la corteza motora, puede ser de inicio bulbar o lumbar. Como consecuencia de la pérdida de MNs provoca debilidad muscular, espasticidad, fasciculaciones, parálisis progresiva y finalmente muerte por falla respiratoria entre los 3 a 5 años después del diagnóstico. Se estima que su incidencia es de 1.5 a 2.5 personas por cada 100,000 habitantes, en Estados Unidos aproximadamente 20,000 personas padecen ELA (Lillo et al., 2014).

Se han descrito dos tipos de la enfermedad de acuerdo a su origen: esclerosis lateral amiotrófica esporádica (ELAS) y esclerosis lateral amiotrófica familiar (ELAF). La ELAF es ocasionada por mutaciones en diversos genes como superóxido dismutasa tipo 1 (SOD1), *FUS/TLS*, *TARDBP*, y *C9ORF72*, mientras que el origen de la ELAS no se ha determinado (Gros-Louis et al., 2006). Estas mutaciones han sido utilizadas para generar modelos transgénicos experimentales que permiten el estudio de los mecanismos involucrados en la degeneración de las MNs, sin embargo, estos modelos transgénicos únicamente son representativos de la ELAF.

En tejido de pacientes con ELA y modelos transgénicos de ELAF se han descrito diversos mecanismos asociados con la degeneración de las MNs, algunos de ellos son el déficit de transporte axonal, falla energética, estrés oxidativo, procesos de inflamación, agregación de proteínas, alteraciones sinápticas y la excitotoxicidad (Gros-Louis et al., 2006; Kiernan et al., 2011; Santa-Cruz et al., 2012). Más adelante se abordará a detalle el proceso de excitotoxicidad siendo este de nuestro particular interés.

A pesar de que la característica principal de la ELA es la degeneración selectiva de MNs, se han reportado ciertos grupos de MNs y fibras musculares resistentes a esta,

es decir, que sobreviven aún en pacientes con ELA avanzada, como es el caso de las MNs y fibras musculares del núcleo de Onuf y las MNs que controlan al músculo oculomotor (Carvalho et al., 1995). Esta resistencia podría estar relacionada con las propiedades del tipo de fibra y MN correspondientes a estos músculos.

En relación con lo anterior, en un estudio en el que usó un modelo de ELAF, ratones transgénicos SOD1-G93A que expresan un gen humano mutado para la SOD 1 y consecuentemente desarrollan muerte progresiva de MNs y parálisis, se determinó que algunos músculos pierden las conexiones neuromusculares durante la etapa preclínica, a estos se les llamó sensibles a la denervación, y otros lo hacen después de la aparición de los síntomas, es decir, resistentes a la denervación. Interesantemente, los músculos sensibles a la denervación estaban compuestos principalmente por MNs y fibras tipo FF y FR, por el contrario los músculos resistentes a la denervación estaban formados por MNs y fibras tipo S (Pun et al., 2006).

Neurotransmisión glutamatérgica

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el SNC. En neuronas glutamatérgicas, se ha estimado que la concentración de glutamato en vesículas sinápticas es de entre 60-250 mmol/L, mientras que en el citosol la concentración se estima en 1 mM (Brady y Siegel, 2012). Los receptores para glutamato se clasifican en ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos son canales permeables a cationes (Na^+ y Ca^{2+}) mientras que los receptores metabotrópicos activan enzimas intracelulares a través de proteínas G. Los receptores ionotrópicos para glutamato se dividen en tres tipos y llevan el nombre de su agonista selectivo: los N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) y kainato (Choi, 1988).

El receptor AMPA, se distribuye en todo el SNC y es un homo o hetero-oligómero conformado por 4 subunidades GluR1-GluR4. Es permeable a K^+ y Ca^{2+} , la permeabilidad a Ca^{2+} es regulada por la presencia de un residuo de arginina (R) (aminoácido con carga positiva) o glutamina (Q) (aminoácido neutro) presente en el segundo dominio membranal (M2) del receptor, sitio llamado Q/R. La carga positiva de arginina contribuye a la baja permeabilidad a Ca^{2+} mientras que el residuo de Q favorece la permeabilidad. En el sitio Q/R la subunidad GLUR2 tiene un residuo de R y las subunidades GluR1, GluR3 y GluR4 tienen un residuo de Q. Hay dos formas de GLUR2 (variantes de empalme), denominadas como GLUR2R y GLUR2Q, que poseen un residuo de arginina o glutamina en el sitio

Q/R, respectivamente. Por lo tanto, los receptores con la subunidad GLUR2R no son permeables a Ca^{2+} y los receptores sin GLUR2 o con la variante GLUR2Q sí son permeables Ca^{2+} (Brady y Siegel, 2012; Corona y Tapia, 2007). En la figura 5 se ilustran las características del receptor tipo AMPA. El influjo de calcio en la célula genera potenciales de acción o bien actúa como segundo mensajero, sin embargo niveles altos de Ca^{2+} intracelulares puede desencadenar procesos deletéreos, esto último es conocido como excitotoxicidad.

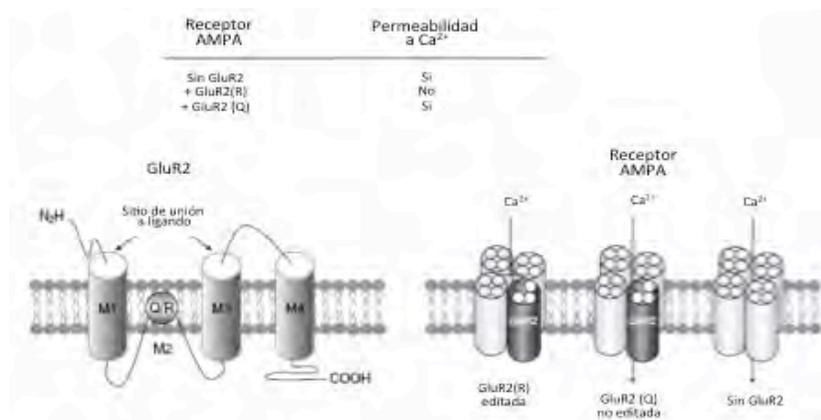


Figura 5. Receptores para glutamato tipo AMPA. La permeabilidad a Ca^{2+} es determinada por la ausencia o presencia de la subunidad GLUR2R, o bien por la presencia de la forma GLUR2Q (a la derecha). Estructura y sitio Q/R en la subunidad GLUR2 (a la izquierda) (tomado y modificado de (Corona et al., 2007)).

Excitotoxicidad

Desde 1957 se describió que la exposición sostenida a glutamato provoca la muerte de neuronas de la retina. Experimentos subsecuentes comprobaron que esta reacción no es exclusiva para un sólo tipo de neuronas. A este proceso se le llamó excitotoxicidad, definiéndose como la entrada exacerbada de Ca^{2+} extracelular al medio intracelular por medio de la sobreactivación de receptores para glutamato que desencadena procesos deletéreos para la célula (Corona et al., 2007).

La concentración citoplasmática de Ca^{2+} en las neuronas en reposo se mantiene alrededor de 100 nM, 10.000 veces menor que la concentración en el espacio extracelular. Para lograr esto, las neuronas poseen mecanismos de amortiguamiento: proteínas de unión a Ca^{2+} , el secuestro del ion en el retículo endoplasmático y en la mitocondria. Sin embargo cuando la entrada de Ca^{2+} no es amortiguada entonces la concentración intracelular aumenta y puede desencadenar múltiples procesos deletéreos: daño mitocondrial, déficit energético, generación especies reactivas de oxígeno, despolarización de la membrana y activación de enzimas líticas como proteasas, lipasas,

fosfatasa, endonucleasas, activación de caspasas y calpaínas, fosforilación de proteínas e hidrólisis de lípidos, alteraciones en la expresión genética, daño proteolítico al citoesqueleto y desensamble de microtúbulos (Siesjo, 1994). En las MNs el daño producido por estas alteraciones es mayor debido a que no tienen suficiente capacidad de amortiguamiento de Ca^{2+} en la mitocondria debido a que tienen menor densidad mitocondrial por volumen en comparación con las neuronas no motoras, son deficientes en proteínas de unión a Ca^{2+} como calbindina D-28K y parvalbúmina (Santa-Cruz et al., 2012) y además los receptores AMPA permeables al Ca^{2+} son abundantes en las MNs espinales, esto último les confiere vulnerabilidad a la excitotoxicidad mediada por el este receptor (Corona y Tapia, 2007).

Evidencias clínicas sugieren que la excitotoxicidad esta relacionada con los procesos degenerativos que llevan a la muerte de las MNs en la ELA. En tejido post-mortem de corteza cerebral y médula espinal de pacientes con ALS se reportó que hay reducción del transportador de glutamato 1, lo cual podría propiciar el acumulamiento del neurotransmisor en el espacio sináptico (Rothstein et al., 1992). Se determinó que en el líquido cefalorraquídeo y suero sanguíneo de pacientes existe un incremento en los niveles de aminoácidos excitadores, así como pulsos pareados en músculos en reposo, signo de hiperexcitabilidad muscular (Kostera-Pruszczyk et al., 2002; Malessa et al., 1991; Niebroj-Dobosz et al., 2002).

IV.- Antecedentes

Modelos de degeneración de MNs por excitotoxicidad mediada por AMPA desarrollados en el laboratorio.

En nuestro laboratorio se han desarrollado dos modelos *in vivo* para estudiar la degeneración de las MNs lumbares por excitotoxicidad y su consecuente déficit motor. Ambos modelos inducen la degeneración de las MNs mediante la sobre activación de receptores para glutamato tipo AMPA, causada por la administración aguda o crónica del su agonista selectivo AMPA lo cual causa el influjo exacerbado de Ca^{2+} que desencadena la activación de procesos deletéreos que conllevan a la muerte de las MNs espinales. Para determinar que el agente causal de la muerte de las MNs en estos modelos es la entrada exacerbada de Ca^{2+} se utilizó un cotratamiento de AMPA con la N-acetil espermina (un bloqueador selectivo de receptores sin subunidad GLUR2R) o BAPTA-AM (un agente quelante de Ca^{2+}). En estos estudios tanto el N-acetil espermina como el

BAPTA-AM previnieron la muerte de las MNs (Corona and Tapia, 2007). Ahora bien, la pérdida de MNs y el déficit motor ocurren de manera súbita cuando el AMPA es administrado de manera aguda (Corona y Tapia, 2004), por el contrario cuando el AMPA es administrado de manera crónica ocurren progresivamente a lo largo de días de tratamiento (Tovar-y-Romo et al., 2007) Los detalles metodológicos de cada modelo experimental se abordarán más adelante.

Pruebas motoras utilizadas en el laboratorio

Como se mencionó, la administración aguda o crónica de AMPA en la médula espinal produce déficit motor en los cuartos traseros de rata. Las alteraciones conductuales difieren en severidad de acuerdo al músculo o grupo de músculos que se afectan. Es importante mencionar que dependiendo del tipo de prueba utilizada es posible evaluar la afectación de ciertos músculos, involucrados en tareas específicas. A continuación se describen las pruebas conductuales utilizadas rutinariamente en el laboratorio.

Rotarod

El aparato para la prueba de *rotarod* consiste en un cilindro giratorio del cual se puede controlar la velocidad inicial de giro así como la aceleración (rpm/s) (figura 6A). La prueba mide el tiempo que la rata permanece caminando sobre el cilindro. Para esta tarea se requiere de la participación en conjunto de todos los músculos de los cuartos traseros pero evalúa principalmente la función de los más proximales (correspondientes a la tibia, fémur y fíbula), ya que una rata con los músculos distales (correspondientes a las falanges y al metatarso) afectados pero no los proximales puede realizar la prueba de manera semejante a un individuo control. Las ratas evaluadas en esta prueba deben ser entrenadas diariamente durante una semana antes del experimento para que sean capaces de realizar la tarea (Corona y Tapia, 2004; Lazo-Gomez y Tapia, 2016; Tovar-y-Romo et al., 2007).

