



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE PSICOLOGÍA

EL EFECTO DE LOS NEUROTRANSMISORES
MONOAMINÉRGICOS EN LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL
MOTORA DESPUÉS DE UNA LESIÓN EN SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:

SELENE VARGAS VELÁZQUEZ

JURADO DE EXAMEN

DIRECTOR: DR. JAVIER VARGAS SÁNCHEZ

ASESOR: LIC. SANTIAGO RINCÓN SALAZAR

ASESOR: DR. ALEJANDRO VALDÉS CRUZ

SINODAL: DR. EDUARDO ALEJANDRO ESCOTTO CÓRDOVA

SINODAL: DRA. LILIA MESTAS HERNÁNDEZ



CIUDAD DE MÉXICO

Febrero, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 mis padres, Rosa y Pablo; y a mi hermana, Coral, por su apoyo, cariño y comprensión en todo momento, sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

A mi familia por estar siempre conmigo.

A los profesores y académicos que participaron en mi formación por depositar su fe en mí y ayudarme a alcanzar mis logros.

A mi director de tesis, el Dr. Javier Vargas, y a los integrantes de mi sínodo, por todo el tiempo de trabajo y las correcciones pertinentes.

A mis amigos por los momentos de risas, llanto y sus palabras de aliento.

A mi escuela y a la UNAM por darme todo lo necesario para mi formación.

Al Instituto Nacional de Rehabilitación LGII por abrirme las puertas de sus laboratorios y ayudarme a complementar mi desarrollo

... Y a mí, por tanta paciencia

Índice

Índice de figuras.....	4
Índice de tablas.....	5
Abreviaturas.....	7
Resumen	8
Introducción	9
CAPÍTULO I: El sistema nervioso central y las lesiones en el mismo.....	11
1.1 Las lesiones en el SNC vistas como un problema en las neurociencias y a nivel clínico	11
CAPÍTULO II: Sistemas monoaminérgicos y serotonina	13
2.1 Las monoaminas y su función en la regeneración neuronal y regulación de la conducta motriz	13
2.2 Potencial de las monoaminas para participar en la recuperación motora después de una lesión	15
CAPÍTULO III: Estudio de los invertebrados en la regeneración	16
3.1 Estudios de regeneración en organismos invertebrados	16
3.2 Regeneración neurítica y recuperación funcional motora en sanguijuelas ..	17
Método.....	17
4.1 Planteamiento del problema	17
4.2 Pregunta de investigación.....	18
4.3 Hipótesis	18
4.4 Objetivos.....	18
4.4 Diseño de estudio	19
4.5 Población y muestra	19
4.7 Variables.....	19
4.8 Procedimientos	21
I. <i>Mantenimiento de los organismos:</i>	21
II. <i>Grupos de trabajo:</i>	21
III. <i>Registro conductual:</i>	24
4.9 Análisis estadístico	26
Resultados.....	30
Discusión	45

Conclusión	50
Referencias.....	51
Anexos.....	56

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de la serotonina	14
Figura 2. Estructura química de la Dopamina.....	15
Figura 3. El Sistema Nervioso Central de la sanguijuela.	23
Figura 4. Métodos	23
Figura 5. Grupos de trabajo.....	26
Figura 6. Nado sincrónico de una sanguijuela.	31
Figura 7. Diagrama de las conductas de nado y marcha de sanguijuelas sanas, lesionadas y con inyección de reserpina.	31
Figura 8. Series de movimiento de la sanguijuela sana y lesionada.	32
Figura 9. Serie de movimientos involucrados en la marcha.....	33
Figura 10. Imagen de la recuperación del nado sincrónico después una lesión en SNC.	34
Figura 11. Sanguijuela inyectada con reserpina.	35

Índice de tablas

Tabla 1. Cantidad de sanguijuelas usadas por grupo de trabajo y serie experimental	21
Tabla 2. Ejemplo de tabla con el total de animales y aquellos que realizan la conducta	27
Tabla 3. Ejemplo de tabla con porcentajes de recuperación.	28
Tabla 4. Ejemplo de porcentajes promedio de recuperación motora.....	29
Tabla 5. Porcentajes de recuperación de nado al día 2, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.	36
Tabla 6. Número de animales que recuperaron el nado al día 2, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.	36
Tabla 7. Porcentajes de recuperación de nado al día 7 de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.	36
Tabla 8. Número de animales que recuperaron el nado al día 7, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.	37
Tabla 9. Porcentajes de recuperación de nado al día 21 de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.	37
Tabla 10. Número de animales que recuperaron el nado al día 21, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.	37
Tabla 11. Porcentajes de recuperación de marcha al día 2 de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.	38
Tabla 12. Número de animales que recuperaron la marcha al día 2, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.	38
Tabla 13. Porcentajes de recuperación de marcha al día 7 de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.	38
Tabla 14. Número de animales que recuperaron la marcha al día 7, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.	38
Tabla 15. Porcentajes de recuperación de marcha al día 21 de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.	39
Tabla 16. Número de animales que recuperaron la marcha al día 21, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.	39
Tabla 17. Porcentajes de recuperación, y valor p de nado sincrónico y marcha a los días 2,7 y 21	41

Tabla 18. Porcentajes de recuperación de nado parcial al día 2 de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo	43
Tabla 19. Número de animales que recuperaron el nado parcial al día 2, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.	43
Tabla 20. Porcentajes de recuperación de nado parcial al día 7 de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo	43
Tabla 21. Número de animales que recuperaron el nado parcial al día 7, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.	44
Tabla 22. Porcentajes de recuperación de nado parcial al día 21 de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.	44
Tabla 23. Número de animales que recuperaron el nado parcial al día 21, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.	44
Tabla 24. Porcentajes de recuperación de nado parcial.	45

Abreviaturas

SN: Sistema Nervioso

SNC: Sistema Nervioso Central

C: grupo control

L: grupo de lesión

R: grupo de reserpina

LR: grupo de lesión y reserpina

LRS: grupo de lesión, reserpina y serotonina

5HT: 5- hidroxitriptamina o serotonina

S: serie

Resumen

Los axones del sistema nervioso central son incapaces de regenerarse por sí solos en vertebrados superiores a diferencia de la regeneración que se presenta en el sistema nervioso periférico, esto es debido al específico el entorno glial de cada uno. Asimismo, la falla en la regeneración neurítica determina la pérdida de funciones motrices y cognitivas. La regeneración neurítica es un fenómeno que involucra una diversidad de factores entre ellos por ejemplo los neurotransmisores como la serotonina y la dopamina son clave en la regeneración neurítica y en la movilidad animal. Lo anterior sugiere que estos neurotransmisores monoaminérgicos pueden ser determinantes en la recuperación motriz después de una lesión en el sistema nervioso central.

En este estudio se probó si la depleción o falta de monoaminas en el sistema nervioso central de *Haementeria officinalis*, interferiría con la recuperación funcional motriz después de una lesión del SNC. El diseño experimental fue con muestreo probabilístico aleatorio simple, en donde se usaron 96 sanguijuelas *Haementeria officinalis* distribuidas en 5 series experimentales con 6 organismos cada serie. De cada serie se obtuvo el porcentaje de recuperación. Se estudiaron 3 variables independientes: 1) lesión del SNC, 2) vaciamiento de monoaminas mediante la inyección de reserpina, 3) restitución de serotonina. Se analizó la recuperación motora durante las conductas de nado y marcha.

La conducta de nado es la formación de una onda senoidal de la cabeza a la cola; la conducta de marcha se compone de diversos movimientos donde se ve involucrada la ventosa trasera y delantera, además de la contracción de todo el cuerpo. Dos días después de la lesión del nervio conectivo entre los ganglios 7 y 8, los animales lesionados perdieron los comportamientos de nado y marcha. Siete días después, el $63.33 \pm 13.33\%$ ($n=5$) de las sanguijuelas lesionadas recuperó la capacidad de nadar, pero con la inyección de reserpina solo lo hizo el $13.33 \pm 8.16\%$ ($n=5$, $p=0.01$); por otro lado, en la conducta de marcha al día 7, el $79.99 \pm 13.33\%$ de sanguijuelas lesionadas recuperó la capacidad deambulatoria o de marcha, pero aquellas con inyección de reserpina y lesión solo se recuperaron