Medidor de fuerza de agarre

El medidor de fuerza de agarre o *GSM* por sus siglas en inglés (Grip strength meter) mide la fuerza con la que se jala una rejilla rectangular (unida a un transductor de fuerza). Para ello el experimentador coloca ambos miembros posteriores de la rata sobre la rejilla dejando libres las patas anteriores, la cola de la rata se jala hacia atrás para que la rata sienta la necesidad de escapar y empuje la rejilla con los cuartos traseros. El

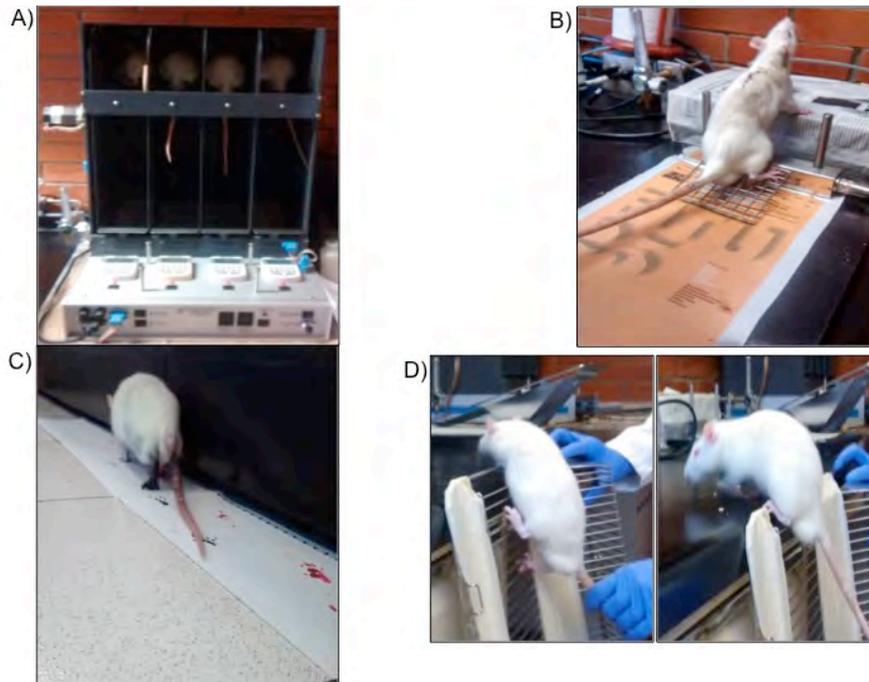


Figura 6. Pruebas motoras utilizadas en el laboratorio. A) Rotarod, B) Medidor de fuerza de agarre, C) Registro de patrón de la zancada, D) Prueba de resistencia de agarre de la pata.

impulso es cuantificado en libras ($1 \text{ libra} = 9.807 \times 10^{-3} \text{ Newton}$) (Lazo-Gomez y Tapia, 2016), en la figura 6B se ilustra a una rata siendo evaluada por este test. En esta prueba, la fuerza cuantificada para cada impulso resulta de la suma de la tensión ejercida por todos los músculos de ambos miembros posteriores, y podría estar sesgado por la fuerza con la que el experimentador jala la cola de la rata o bien por el nivel de estrés de la misma. Debido a que la rata descansa la mitad de su cuerpo sobre la rejilla, resulta imposible evaluar independientemente cada pata.

Registro de patrón de la zancada

El objetivo de esta prueba es registrar la pisada de las ratas al caminar por una tira de papel de 90 cm, para ello la pata derecha de la rata se pinta de color rojo y la izquierda de negro (figura 6C). Este test es principalmente cualitativo aunque se ha cuantificado la distancia recorrida en 5 pasos, así como la cantidad de pasos necesarios para recorrer 50 cm (Ramirez-Jarquín y Tapia, 2016). A diferencia de las pruebas anteriores en esta podemos observar y registrar la afectación motora de los miembros posteriores de manera independiente.

Prueba de resistencia de agarre de la pata

La prueba de la resistencia de agarre de la pata o *PGE* (Paw grip endurance test) por sus siglas en inglés mide el tiempo (segundos) en que la rata escala una rejilla

mediante un solo impulso usando ambos miembros posteriores. Consiste en una rejilla con peldaños de 1 centímetro de separación aproximadamente, inicialmente la rejilla se sitúa en posición horizontal y se coloca a la rata sobre de ella, posteriormente la rejilla se coloca en vertical lo que lleva a la rata a escalar en un solo movimiento (Ramirez-Jarquin y Tapia, 2016, 2017), (figura 6D). Así como en las pruebas anteriores, para realizar esta tarea se requiere de la participación todos los músculos de ambos cuartos traseros.

Desventajas y limitaciones de las pruebas motoras usadas en el laboratorio.

Es importante resaltar que las pruebas motoras de *rotarod*, *GSM* y *PGE* han sido exitosas y suficientes para cuantificar déficits motores severos (parálisis), resultado de la afectación de diversos grupos musculares empleados en la marcha como el cuádriceps, gastrocnemio, soleo, entre otros. Los cuales en su mayoría están inervados por UMs grandes y compuestos por fibras tipo S (como se mencionó anteriormente).

Interesantemente durante la evaluación de algunos grupos experimentales e incluso en etapas tempranas de la parálisis inducida por AMPA, nos percatamos de que existe un déficit motor en los cuartos traseros de la rata que afecta a músculos más distales correspondientes al metatarso y falanges (músculos controlados por UMs pequeñas y compuestos principalmente por fibras tipo FF y FR) comprometiendo su funcionalidad, sin embargo los valores cuantificados por estas tres pruebas son semejantes a los cuantificados para grupos control, de esta forma el discreto déficit motor no es detectado aun cuando visualmente se aprecian con claridad grupos musculares afectados (Netzahualcoyotzi y Tapia, 2015), déficit que únicamente se ha registrado mediante la prueba del *registro patrón de la zancada*, sin embargo esta es una determinación cualitativa y no cuantitativa.

Lo anterior se resume en que las pruebas usadas en el laboratorio evalúan la participación de músculos con UMs grandes que participan en la marcha y son anteriores al tarso, pero no tienen la sensibilidad para evaluar la funcionalidad de músculos que participan en movimientos finos controlados por UMs pequeñas. Esto puede significar una gran limitación, debido a que las alteraciones discretas podrían ser síntoma del inicio de degeneración de las MNs, haciendo referencia a la propensión a la denervación de ciertos tipos de músculos. Lo anterior enfatiza la importancia de desarrollar una estrategia metodológica que permita analizar de manera cuantitativa el déficit motor de grupos musculares distales controlados por UMs pequeñas y conformados principalmente con fibras tipo FR y FF, involucrados en la coordinación y control de movimientos finos.

V.- Hipótesis

El déficit motor, ocasionado por la degeneración de MNs espinales inducida por AMPA, en los músculos distales de los cuartos traseros podrá ser cuantificado mediante la prueba motora “el registro de la tensión ejercida por las falanges”.

VI.- Objetivo

Desarrollar una prueba motora que permita evaluar el déficit motor de los músculos distales que participan en movimientos finos en ratas, provocado por la degeneración de MNs inducida por la administración crónica y aguda de AMPA.

Objetivos particulares

1. Desarrollar una prueba motora para evaluar la tensión muscular ejercida por las falanges de cada cuarto trasero de manera independiente (movimiento fino).
2. Evaluar diariamente la conducta motora con las pruebas de rotarod, el registro del patrón de la zancada y el registro de la tensión muscular de las falanges de los cuartos traseros en las ratas tratadas con AMPA 7.5 mM (modelo crónico), diariamente durante los cinco días de tratamiento. Y de ratas tratadas con AMPA 6 mM (modelo agudo) antes y 24 horas después de la administración.
3. Contar el número de MNs en el tejido lumbar de la médula espinal correspondiente a la zona de administración.
4. Identificar a las MNs espinales y a la astrogliya mediante inmunomarcaje de neurofilamento pesado (SMI 32) y de la proteína acídica de la glía fibrilar (GFAP), en el tejido lumbar de la médula espinal correspondiente a la zona de administración.

VII.- Método

Animales

En todos los experimentos se utilizaron ratas machos en edad adulta de la cepa Wistar (270-300 g) y se realizaron bajo las normas establecidas por el comité local de cuidado animal (No. RTI21.14). Los grupos experimentales manejados en este estudio fueron los siguientes: Para el modelo agudo se realizó un grupo control administrado con medio Krebs y un grupo administrado con AMPA 6 mM. Para el modelo crónico se realizaron 6 grupos: un grupo control administrado con buffer de fosfatos (PB) 0.1 M y un grupo

administrado con AMPA 7.5 mM, en ambos casos durante la cirugía no se empleo torre para estereotáxico. Un grupo control administrado con PB 0.1 M y un grupo administrado con AMPA 7.5 mM en cuya cirugía se utilizó torre para estereotáxico. Un grupo administrado con PB 0.1 M y uno administrado con AMPA 7.5 mM, en ambos la cirugía se realizó utilizando la torre para estereotáxico y la administración fue en los segmentos L2-L3.

Cirugía para el modelo agudo de degeneración de MNs por excitotoxicidad mediada por AMPA.

Para el tratamiento agudo el AMPA ((R,S)-AMPA ab120130) se disolvió en en medio Krebs que contenía (en mM) 118 NaCl, 4.5 KCl, 2.5 MgSO₄, 4.0 Na₂H₂PO₄, 2.5 CaCl₂, 25 NaHCO₃ y 10 glucosa. La cirugía se realizó esencialmente a como se describió previamente (Corona y Tapia, 2004). Las ratas se anestesiaron con isoflurano disuelto en una mezcla de 95% de oxígeno y 5% de CO₂. Se colocaron en un estereotáxico para médula con anestesia continua de 1.5 a 2 %. Se realizó una incisión sagital de 4 cm de longitud y se montó la médula espinal de la región lumbar L4-L5 sobre un par de lápices para estereotáxico, se identificó la primer vertebra lumbar y se retiró el musculo que recubre al proceso espinoso de esta misma, se realizó una laminectomia en el lado derecho de la vertebra y se retiraron las meninges (piamadre, dura madre y aracnoides) que recubren a la médula. Se colocó una cánula de microdiálisis (CMA7) en posición vertical sostenida por una torre de estereotáxico y se insertó a 1 mm de profundidad. Se administró intraespinalmente utilizando una bomba de microinyección (CMA/100) 135 µl de medio Krebs (periodo de estabilización y basal), seguido de 75 µl de AMPA a una concentración de 6 mM (periodo de administración) y por último 50 µl de medio Krebs (periodo de lavado) a un flujo de 2 µl por minuto. Al término del procedimiento se retiró la cánula y la incisión se cerró con grapas quirurgicas. Las ratas se colocaron en cajas individuales. Al grupo control se le realizó la misma cirugía y se le administró exclusivamente medio Krebs (un volumen total de 260 µl), (figura 7 A).

Cirugía para el modelo crónico de degeneración de MNs por excitotoxicidad mediada por AMPA.

Para el tratamiento crónico el AMPA se disolvió en buffer de fosfatos (PB) 0.1 M y con este se llenaron las minibombas osmoticas Alzet modelo 2004 (volumen 250 µl, flujo 6µl por día). Las cuales fueron incubadas por 48 h en solución salina a 37 ° para su estabilización.

La cirugía se realizó esencialmente a como se describió previamente (Tovar-y-Romo et al., 2007), la disección inicial del tejido se realizó como se describe arriba. Se utilizó una cánula (2 mm de longitud, 50 μ m de diámetro interno, y 80 μ m de diámetro externo) en el lado derecho de la médula espinal en la región lumbar L4-L5 en diagonal y de manera manual sin utilizar torre para estereotáxico o bien, se insertó una cánula (1.5 mm de longitud, 50 μ m de diámetro interno, y 80 μ m de diámetro externo) en el lado derecho de la médula espinal en la región lumbar L4-L5 a una inclinación de 25° sostenida por una torre para estereotáxico. En un tercer grupo se insertó una cánula (1.5 mm de longitud, longitud, 50 μ m de diámetro interno, y 80 μ m de diámetro externo) a 25° de inclinación empleando la torre para estereotáxico pero se insertó en la región L2-L3 de la médula espinal. En todos los casos se aplicó cemento dental para fijar el implante. La cánula se conectó a un tubo de plástico que a su vez se conecta la mini bomba osmótica Alzet 2004 (colocada subcutáneamente en la espalda de la rata) que contenía 250 μ l de AMPA 7.5 mM o 250 μ l PB 0.1 M en el caso de los grupos controles, la unión se reforzó con pegamento instantáneo (etilcianoacrilato) y finalmente se cerró la incisión inicial utilizando grapas quirúrgicas (figura 7B).