el $33.33 \pm 14.9\%$ ($n=5$, $p=0.04$). La inyección exclusiva de reserpina no tuvo efecto sobre estos patrones de movimiento. La administración aguda de serotonina, no promovió la recuperación; en el nado $3.33 \pm 3.33\%$ ($n=5$, $p=0.28$) y en la marcha $37.49 \pm 21.91\%$ ($n=5$, $p=0.87$). Esto muestra la importancia de las monoaminas para el porcentaje de recuperación del nado y marcha perdidos por una lesión en SNC; y que la restitución aguda de serotonina no afecta el porcentaje de recuperación motriz.

Introducción

La investigación de otras especies para obtener beneficios en la nuestra se sustenta en los hallazgos de Darwin publicados en 1859 donde se menciona la relación evolutiva que existe entre diversas especies ya que los mecanismos básicos son compartidos por muchos animales.

En la presente investigación se utilizó como modelo a la sanguijuela *Haementeria officinalis* para estudiar el fenómeno de recuperación motora después de una lesión en sistema nervioso central. El restablecimiento de las conductas motoras después de una lesión que afecta al sistema nervioso depende de que las fibras nerviosas regeneren y se conecten correctamente con sus blancos por lo que la recuperación de conductas motrices sigue siendo dependiente de la capacidad de regeneración de células del sistema nervioso central (SNC), es decir, de la conectividad de axones periféricos con sus blancos. Es a partir de esta conectividad restaurada que es posible la recuperación de funciones motoras perdidas por una lesión en Sistema Nervioso central, mismas que serán objeto de estudio en esta investigación. En este experimento se lesionó el nervio conectivo de sanguijuelas (el cual es parte de su SNC) que, se puede considerar como análogo de la médula espinal de otros animales porque en éste, se encuentran los axones que van de los somas de las neuronas ganglionares a todo lo largo del SNC de las sanguijuelas. Asimismo, el SNC de estos organismos contiene generadores centrales de patrones, interneuronas y diversos tipos de células acompañantes (gliales y microgliales) a todo lo largo su estructura. A continuación, en el marco teórico, se presenta datos principalmente sobre lesión

medular, pero también algunos datos sobre patologías encefálicas como Parkinson debido a que son padecimientos del SNC y sus procesos de recuperación podrían contener características similares a los procesos de reparación de los invertebrados.

El proceso de regeneración del SNC de las sanguijuelas se ha estudiado desde hace más de 40 años (Muller y Carboneto, 1979), en ellas se conoce la ubicación, la morfología y la actividad eléctrica de las neuronas mecanosensoriales así como sus conexiones en el SNC, además ofrecen diversas ventajas, como lo son: la capacidad de regenerar *in vivo* como *in vitro*, por tanto permiten abordar el problema de regeneración neuronal a diferentes niveles con técnicas modernas (De-Miguel et al., 2002), y puesto que este organismo es capaz de recuperarse de lesiones en su SNC de forma natural. El estudio de la recuperación motriz después de una lesión inducida en el SNC da la posibilidad de probar diversas formas de estimulación tanto físicas como químicas en un tiempo relativamente corto. Las propiedades eléctricas de la membrana neuronal, los canales iónicos y los neurotransmisores son semejantes o idénticos a los del resto de los animales (Hubel y Wiesel, 1977). Los modelos animales de enfermedades humanas han sido utilizados desde hace muchos años en distintas áreas de investigación, constituyendo uno de los pasos esenciales en la biomedicina y en ciencias de salud en general. Se requieren tanto para proyectos de investigación como para el desarrollo de pruebas diagnósticas y terapéuticas y en los controles de productos farmacológicos (Rodríguez, 2007). Sin embargo, este tipo de investigación no está exento de reglamentaciones ya que, de acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS) expresaba en su XI Reunión Interamericana de 1980 (citado en Rodríguez 2007, p. 26): "los países que han logrado un gran avance en el control de las enfermedades humanas y animales son aquellos que han establecido entidades que se dedican al mejor desarrollo de la Ciencia de los Animales de Laboratorio".