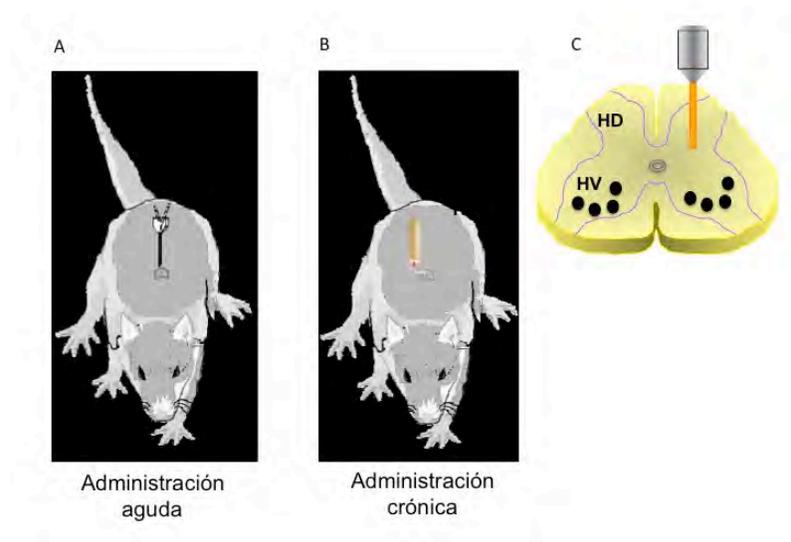


Figura 7. Modelos de administración aguda y crónica de AMPA. A) En el modelo agudo la administración se realiza mediante una cánula que tiene una membrana de microdiálisis que permite el intercambio de solutos B) En el modelo crónico se implanta subcutáneamente una mini bomba osmótica, que administra un flujo continuo de 6 μ l por día, conectada a una cánula. C) Tanto en el modelo crónico como en el agudo la cánula se inserta en el lado derecho de la médula espinal en la región lumbar.

Evaluación de la conducta motora

Registro del patrón de la zancada

Las ratas caminaron a lo largo de un pasillo (10cm ancho x 90cm largo x 20 cm alto), cuyo piso estaba cubierto por papel blanco, la pata izquierda (contralateral a la administración) se pintó con tinta color negro y la pata derecha (ipsilateral a la administración) se pintó de rojo para ver la posición del metatarso y las falanges. Se realizó antes y 24 h después de la administración para el tratamiento agudo y cada día durante 5 días para el tratamiento crónico.

Rotarod

Las ratas fueron entrenadas durante una semana hasta que lograron permanecer en el rotarod durante 120 segundos a una velocidad inicial de 10 rpm y una aceleración constante de 0.2 rpm/s. La evaluación constó de tres intentos y se consideró el promedio de los tres intentos como el registro de rotarod para cada rata.

Análisis histológico

Tinción con violeta de cresilo

Una vez terminado el tratamiento las ratas fueron anestesiadas con 2 ml de pentobarbital sódico, se realizó una cavidad en el torax para exponer el corazón y se insertó una aguja en el ventriculo izquierdo, la cual se conectó a una bomba de perfusión (System Model No. 7553-70) y se perfundió 150 ml de solución salina al 0.9 % seguido de 250 ml de paraformaldehído al 4% disuelto en PB a 0.1 M. De cada rata se obtuvo 5 mm de la médula espinal de la región de administración y se mantuvo en paraformaldehído al 4 % durante 72 h, posteriormente se deshidrató en gradientes de sacarosa (10, 20 y 30%). Se obtuvieron cortes de 40 μ m de grosor que se tiñeron con violeta de cresilo especialmente como se describió (Watson et al., 2009), se contó el número de MNs sanas del lado contralateral e ipsilateral a la administración. Los criterios para considerar a una MN fueron: tamaño alrededor de 20 μ m, núcleo visible y localización en el asta ventral.

Inmunohistoquímica

Tres cortes trasversales de 40 µm de médula espinal del sitio de administración por rata se bloquearon por 2 h en 250 µl de PB 0.1 mM, Tritón X 100 0.3 % y albumina de suero bobino al 5% (medio de bloqueo), posteriormente se dejaron incubando por 48 h en agitación a 4° en una solución con SMI-32 (1:500, anti-neurofilamento no fosforilado, Biologend 801701) y con GFAP (1:1000, anti-GFAP, abcam ab4674), disueltos en 250 µl del medio de bloqueo. Después del tiempo de incubación con anticuerpos primarios se realizaron tres lavados con PB 0.1 M de 10 min c/u y se colocaron en una solución de 250 µl con AF546 (1:200, Alexa Fluor 546 Thermo Fisher Scientific A10036) FITC (1:200, fluoresceína-5-isotiocianato, Merck Millipore A16055) donde se mantuvieron en agitación durante 2 h en un cuarto oscuro a temperatura ambiente. Posteriormente se montaron en porta-objetos sobre un medio de montaje (Dako Fluorescence Mounting Medium) y se cubrieron con un cubre objetos. Los cortes se visualizaron en un microscopio confocal (Zeiss LSM 800 con AiryScan).

Análisis estadístico

El número de MNs se analizó por la prueba de ANOVA de una vía. El tiempo de permanencia sobre el rotarod y la tensión muscular de las falanges en la prueba RTF se analizó por la prueba de ANOVA de dos vías. Se consideraron estadísticamente significativos aquellas diferencias cuya $p < 0.01$. El análisis estadístico se realizó usando el programa GraphPad Prisma 6.0.

VIII.- Resultados

Diseño de la prueba motora “registro de la tensión muscular ejercida por las falanges”.

Cuando una rata es levantada por la cola sus patas posteriores quedan al aire y de manera innata busca un punto de apoyo para sujetarse, si en ese momento acercamos algún objeto la rata lo presionará con las falanges. Aprovechando esta respuesta desarrollamos un método para medir la fuerza empleada en esta tarea, el cual consiste en que la rata presione con sus falanges un bulbo de látex conectado a un transductor de fuerza. A esta prueba la llamamos “registro de la tensión muscular ejercida por las falanges” (RTF) (figura 8).

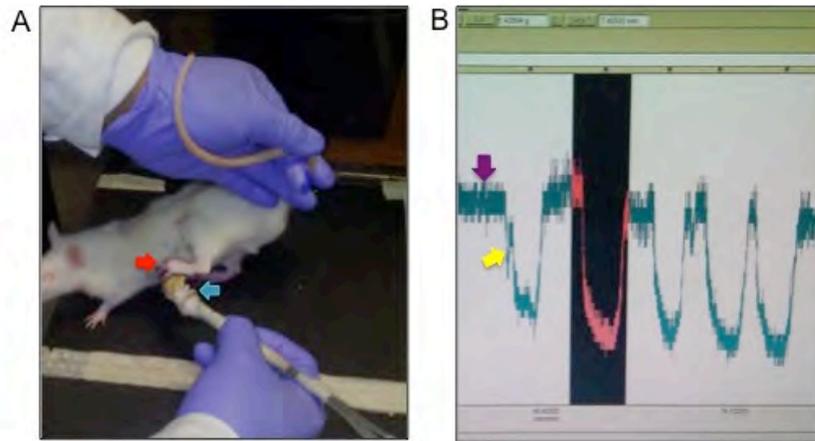


Figura 8. Diseño de la prueba motora “registro de la tensión muscular ejercida por las falanges”. A) Rata intacta (Wistar de 270-290 g) presionando el bulbo de registro (flecha azul) con las falanges de la pata izquierda (flecha roja). El aparato consta de un transductor de fuerza adaptado para que detecte los cambios en el volumen de agua del interior de un tubo conectado al bulbo de registro. Los mililitros de agua desplazados en el interior del tubo al presionar el bulbo se interpretan como gramos desplazados por la tensión ejercida por las falanges de la rata. B) Digitalización en tiempo real de la tensión ejercida por las falanges mostrada en A. Durante el registro se obtiene una línea plana (flecha morada) que se deflexiona (flecha amarilla) dependiendo de la intensidad y duración de la presión aplicada al bulbo. La deflexión se cuantifica como área bajo la curva y amplitud, el área representa los gramos de agua que fueron desplazados en un segundo, mientras que la amplitud indica los gramos desplazados en el punto máximo de presión.

Diseño del aparato

El sistema consta de un transductor de fuerza adaptado para que detecte los cambios en el volumen de agua del interior de un tubo conectado a un bulbo de látex. Durante el registro se obtiene una línea plana que se deflexiona cuando el agua del interior del tubo es desplazada al presionar el bulbo. La curva generada se cuantifica en gramos, calculados a partir de una calibración previa del transductor con una pesa de 10 gramos. Esta cuantificación es realizada por el sistema de adquisición y digitalización en tiempo real MP100 y el programa Acqknowledge 3.7.1, que permiten la captura de los datos de área y amplitud de cada curva. El área representa los gramos que fueron desplazados por segundo y la amplitud indica los gramos desplazados en el punto máximo de presión (figura 8B).

Reproductibilidad de la prueba

Para comprobar que los valores obtenidos en esta prueba no dependen de la fuerza extrínseca de la rata ni que varían significativamente entre cada rata o día de registro, realizamos la prueba a 3 ratas antes y 24 h después de la cirugía en la que fueron administradas agudamente con medio Krebs como grupo control del modelo agudo y evaluamos diariamente durante 4 días a 3 ratas administradas crónicamente con PB 0.1 M como grupo control del modelo de administración crónica. Los valores promedio de área y amplitud se presentan en la tabla 2. En resumen, los valores obtenidos se mantuvieron entre 0.38-0.40 g en amplitud y 0.93-1.06 g/s en área y no fueron significativamente diferentes antes y 24 h después de la cirugía ni lo fue entre cada día de registro ni respecto a la pata opuesta en el mismo día. Con estos resultados concluimos que los valores en área y amplitud son reproducibles para ratas macho cepa Wistar de 270-290 g.

Una vez que diseñamos y confirmamos la reproductibilidad de esta prueba motora, nos enfocamos en la reproducción de los modelos de degeneración de MNs causada por la sobre-activación de receptores AMPA mediante administración aguda y crónica. A continuación se mostraran los resultados conductuales e histológicos de dichos experimentos y posteriormente se presentarán los resultados de la prueba del RTF.

Tabla 2. Reproducibilidad de la prueba RTF: tensión muscular ejercida por las falanges del miembro ipsilateral y contralateral evaluada en la prueba de RTF para los grupos controles de la administración aguda y crónica. D=día de tratamiento.

Grupo control de la administración aguda					
Parámetro	Evaluaciones				
	D0	24 h post administración			
<i>Área Contralateral</i>	1.04 g/s ± 0.075	0.98g/s ± 0.055			
<i>Área Ipsilateral</i>	0.94 g/s ± 0.080	0.97 g/s ± 0.079			
<i>Amplitud Contralateral</i>	0.40 g ± 0.004	0.40 g ± 0.006			
<i>Amplitud ipsilateral</i>	0.387 g ± 0.010	0.39 g ± 0.080			
Grupo control de la administración crónica					
Parámetro	Evaluaciones				
	D0	D1	D2	D3	D4
<i>Área Contralateral</i>	1.02 g/s ± 0.101	0.97 g/s ± 0.048	0.95 g/s ± 0.074	0.98 g/s ± 0.075	1.06 g/s ± 0.017
<i>Área Ipsilateral</i>	0.93 g/s ± 0.060	0.93 g/s ± 0.050	1.01 g/s ± 0.046	0.93 g/s ± 0.064	0.93 g/s ± 0.064
<i>Amplitud Ipsilateral</i>	0.38 g ± 0.011	0.38 g ± 0.013	0.39 g ± 0.027	0.37 g ± 0.008	0.37 g ± 0.017
<i>Amplitud Contralateral</i>	0.39 g ± 0.006	0.38 g ± 0.005	0.38 g ± 0.013	de 0.40 g ± 0.014	0.39 g ± 0.031

Alteraciones en la actividad motora causadas por la sobre-activación aguda o crónica de receptores tipo AMPA en la región lumbar L4-L5 de la médula espinal de rata.

Alteraciones motoras, evaluadas en las pruebas de rotarod y el registro del patrón de la zancada, causadas por la sobre-activación aguda de receptores tipo AMPA en la región lumbar L4-L5.

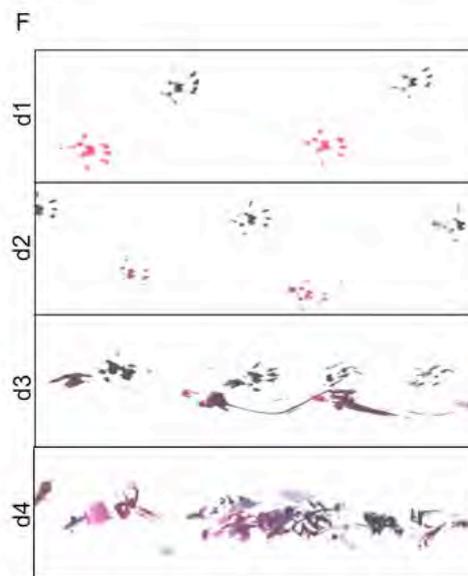
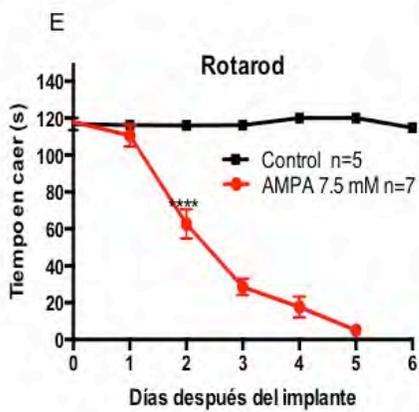
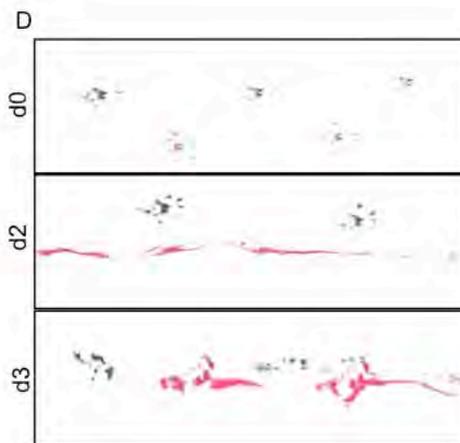
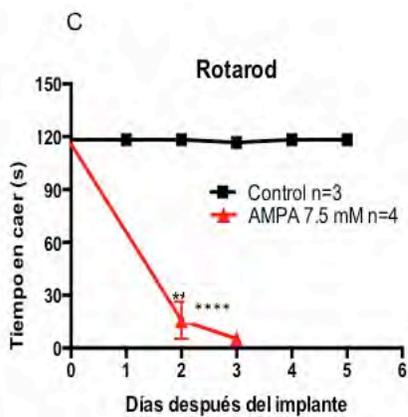
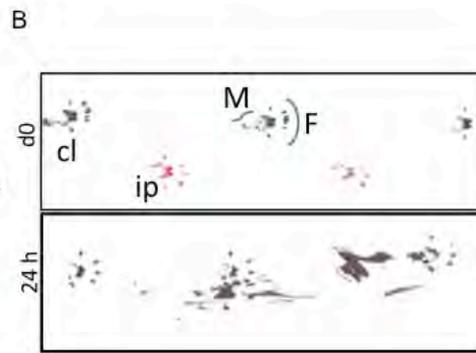
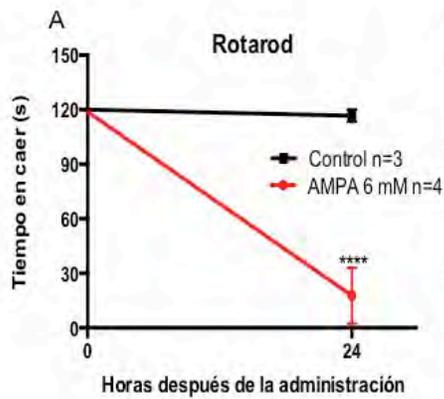
El grupo administrado agudamente con AMPA desarrolló parálisis en la pata ipsilateral, apreciable desde el momento en que las ratas despertaron de la cirugía, este déficit motor lo evaluamos a las 24 horas. En el rotarod tardó alrededor de $17 \text{ s} \pm 7$ en caer, mientras que el grupo control tardó 120 s (figura 9A). En la prueba del registro del patrón de la zancada se identificó un claro déficit motor descrito como el arrastre de la pata ipsilateral en cada paso (huella color rojo), mientras que en la huella de la pata contralateral se observaron las cinco falanges extendidas y espacios entre cada paso, características de la pisada de una rata intacta (huella color negro), (figura 9B).

Alteraciones motoras, evaluadas en las pruebas de rotarod y el registro del patrón de la zancada, causadas por la sobre-activación crónica de receptores tipo AMPA en la región lumbar L4-L5.

En un inicio las cirugías para la administración crónica las realizamos siguiendo el protocolo reportado anteriormente, el tamaño de la cánula que se insertó en la médula fue de aproximadamente 2 mm de largo y la inserción de la misma se realizó en diagonal y de manera manual (Tovar-y-Romo et al., 2007). Este grupo desarrolló un severo déficit motor en ambas patas a los tres días de tratamiento, para fines de identificación a este grupo se le denominó grupo sin torre para estereotáxico. El tiempo que tardaron en caer del rotarod fue el siguiente: en el segundo día post-cirugía fue de $15 \text{ s} \pm 10 \text{ s}$, en el tercer día fue de $5 \text{ s} \pm 3 \text{ s}$ (figura 9 C). El grupo control tardó 120 s en caer durante los cinco días de tratamiento con PB 0.1 M como vehículo. En cuanto a la prueba del registro del patrón de la zancada, las ratas administradas con AMPA mostraron déficit motor en la pata ipsilateral a partir del segundo día post-cirugía, y la contralateral al tercer día de tratamiento (figura 9 D). Estos resultados no coinciden con el modelo descrito, siendo que se reportó que el tiempo de progresión de la parálisis es de entre 5 a 22 días, dependiendo del experimentador (Tovar-y-Romo et al., 2007).

Se ha considerado que el tiempo que tarda en difundir el AMPA desde la cánula al asta ventral en donde se sitúan las MNs depende tanto de la longitud de la cánula como del ángulo en el que se inserta la misma. Sugerimos que la rápida progresión de la parálisis en este grupo se pudo deber a la rapidez con que el AMPA se difundió desde la cánula al asta ventral, como consecuencia del largo de la cánula y la posición en que se insertó. Por lo anterior, decidimos disminuir la longitud de la cánula a 1.5 mm y utilizar una torre de estereotáxico para insertarla en un ángulo de 25° y lo designamos como grupo con torre para estereotáxico.

Este grupo desarrolló parálisis progresiva a lo largo de 5 días que comenzó con un déficit en los músculos distales de la pata ipsilateral descrito como flacidez de las falanges el cual progresó afectando a los músculos proximales del miembro, el mismo patrón de progresión del déficit se observó en la pata contralateral pero con aproximadamente un día de retraso. El tiempo que tardaron en caer del rotarod fue disminuyendo progresivamente: en el primer día de tratamiento cayeron a los $110 \text{ s} \pm 5$, en el segundo día a los $62 \text{ s} \pm 7$, en el tercer día a los $28 \text{ s} \pm 4$, en el cuarto a los $17 \text{ s} \pm 5$, y en el quinto a los $5 \text{ s} \pm 1$ (figura 9 E y F, círculos rojos). En cuanto al registro del patrón de la zancada el primer y segundo día post-cirugía en la huella se pueden ver las cinco falanges extendidas y espacios entre cada paso, características de la pisada de una rata intacta, al tercer día de tratamiento se registró un trazo continuo debido al arrastre de la pata ipsilateral entre cada paso mientras que en la huella de la pata contralateral se las falanges están juntas, al quinto día ambas patas se ven severamente afectadas y la marcha se registró como un trazo continuo debido al arrastre de ambos miembros (figura 9F).



*Figura 9. Alteraciones en la actividad motora causadas por la sobre-activación aguda y crónica de receptores tipo AMPA en la región lumbar L4-L5 de la médula espinal de rata. A, B) Ratas del modelo agudo con AMPA 6 mM. A) A las 24 h de la cirugía las ratas tardaron 25 s en caer del rotarod mientras que el grupo control tardó 120 s. B) Registro representativo del patrón de la zancada en donde se observa que la huella de la pata ipsilateral es un trazo alargado correspondiente al arrastre de la misma durante la marcha, la huella de la pata contralateral no fue diferente a la huella antes de la cirugía (control n=3, tratamiento n=4). C y D) Ratas del modelo crónico con AMPA 7.5 mM sin torre para estereotáxico. C) El tiempo que tardaron en caer del rotarod fue de alrededor de 10 s en el segundo día de tratamiento y de aproximadamente 0 s en el tercer día. En D los registros representativos del patrón de la zancada muestran un trazo continuo correspondiente al arrastre de la pata ipsilateral en el día 2 y de ambas patas en el día 3 (control n=3, tratamiento n=4). E,F) Ratas del modelo crónico con AMPA 7.5 mM usando la torre para estereotáxico. E) en este grupo se presentó una disminución progresivo en el tiempo de permanencia sobre el rotarod a partir del segundo día, cada día de registro fue significativamente diferente al respectivo día de evaluación del grupo control. En F el registro del patrón de la zancada mostró alteraciones motoras en la pata ipsilateral a partir del tercer día post-cirugía y a partir del cuarto en la pata contralateral, en el quinto día ambas patas tienen un severo déficit motor, descrito como parálisis bilateral (control n=3, tratamiento n=7). Los valores se muestran como la media \pm el error estándar. Anova de dos vías ****p <0.0001.*

Alteraciones histopatológicas causadas por la sobre-activación aguda y crónica de receptores tipo AMPA en la región lumbar L4-L5 de la médula espinal de rata

Degeneración de las MNs espinales causada por el tratamiento agudo con AMPA 6 mM.

El tratamiento agudo con AMPA 6 mM provocó una disminución en el número de MNs en ambas astas ventrales pero en diferente magnitud (figura 10A), en el lado ipsilateral fue del 75% y en el lado contralateral fue del 25 %, ambos respecto a su lado homónimo del grupo control (figura 10B). El decremento de MNs observado en la tinción de violeta de cresilo se corroboró mediante el inmunomarcaje de SMI-32, indicador de MNs. Además se describió la presencia de gliosis reactiva en el asta ventral ipsilateral, este fenómeno se caracteriza por el aumento en el tamaño de las proyecciones de los astrocitos identificados con GFAP (figura 11) la glia reactiva es un indicador de procesos de muerte celular (Ridet et al., 1997). Estos resultados coinciden con los reportados en el modelo agudo de degeneración de MNs mediado por AMPA 6 mM.

Degeneración de las MNs espinales causado por el tratamiento crónico con AMPA 7.5 mM.

El tejido de la médula espinal de ratas tratadas con AMPA 7.5 mM, en cuya cirugía no se utilizó la torre para estereotáxico, se procesó al tercer día de tratamiento para su análisis histológico por tinción con violeta de cresilo y se determinó una disminución del

90% en el número de MNs del asta ventral ipsilateral y del 75 % en la contralateral, cada uno respecto a lado homónimo del grupo control (10 C, D). Dado que este grupo desarrolló parálisis en un lapso de tres días, el tejido no fue procesado para inmunomarcaje.

El tejido de la médula espinal de ratas tratadas con AMPA 7.5 mM en cuya cirugía sí se utilizó la torre para estereotáxico se procesó para tinción con violeta de cresilo e inmunomarcaje. La tinción con violeta de cresilo mostró una disminución del 95% en el número de MNs del asta ventral ipsilateral y del 85 % en el asta ventral contralateral, ambas respecto a su homónimo del grupo control (figura 10 E, F). Las micrografías del análisis inmunohistoquímico corroboraron que el decremento celular observado correspondía a MNs, al ser marcadas con SMI-32. Este ensayo también mostró la presencia de gliosis reactiva en ambas astas ventrales, fenómeno que se caracteriza por el aumento en el tamaño de las proyecciones de astrocitos identificados con la GFAP (11). Estos resultados coinciden con los reportados en el modelo crónico de degeneración mediado por la administración de AMPA 7.5 mM.

Es importante mencionar que en el tratamiento crónico, el decremento en el número de MNs es mayor en el lado ipsilateral que en el mismo lado del tejido de ratas tratadas agudamente con AMPA 6 mM, sin embargo en ambos casos el déficit motor se describe como parálisis de la pata aun cuando existen diferencias tanto en el número de MNs como en la capacidad motora de este miembro.

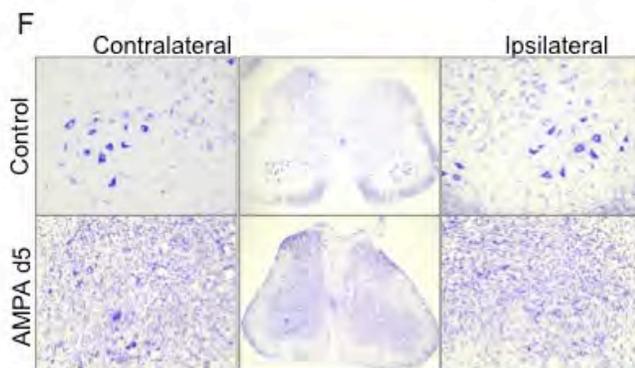
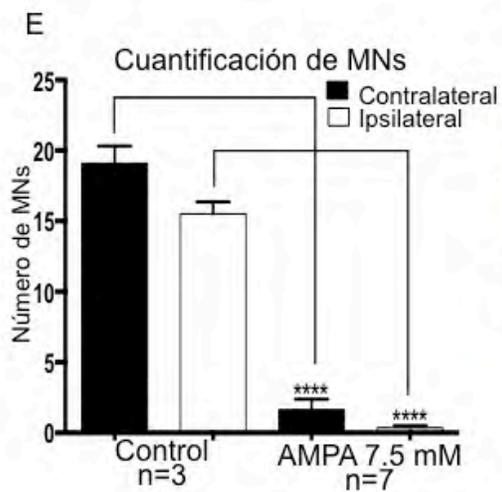
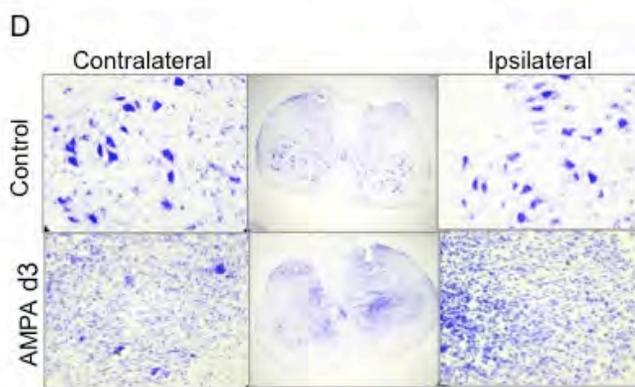
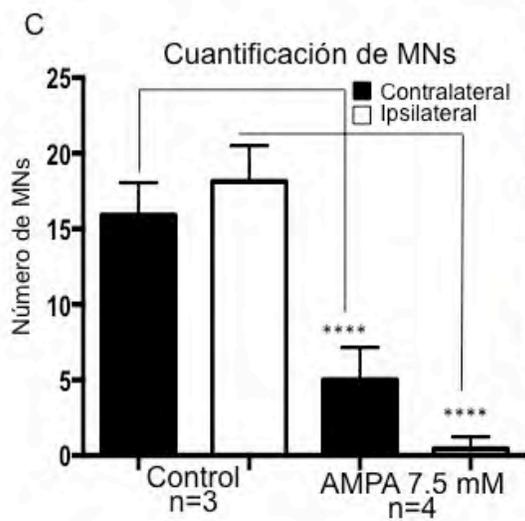
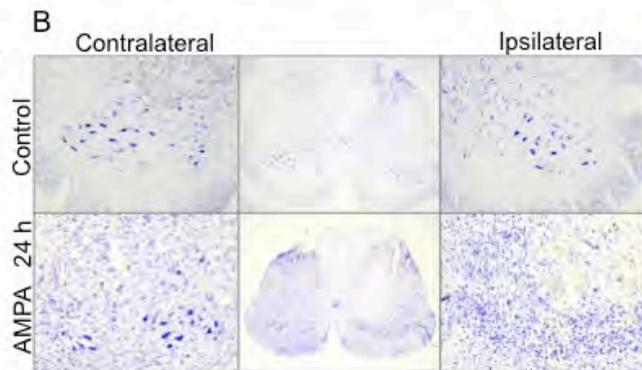
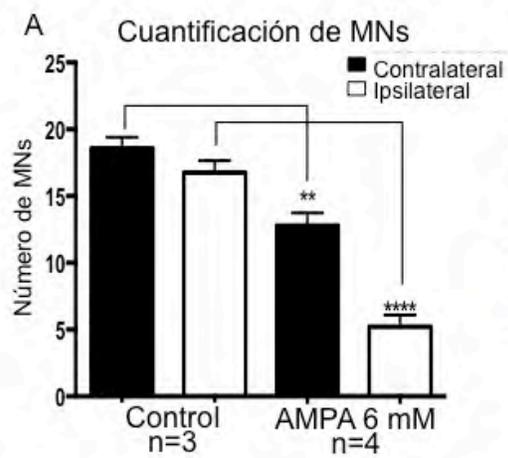


Figura 10. Disminución en el número de MNs por la sobre-activación aguda y crónica de receptores tipo AMPA en la región lumbar L4-L5 de la médula espinal de rata a las 24 h post-cirugía y al d5 de tratamiento, respectivamente. En A la cuantificación del número de MNs mostró del tratamiento agudo con AMPA mostró una disminución del 75% en el lado ipsilateral y del 25 % en el lado contralateral, ambas respecto a su homónimo del grupo control, en B se muestran las micrografías representativas (control n=3, tratamiento n=4). En C el número de MNs del grupo tratado crónicamente con AMPA en cuya cirugía no se utilizó torre para estereotáxico disminuyó un 90% en el asta ventral ipsilateral y un 75 % en el asta ventral contralateral, ambas respecto a su homónimo del grupo control, en D se exponen las micrografías representativas (control n=3, tratamiento n=4). En E el número de MNs del grupo tratado crónicamente con AMPA en cuya cirugía se utilizó torre para estereotáxico, disminuyó un 95% en el asta ipsilateral y un 85 % en el asta contralateral, ambos respecto a su homónimo del grupo control. En D se exponen las micrografías representativas (control n=3, tratamiento n=7). Los valores se muestran como la media \pm el error estándar. Anova de una vía, *p <0.01.

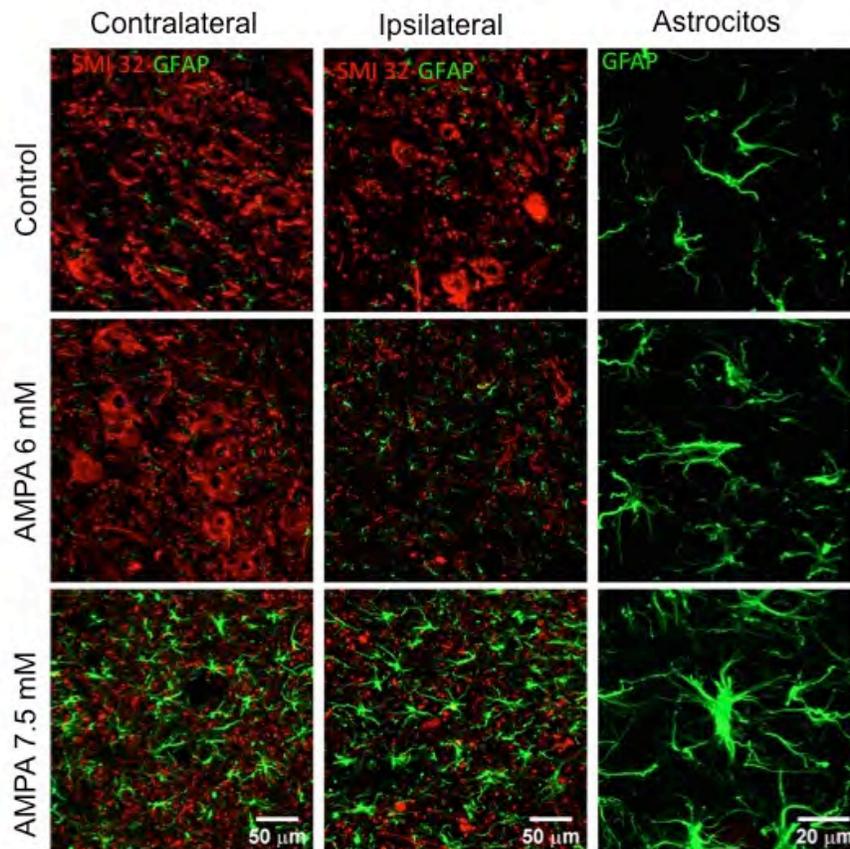


Figura 11. Marcaje inmunohistoquímico de MNs y glia en rebanadas de médula espinal lumbar L4-L5 de ratas tratadas aguda y crónicamente con AMPA rata a las 24 h post-cirugía y al d5 de tratamiento, respectivamente. El tejido de la médula espinal de cada grupo se proceso para inmunomarcaje con anticuerpos primarios SMI-32 (para identificar MNs) y GFAP (para marcar astrocitos). A la izquierda se muestran micrografías representativas del asta ventral contralateral, al centro el asta ventral ipsilateral y a la

derecha una amplificación de astrocitos observados en el asta ipsilateral, note que en los grupos tratados con AMPA los astrocitos presentan mayor ramificación y tamaño, características de astrocitos reactivos. En el tejido tratado agudamente con AMPA 6 mM los astrocitos del lado ipsilateral presentan características de glía reactiva, en este mismo lado hubo una clara disminución en el número de MNs mientras que el tejido tratado crónicamente con AMPA 7.5 mM presentó gliosis reactiva en ambas astas ventrales así como disminución en el número de MNs.

Alteración en la tensión muscular ejercida por las falanges causada por la sobre-activación aguda o crónica de receptores tipo AMPA en la región lumbar L4-L5 de la médula espinal de rata.

Alteraciones en la tensión muscular, evaluadas en la prueba de RTF, causadas por la sobre-activación aguda de receptores tipo AMPA en la región lumbar L4-L5.

Las ratas tratadas agudamente con AMPA 6 mM desarrollaron parálisis en la pata ipsilateral visible desde el momento en que despertaron de la cirugía. Este déficit se caracterizó por la flacidez en los músculos correspondientes a las falanges, el metatarso, el tarso, la tibia, el fémur y la fibula. A las 24 h post-cirugía se cuantificó la parálisis en la prueba RTF. La digitalización de estos registros se presenta en la figura 12 A. En la prueba de RTF los valores obtenidos fueron los siguientes: el promedio del área registrada por la pata contralateral fue de 0.48 g/s \pm 0.18 y por la pata ipsilateral fue de 0.17 g/s \pm 0.01, mientras que el área registrada por el grupo control fue de 0.93 g/s \pm 0.05 en la ipsilateral y de 0.97 g/s \pm 0.04 en la contralateral (figura 13 A). En cuanto a la amplitud del grupo administrado con AMPA fue de 0.28 g \pm 0.04 en la contralateral y de 0.23 g \pm 0.01 en la pata ipsilateral, mientras que la amplitud del grupo control fue de 0.37 g \pm 0.009 en la ipsilateral y de 0.38 g \pm 0.005 en la contralateral (figura 13 B). Tanto el área como la amplitud fueron significativamente menores a los valores obtenidos para el grupo control lo cual se interpreta como déficit motor en la tensión ejercida por los músculos correspondientes a las falanges, metatarso y tarso de ambos miembros posteriores. Sin embargo el decremento en la tensión ejercida fue mayor en la pata ipsilateral respecto al registrado en la contralateral. Es importante mencionar que la prueba del registro del patrón de la zancada no mostró alguna alteración motora en la pata contralateral de ratas tratadas agudamente con AMPA.

Alteraciones en la tensión muscular, evaluadas en la prueba de RTF, causadas por la sobre-activación crónica de receptores tipo AMPA en la región lumbar L4-L5.

El grupo administrado crónicamente con AMPA 7.5 mM, en cuya cirugía sí se utilizó la torre para estereotáxico, desarrolló parálisis progresiva. El déficit comenzó en los músculos distales de la pata ipsilateral y progresó a los músculos proximales del mismo, al tercer día comenzaron a afectarse los músculos distales de la pata contralateral y la afectación progresó en los músculos proximales de la misma en los días 4 y 5, al quinto día de tratamiento ambos miembros se encontraron paralizados. El déficit motor se cuantificó en la prueba RTF (figuras 12 B y 13 C).

En este grupo la prueba de RTF fue realizada diariamente antes de la cirugía y 4 días después, en el quinto día no se realizó el ensayo debido a que algunas ratas presentaron autotomía en las falanges, factor que podría alterar el resultado. En la gráfica C de la figura 13 se muestra el curso temporal de los cambios en el área, los valores obtenidos por el grupo control se mantuvieron en 0.93 a 1.06 g/s a lo largo de los días, mientras que el grupo de las ratas tratadas con AMPA el área registrada por la pata contralateral disminuyó y fue significativa a partir del tercer día post-cirugía con los siguientes valores: d0 1.06 g/s \pm 0.06, d1 1.05 g/s \pm 0.04, d2 1.06 g/s \pm 0.07, d3 0.29 g/s \pm 0.01, d4 0.15 g/s \pm 0.01 y el área registrada por la pata ipsilateral disminuyó a partir del primer día post-cirugía y fue significativo a partir del segundo día, los valores registrados fueron los siguientes: d0 1.07 g/s \pm 0.01, d1 0.68 g/s \pm 0.06, d2 0.32 g/s \pm 0.03, d3 0.16 g/s \pm 0.01, d4 0.12 g/s \pm 0.01. (figura 13 C). En la gráfica D de la figura 13 se muestra el curso temporal de los cambios en la amplitud, para el grupo control se registró una amplitud constante de entre 0.37 a 0.39 g a lo largo de los días, mientras que en las ratas tratadas con AMPA la amplitud registrada en la pata contralateral la amplitud disminuyó a partir del segundo día post-cirugía y fue significativo a partir del tercer día, los valores fueron los siguientes: d0 0.37 g \pm 0.00, d1 0.39 g \pm 0.02, d2 0.36 g \pm 0.00, d3 0.26 g \pm 0.00, d4 0.21 g \pm 0.02 y para la pata ipsilateral fue disminuyendo desde el primer día post-cirugía siendo significativa a partir del segundo día, los valores fueron los siguientes: d0 0.38 g \pm 0.00, d1 0.36 g \pm 0.01, d2 0.26 g \pm 0.02, d3 0.19 g \pm 0.01, d4 0.18 g \pm 0.01. E (figura 13 D).

En resumen, en cuanto a la pata contralateral el área y la amplitud disminuyeron progresivamente a partir del tercer día y en la pata ipsilateral se reportó una disminución progresiva desde el primer día post-cirugía tanto en área como en amplitud. Esta

disminución se interpreta como déficit motor en la tensión ejercida por los músculos correspondientes a las falanges, metatarso y tarso de ambos miembros posteriores.

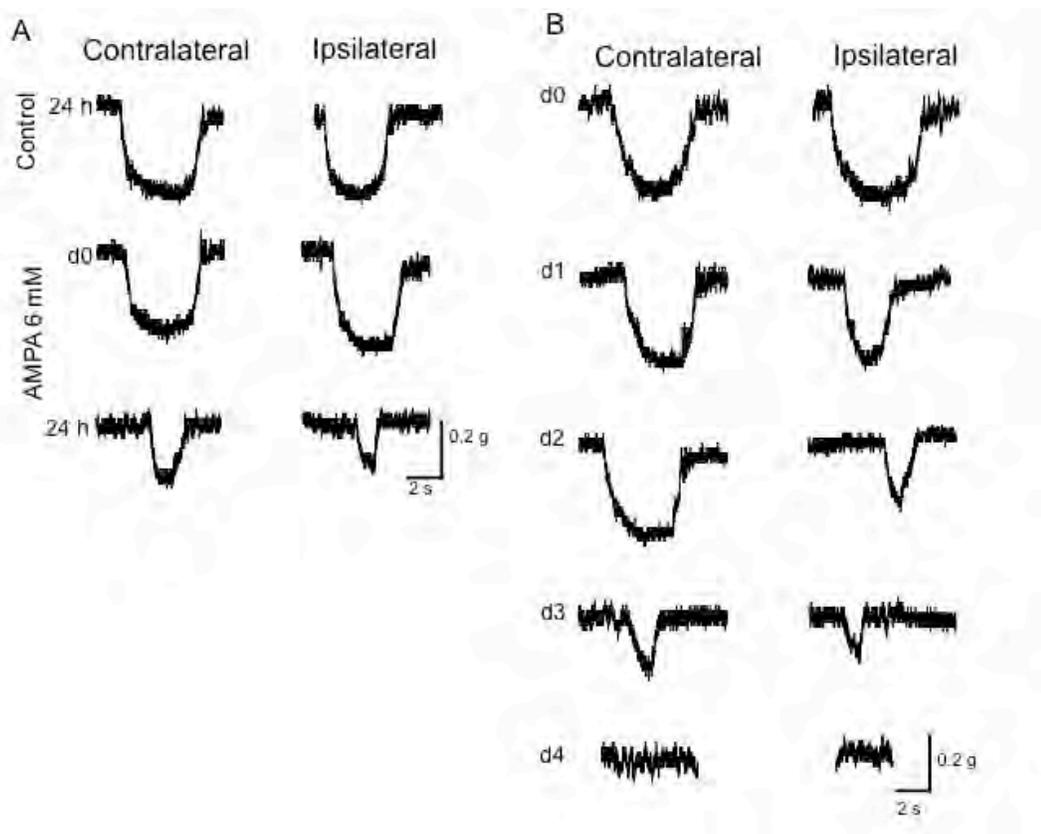


Figura 12. Alteraciones en la tensión muscular causadas por la sobreactivación aguda o crónica de receptores tipo AMPA en la región lumbar L4-L5 de la médula espinal de rata. En A se muestran los registros representativos obtenidos a las 24 h después la administración aguda de AMPA. En B se muestran los registros representativos de cada día durante 4 días de administración crónica de AMPA.

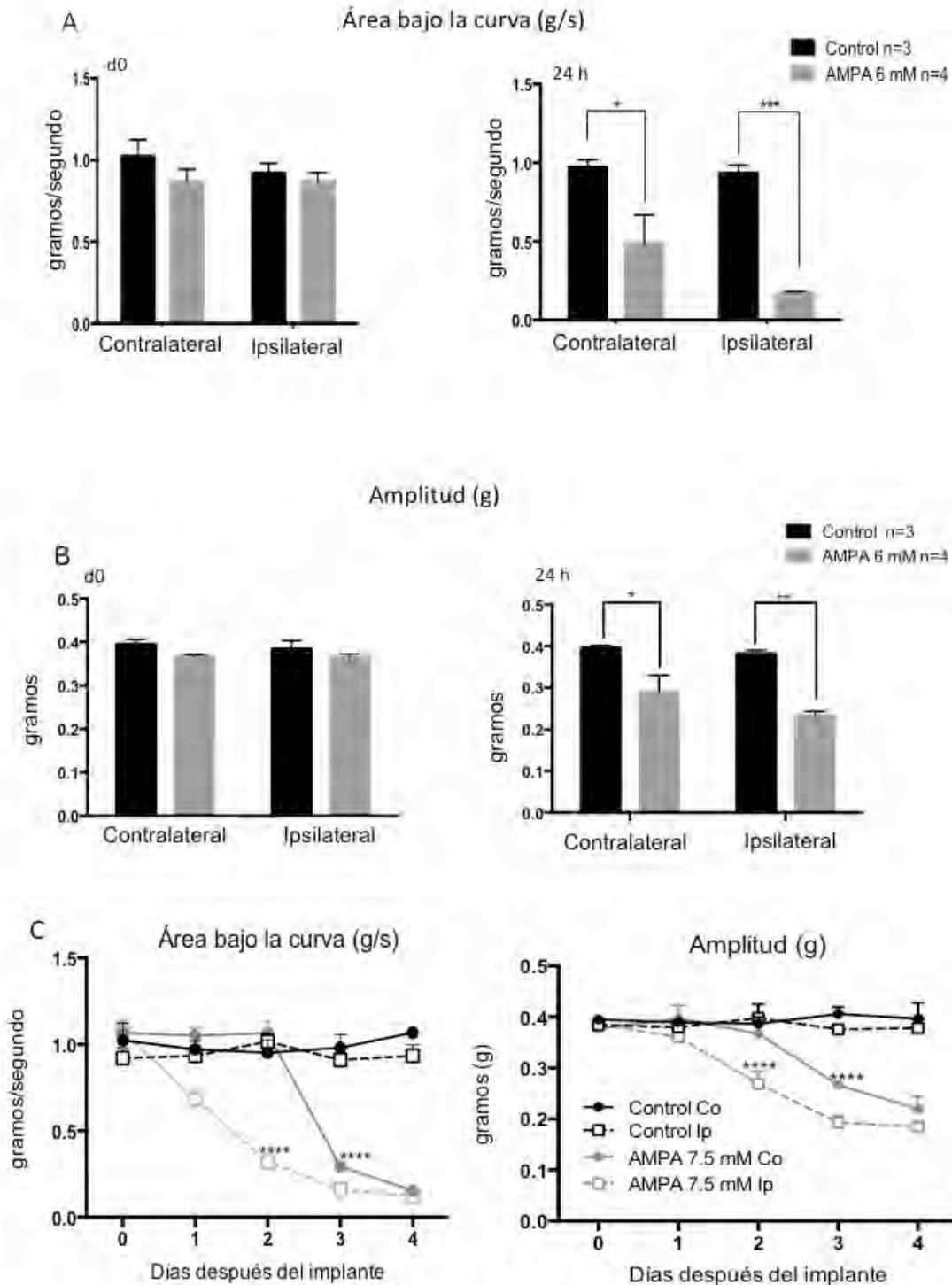


Figura 13. Cuantificación de las alteraciones en la tensión muscular causadas por la sobre-activación aguda y crónica de receptores tipo AMPA en la región lumbar L4-L5 de la médula espinal de rata. En A se muestra el área (g/s) y en B la amplitud registrada para el grupo control (n=3, barras negras) y para el grupo tratado agudamente con AMPA 6 mM (n=4, barras grises) antes y 24 h después de la cirugía, cada barra es la media \pm el error estándar. Anova de una vía. En C se presenta el curso temporal de los cambios en

la amplitud y el área del registro de ratas tratadas crónicamente con AMPA 7.5 mM, cada punto representa la media \pm el error estándar de 4 ratas tratadas con AMPA 7.5 mM (\square ipsilateral, \bullet contralateral) y 3 ratas tratadas con PB 0.1 M (vehículo) como grupo control (\square ipsilateral, \bullet contralateral). Anova de dos vías *p <0.01.

Alteraciones motoras en los músculos correspondientes a la tibia, fíbula y fémur causadas por la sobre-activación crónica de receptores tipo AMPA en la región lumbar L2-L3 de la médula espinal de rata.

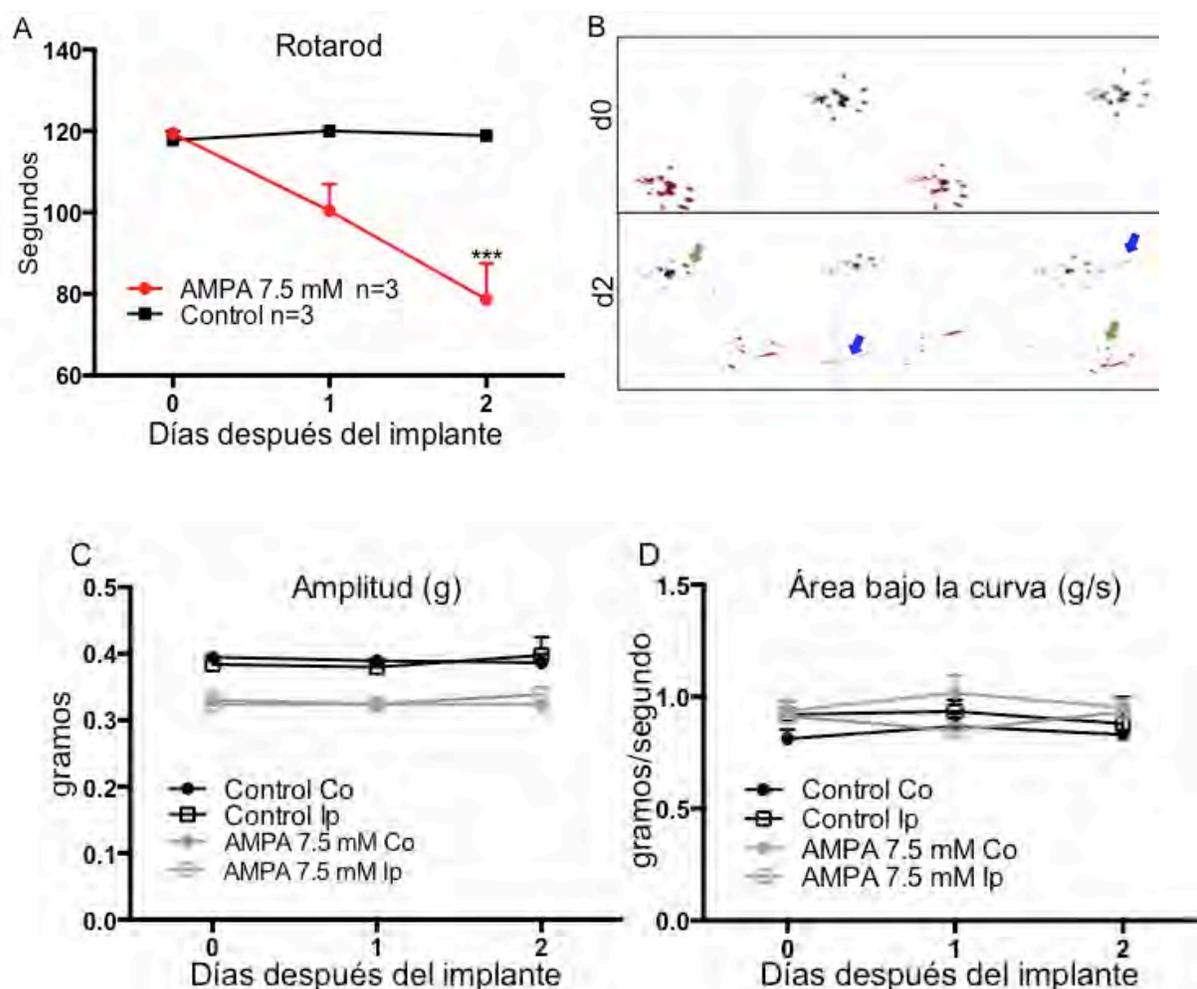
En el modelo de degeneración crónica, el implante de la mini bomba osmótica se realiza entre los segmentos L4-L5 en donde se localizan las MNs que inervan a los músculos distales y proximales de los miembros posteriores, consecuentemente se afecta la capacidad motora de los músculos correspondientes a las falanges, el metatarso, el tarso, la tibia, la fíbula y el fémur. Para comprobar que la tensión evaluada en la prueba del RTF es el resultado exclusivo de la actividad de los músculos distales de los cuartos traseros correspondientes a las falanges se administró crónicamente AMPA 7.5 mM entre los segmentos L2-L3, que inervan principalmente a los músculos proximales de las extremidades como el bíceps femoral, cuádriceps, grácil y tibial. Consecuentemente estas ratas presentaron parálisis en los músculos correspondientes a la tibia, fémur y fíbula pero no en los músculos correspondientes al metatarso y las falanges. En este grupo, el déficit motor se cuantificó en la prueba de rotarod, el registro del patrón de la zancada y en el RTF antes y dos días después de colocarles la mini-bomba osmótica.

El tiempo que tardaron en caer del rotador fue disminuyendo progresivamente siendo significativamente menor al grupo control a partir del segundo día de tratamiento, los valores fueron los siguientes: d0 119 s \pm 0.55, d1 100 s \pm 6.5, d2 78 s \pm 8.8 (figura 14 A, círculos rojos) mientras que el grupo control se mantuvo en 118 s a 120 s durante todo el tratamiento (figura 14 A, cuadros negros). En la figura 14 B se muestra un trazo representativo del registro del patrón de la zancada en donde se puede observar que las ratas pisaron apoyando el metatarso y con las falanges estiradas (flechas verdes), de manera similar a las huellas registradas antes de la cirugía, sin embargo el déficit en los músculos proximales ocasionó una línea entre cada paso (flecha azul) correspondiente al arrastre de los miembros durante la marcha.

En la prueba de RTF la amplitud promedio registrada cada día por la pata ipsilateral fue: d0 0.32 g \pm 0.007, d1 0.32 g \pm 0.006, d2 0.33 g \pm 0.011. La de la pata contralateral fue: d0 0.33 g \pm 0.012, d1 0.32 g \pm 0.007, d2 0.32 g \pm 0.009 (figura 14 C, signos grises) Los promedios del área registrada por la pata ipsilateral fueron: d0 0.91 g/s \pm 0.019, d1 0.84 g/s \pm 0.036, d2 0.93 g/s \pm 0.056. Los de la pata contralateral fueron: d0

0.93 g/s \pm 0.041, d1 1.017 g/s \pm 0.076, d2 0.95 g/s \pm 0.026 (figura 14 D, signos grises). Los valores registrados tanto en amplitud como en área del primer y segundo día de tratamiento no son significativamente diferentes a los obtenidos antes de la cirugía ni lo son respecto a los valores del grupo control, el cual se mantuvo en una amplitud de 0.32 a 0.33 g/s (figura 14 C, signos negros) y un área de 0.86 a 0.93 g/s (figura 14 D signos negros).

Presumiblemente las ratas con déficit motor en los músculos correspondientes a la tibia, fíbula y fémur, disminuyeron el tiempo de permanencia sobre el rotarod pero no presentaron cambios significativos en el RTF debido a que los músculos correspondientes a las falanges, metatarso y tarso no se vieron severamente afectados, por lo anterior podemos concluir que la prueba del RTF se limita a medir la tensión ejercida por la contracción de las falanges de la rata y no mide la tensión ejercida por la participación de todos los músculos del miembro.



*Figura 14. Alteraciones motoras en los músculos correspondientes a la tibia, fibula y fémur causadas por la sobre-activación crónica de receptores tipo AMPA en la región lumbar L2-L3 de la médula espinal de rata. En A el grupo de ratas tratadas con AMPA tardaron menos tiempo en caer del rotarod que el grupo control, la disminución comenzó en el primer día post-cirugía y fue significativo en el segundo día. B) En el registro del patrón de la zancada del grupo administrado con AMPA se puede observar el metatarso y las falanges de ambas patas (flechas verdes), sin embargo, el déficit en los músculos proximales ocasionó una línea entre cada paso correspondiente al arrastre de los miembros durante la marcha (flechas azules). C y D) En la prueba RTF la amplitud y el área del grupo administrado con AMPA no son significativamente diferentes respecto al control, lo que sugiere que el test evalúa exclusivamente a los músculos distales de los cuartos traseros. Los valores se presentan como la media \pm el error estandar de 3 ratas en el grupo control y 3 en el grupo tratado con AMPA 7.5 mM. Anova de una vía para ambas pruebas motoras, *p <0.01.*

IX.- Discusión

Aumento en el volumen administrado de AMPA 6 mM en el modelo agudo de degeneración.

Para reproducir el modelo agudo inicialmente administramos mediante microdiálisis dos fracciones de AMPA 6 mM (50 μ l) de acuerdo al protocolo reportado (Corona y Tapia, 2004). Estas ratas presentaron signos de exitabilidad durante la infusión de AMPA, característicos del modelo. Al término de la cirugía la capacidad motora de la pata ipsilateral se afectó discretamente, sin embargo, a las 24 horas post-cirugía dicho déficit desapareció (datos no mostrados). El tejido de estos experimentos se procesó para análisis histológico por tinción con violeta de cresilo y se determinó que el número de MNs en el asta ventral ipsilateral no fue menor al 50 % del número de MNs reportado en el grupo control (datos no mostrados), anteriormente en el laboratorio se determinó que el déficit motor únicamente es permanente y severo cuando se pierde más del 50 % de MNs del asta ventral (Santa-Cruz et al., 2016). Por ello, para los experimentos posteriores decidimos administrar 75 μ l de AMPA 6 mM, bajo el supuesto de que 50 μ l no fueron suficientes para causar la degeneración de más del 50 % de las MNs del asta ipsilateral.

El método en la cirugía del modelo crónico influye en el tiempo de progresión de la parálisis mediada por AMPA.

La reproducción del modelo de degeneración de motoneuronas crónico depende de una precisa y reproducible cirugía, factores como la longitud, posición y profundidad a la que se inserta la cánula con la que se administra el fármaco determinan el tiempo en que tarda en difundirse el AMPA hasta el asta ventral y con ello el tiempo de progresión

de la parálisis. En este laboratorio, más de un experimentador ha trabajado con el modelo crónico, sin embargo no han conseguido reproducir el déficit motor en tiempo y severidad reportados (Tovar-y-Romo et al., 2007). La administración de AMPA 7.5 mM empleando una cánula de 2 mm de longitud que se insertó manualmente en diagonal produjo un déficit motor bilateral el cual se cuantificó en el rotarod: d0-120s, d1-95 s, d2- 75s, d3-60s, d5-3s (Ramirez-Jarquin y Tapia, 2016). La administración de AMPA 1 mM, independientemente empleando una cánula de 1mm de longitud insertadas verticalmente de manera manual prolongó el tiempo en que progresó la parálisis, el déficit motor cuantificado en el rotarod fue el siguiente: d0-120s, d2-40s, d7-20 s (Netzahualcoyotzi y Tapia, 2015). En contraste la administración de AMPA 7.5 mM mediante usando una cánula con longitud de 1 mm insertada en posición vertical usando una torre para estereotáxico, el déficit motor cuantificado en el rotarod fue el siguiente: d1-50s, d2-7s, d3-0s (Lazo-Gomez y Tapia, 2016).

A pesar de todas estas modificaciones no se ha conseguido retardar la progresión de la parálisis a 22 días como se describió en anteriormente. Sin embargo, bajo las modificaciones empleadas en el presente trabajo (longitud de la cánula fue de 1.5 mm y el ángulo de inserción fue de 22° controlado con una torre para estereotáxico, concentración de AMPA de 7.5 mM) se consiguió desarrollar una parálisis progresiva en un lapso de 5 días que comenzó entre el día 1 y 2 día después del implante, en la parte distal de la pata ipsilateral y progresó afectando a los músculos correspondientes a la tibia, fíbula y fémur, la parálisis ocurrió de la misma forma en la pata contralateral pero inició al segundo o tercer día post-cirugía. Por lo anterior proponemos que utilizando este protocolo y administrando AMPA a una menor concentración se podría conseguir que la parálisis progrese en un mayor lapso de tiempo. En este sentido, realizamos el tratamiento crónico administrando AMPA a 3.75 mM y las ratas se evaluaron durante 7 días post-cirugía, en el séptimo día las ratas hicieron 30 segundos en el rotarod y la parálisis sólo fue evidente en la pata ipsilateral (datos no mostrados), sin embargo debido a que este grupo se perfundió al séptimo día no sabemos si el insulto sería suficiente para inducir parálisis en el miembro contralateral y en qué tiempo lo haría.

En este modelo de degeneración es indispensable que se desarrolle de un déficit motor que culmine en parálisis en un mayor tiempo y de manera progresiva, para poder estudiar los procesos involucrados en la degeneración de las MNs así como para desarrollar estrategias de neuro-protección y neuro-regeneración.

Relevancia de evaluar el déficit motor en músculos distales de los cuartos traseros

Actualmente existen diversas pruebas motoras que miden la fuerza de los músculos de los miembros posteriores, sin embargo, hasta el momento no existe una prueba que mida exclusivamente la tensión muscular ejercida por los músculos distales de las extremidades posteriores. En este laboratorio se han reportado déficits motores en los músculos distales de las extremidades que no han podido ser evaluados con la prueba de rotarod, el PGE, o el registro del patrón de la zancada.

Se determinó que la coadministración de sustratos energéticos en el modelo crónico de degeneración de MNs previno el déficit motor en los músculos distales de la pata Ipsilateral (falanges), como evidencia de ello se reportaron fotos de las falanges, sin embargo, esta evaluación es únicamente cualitativa (Netzahualcoyotzi y Tapia, 2015). Proponemos que nuestra prueba puede ser utilizada para la cuantificación de déficits como este.

Se reportó que la administración crónica de bicuculina (antagonista de receptores GABA tipo A) en la médula espinal de rata provocó un déficit en los músculos correspondientes a las falanges de los cuartos traseros, descrito como flacidez, este se evaluó con un análisis cuantitativo a partir de la prueba cualitativa el registro del patrón de la zancada. A pesar de este análisis, la prueba no ofrece un dato cuantitativo directo. Otra desventaja de esta prueba es que si el déficit motor no se refleja en la posición de la pisada, entonces la prueba no puede registrarlo (Ramirez-Jarquin y Tapia, 2017). Los resultados del presente estudio demostraron que aun cuando la huella de una rata con alteraciones motoras no es visiblemente diferente a la de un control, la prueba RTF permite evaluar dicho déficit motor de manera cuantitativa.

Recientemente en el laboratorio, se demostró que la administración crónica de inhibidores de la GAD (enzima que cataliza la síntesis de GABA) en la médula espinal de rata provocó un déficit motor descrito como flacidez en las falanges de los cuartos traseros (resultados no publicados). Al igual que en los trabajos ya mencionados, este déficit motor difícilmente puede ser evaluado con las pruebas motoras empleadas hasta ahora, proponemos que dicha afectación motora podría ser cuantificada mediante la prueba del RTF.

En cuanto al modelo agudo de degeneración mediada por AMPA 6 mM, en el presente estudio se determinó que la capacidad motora de la pata contralateral también disminuye respecto al control, déficit que no se detectó en trabajos previos (Corona y

Tapia, 2004; Ramirez-Jarquin y Tapia, 2016), evidencia de que la sensibilidad de nuestra prueba es capaz de detectar alteraciones motoras discretas.

Relación entre el tipo de fibra muscular y la resistencia a la parálisis de algunos grupos musculares en modelos de ELA

En ratones transgénicos SOD G93A se determinó que en los músculos de los cuartos traseros hay subgrupos musculares con el mismo tipo de fibra muscular y tipo de MN que los inerva, estas características los hacen ya sea resistentes o propensos a la denervación en etapas asintomáticas, por ejemplo: el músculo tibial compuesto de fibras y MNs tipo FF y FR presentó denervación temprana, en contraste el músculo sóleo compuesto principalmente de MNs y fibras tipo S no presentó denervación en etapas tempranas. Este patrón se conservó en todos los subgrupos evaluados (Pun et al., 2006).

En ratones transgénicos SOD 93G se determinó que el músculo cutáneo máximo compuesto exclusivamente por fibras y MNs tipo FF y FR pierde uniones neuromusculares antes de la aparición de los síntomas de parálisis (Tallon et al., 2016).

En ratones transgénicos SOD G93A el músculo extensor largo de los dedos presentó degeneración de la placa motora descrita como fragmentación de uniones neuromusculares, denervación y disminución en el número de receptores para acetilcolina en etapas asintomáticas. A diferencia del músculo oculomotor y los músculos de los esfínteres anales los cuales fueron resistentes a la degeneración de la placa motora incluso en etapas sintomáticas (Valdez, et. al., 2012).

Con lo anterior, consideramos que la evaluación independiente de determinados grupos musculares nos permite identificar el tipo de fibra muscular que se ve afectado durante un proceso de neurodegeneración.

Relación entre la progresión de la parálisis y la pérdida progresiva de MNs en el modelo de degeneración crónica de MNs.

En el presente estudio las ratas tratadas de manera crónica con AMPA 7.5 mM fueron evaluadas con la prueba RTF, los resultados obtenidos indican que el déficit motor de la pata ipsilateral comenzó desde el primer día post-cirugía, mientras que en la contralateral comenzó en el tercer día post-cirugía. Llama la atención la similitud temporal en que se reportaron cambios en el número de MNs en el trabajo de Ramirez-Jarquin

(2016), donde se reportó una disminución significativa de MNs en el lado ipsilateral desde el primer día post-cirugía, momento en el que la prueba RTF detectó una disminución en el área y la amplitud registrada por la pata ipsilateral. En el lado contralateral de la médula espinal la disminución en el número de MNs fue significativa a partir del tercer día post-implante, momento en el que el área y la amplitud registradas por el RFT disminuyeron significativamente en la pata contralateral. Los resultados conductuales de la prueba RTF podrían reflejar la degeneración de las MNs en la médula espinal, de diferente progresión entre cada asta.

X.- Conclusión

Basados en los resultados obtenidos en este estudio proponemos que la prueba motora RTF es suficientemente sensible para evaluar la funcionalidad de los músculos conformados por fibras tipo FF y FR de las extremidades posteriores. La relación entre déficit motor y tipo de fibra muscular podría ayudar a entender el mecanismo de degeneración de las MNs en la ELA y también ayudar al diseño de estrategias para prevenir y atenuar la pérdida de las MNs en esta enfermedad.

XI.- Referencias

- Brady, S. T., & Siegel, G. J. (2012). Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology, 8th edition. *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology, 8th edition*, Xxiii-Xxiv.
- Carvalho, M., Schwartz, M. S., & Swash, M. (1995). Involvement of the external anal sphincter in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*, 18(8), 848-853. doi:10.1002/mus.880180808
- Carvalho, M., & Swash, M. (2016). Lower motor neuron dysfunction in ALS. *Clin Neurophysiol*, 127(7), 2670-2681. doi:10.1016/j.clinph.2016.03.024
- Cho, T. A. (2015). Spinal cord functional anatomy. *Continuum (Minneapolis, Minn)*, 21, 13-35.
- Choi, D. W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1(8), 623-634.
- Corona, J. C., & Tapia, R. (2004). AMPA receptor activation, but not the accumulation of endogenous extracellular glutamate, induces paralysis and motor neuron death in rat spinal cord in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 89(4), 988-997. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02383.x
- Corona, J. C., & Tapia, R. (2007). Ca²⁺-permeable AMPA receptors and intracellular Ca²⁺ determine motoneuron vulnerability in rat spinal cord in vivo. *Neuropharmacology*, 52, 1219-1228.

- Corona, J. C., Tovar-y-Romo, L. B., & Tapia, R. (2007). Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Ther Targets*, *11*(11), 1415-1428. doi:10.1517/14728222.11.11.1415
- Drake, R. L., Wayne, V. A., & Mitchell, A. W. M. (2015). *Gray's Anatomy for Students* (C. L. ELSEVIER Ed. third ed.).
- Gardiner, P. F. (2001). *Neuromuscular aspects of physical activity* (H. Kinetics Ed.).
- Gros-Louis, F., Gaspar, C., & Rouleau, G. A. (2006). Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*, *1762*(11-12), 956-972. doi:10.1016/j.bbadis.2006.01.004
- Gundersen, K., Leberer, E., Lomo, T., Pette, D., & Staron, R. S. (1988). Fibre types, calcium-sequestering proteins and metabolic enzymes in denervated and chronically stimulated muscles of the rat. *J Physiol*, *398*, 177-189.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). *Principles of Neural Science* (fourth ed.): Elsevier.
- Keynes, R. D., Aidley, D. J., & Huang, C. L.-H. (2011). *Nerve and Muscle* (Cambridge Ed. Fourth ed.).
- Kidd, D., Williams, A. J., & Howard, R. S. (1996). Poliomyelitis. *Postgrad Med J*, *72*(853), 641-647.
- Kiernan, M. C., Vucic, S., Cheah, B. C., Turner, M. R., Eisen, A., Hardiman, O., . . . Zoing, M. C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, *377*, 942-955.
- Kolb, S. J., & Kissel, J. T. (2015). Spinal Muscular Atrophy. *Neurol Clin*, *33*(4), 831-846. doi:10.1016/j.ncl.2015.07.004
- Kostera-Pruszczyk, A., Niebroj-Dobosz, I., Emeryk-Szajewska, B., Karwanska, A., & Rowinska-Marcinska, K. (2002). Motor unit hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis vs amino acids acting as neurotransmitters. *Acta Neurologica Scandinavica*, *106*(1), 34-38. doi:10.1034/j.1600-0404.2002.00149.x
- Lazo-Gomez, R., & Tapia, R. (2016). Motor Alterations Induced by Chronic 4-Aminopyridine Infusion in the Spinal Cord In vivo: Role of Glutamate and GABA Receptors. *Front Neurosci*, *10*, 200. doi:10.3389/fnins.2016.00200
- Lazo-Gomez, R., & Tapia, R. (2017). Quercetin prevents spinal motor neuron degeneration induced by chronic excitotoxic stimulus by a sirtuin 1-dependent mechanism. *Transl Neurodegener*, *6*, 31. doi:10.1186/s40035-017-0102-8
- Lillo, P., Matamala, J. M., Valenzuela, D., Verdugo, R., Castillo, J. L., Ibanez, A., & Slachevsky, A. (2014). [Overlapping features of frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev Med Chil*, *142*(7), 867-879. doi:10.4067/S0034-98872014000700007
- Mai, J., & Paxinos, G. (2011). *The Human Nervous System* (third ed.).
- Malessa, S., Leigh, P. N., Bertel, O., Sluga, E., & Hornykiewicz, O. (1991). Amyotrophic Lateral Sclerosis Glutamate Dehydrogenase and Transmitter Amino Acids in the Spinal Cord. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, *54*(11), 984-988. doi:10.1136/jnnp.54.11.984
- Mohan, R., Tosolini, A. P., & Morris, R. (2015). Segmental Distribution of the Motor Neuron Columns That Supply the Rat Hindlimb: A Muscle/Motor Neuron Tract-Tracing Analysis Targeting the Motor End Plates. *Neuroscience*, *307*, 98-108. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.08.030

- Netzahualcoyotzi, C., & Tapia, R. (2015). Degeneration of spinal motor neurons by chronic AMPA-induced excitotoxicity in vivo and protection by energy substrates. *Acta Neuropathol Commun*, 3, 27. doi:10.1186/s40478-015-0205-3
- Niebroj-Dobosz, I., Janik, P., & Kwiecinski, H. (2002). Effect of Riluzole on serum amino acids in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand*, 106(1), 39-43.
- Palastanga, N., Field, D., & Soames, R. (2000). *Anatomía y movimiento humano estructura y funcionamiento* (Primera ed.).
- Per Brodal, M. D. (2010). *The Central Nervous System Structure and Function* (O. u. press Ed. Fourth ed.).
- Pun, S., Santos, A. F., Saxena, S., Xu, L., & Caroni, P. (2006). Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci*, 9(3), 408-419. doi:10.1038/nn1653
- Ramirez-Jarquín, U. N., Lazo-Gomez, R., Tovar-y-Romo, L. B., & Tapia, R. (2014). Spinal inhibitory circuits and their role in motor neuron degeneration. *Neuropharmacology*, 82, 101-107. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.10.003
- Ramirez-Jarquín, U. N., & Tapia, R. (2016). Neuropathological Characterization of Spinal Motor Neuron Degeneration Processes Induced by Acute and Chronic Excitotoxic Stimulus in Vivo. *Neuroscience*, 331, 78-90. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.06.021
- Ramirez-Jarquín, U. N., & Tapia, R. (2017). Chronic GABAergic blockade in the spinal cord in vivo induces motor alterations and neurodegeneration. *Neuropharmacology*, 117, 85-92. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.01.040
- Ridet, J. L., Malhotra, S. K., Privat, A., & Gage, F. H. (1997). Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci*, 20(12), 570-577.
- Rothstein, J. D., Martin, L. J., & Kuncl, R. W. (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*, 326(22), 1464-1468. doi:10.1056/NEJM199205283262204
- Santa-Cruz, L. D., Guerrero-Castillo, S., Uribe-Carvajal, S., & Tapia, R. (2016). Mitochondrial Dysfunction during the Early Stages of Excitotoxic Spinal Motor Neuron Degeneration in Vivo. *ACS Chem Neurosci*, 7(7), 886-896. doi:10.1021/acschemneuro.6b00032
- Santa-Cruz, L. D., Ramírez-Jarquín, U. N., & Tapia, R. (2012). Role of Mitochondrial Dysfunction in Motor Neuron Degeneration in ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis. In P. M. Maurer (Ed.), *Amyotrophic Lateral Sclerosis*
- Siesjo, B. K. (1994). Calcium-mediated processes in neuronal degeneration. *Ann N Y Acad Sci*, 747, 140-161.
- Tallon, C., Russell, K. A., Sakhalkar, S., Andrapallayal, N., & Farah, M. H. (2016). Length-dependent axo-terminal degeneration at the neuromuscular synapses of type II muscle in SOD1 mice. *Neuroscience*, 312, 179-189. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.11.018
- Tovar-y-Romo, L. B., Zepeda, A., & Tapia, R. (2007). Vascular endothelial growth factor prevents paralysis and motoneuron death in a rat model of excitotoxic spinal cord neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66(10), 913-922. doi:10.1097/nen.0b013e3181567c16

- Vandertop, W. P. (2014). Syringomyelia. *Neuropediatrics*, 45(1), 3-9. doi:10.1055/s-0033-1361921
- Watson, C., Paxinos, G., & Kayalioglu, G. (2009). *The Spinal Cord: A Christopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas* (first ed.).