Así los avances deben ir asociados al cumplimiento de normas éticas; como lo expresaron, desde 1959 Russell y Rex en *Los Principios de la Técnica*

Experimental Humanitaria, describiendo las "tres R": reducción, refinamiento y reemplazo, en el manejo de animales para la investigación. Planteaban que lo más ético en estas situaciones era reducir al mínimo necesario el número de animales con el que se experimentaba, refinar las técnicas que se utilizaban para evitarles, el dolor, estrés, sufrimiento y en la medida de la posible siempre buscar reemplazar la experimentación con animales por técnicas como las fisicoquímicas y relaciones estructura-actividad, modelos matemáticos e informáticos, uso de invertebrados, plantas y microorganismos, métodos in vitro y estudios en humanos, incluido el uso de voluntarios humanos, encuestas y epidemiología (Goldberg et al., 1996), consideraciones que fueron tomadas en cuenta en esta investigación.

CAPÍTULO I: El sistema nervioso central y las lesiones en el mismo

1.1 Las lesiones en el SNC vistas como un problema en las neurociencias y a nivel clínico

El sistema nervioso controla todos los procesos en los animales. En los vertebrados se divide en sistema nervioso central (encéfalo y médula espinal) y sistema nervioso periférico (nervios craneales y nervios espinales). Se conforma de una red intrínseca y altamente organizada de neuronas, células gliales y fibras nerviosas. Tiene tanto una función sensitiva como motriz, la primera la desarrolla al comunicar al organismo con el medio externo y la segunda al generar una respuesta motora adecuada, (como puede ser contraer un músculo) a través de los nervios.

Después de la lesión del sistema nervioso central (SNC) los axones son incapaces de regenerarse espontáneamente en vertebrados superiores. Por otro lado, en vertebrados inferiores (como peces, anfibios y reptiles), en invertebrados y en las fibras del sistema periférico de los mismos vertebrados superiores, sí es posible la regeneración, las fibras axonales son capaces de restaurar la conectividad y restablecer las funciones afectadas por la lesión (Horner y Gage, 2000). En la falla de la regeneración del SNC participan múltiples factores como: la sobrevivencia neuronal, células acompañantes como glía y microglía, la matriz

extracelular y los factores solubles, entre otros factores. En 1981, David y Aguayo mostraron que el potencial regenerativo de estas neuronas centrales parece solo ser expresado cuando el entorno glial del sistema nervioso central se cambia al del sistema nervioso periférico. En sus estudios, ambos autores muestran como neuronas de la médula espinal, extienden axones a través de segmentos de nervios periféricos usados como puentes en el SNC; esto indica que la incapacidad de regenerar de los axones del SNC no es debido a sus características intrínsecas, sino a la naturaleza no permisiva del medio ambiente.

En el campo de la rehabilitación motora se han creado diversas terapias para fortalecer las conexiones intactas por la lesión y promover la reconexión de los axones dañados. Sin embargo, la recuperación de conductas motoras sigue dependiendo de la capacidad de regeneración de células del sistema nervioso central (SNC). Se han hecho injertos de nervio periférico en la médula lesionada de unos algunos pacientes, sin obtener una repercusión funcional significativa. Sin embargo, no se descarta todavía la utilidad de esta técnica combinada con otro tipo de intervenciones (Nieto, et. al, 2002).

De acuerdo con la OMS (2013) cada año alrededor de 500 000 personas sufren lesiones medulares. Esas personas tienen una probabilidad entre dos y cinco veces mayor de morir prematuramente, y es en los países de ingresos bajos y medios donde se registran las tasas de supervivencia más bajas. Además, el 90% de las lesiones medulares tiene causas traumáticas, como pueden ser los accidentes de tránsito, las caídas o la violencia.

Las lesiones producidas en el sistema nervioso central son la principal causa de la muerte de niños y adultos jóvenes, sólo superada por las enfermedades cardíacas y el cáncer (Nieto, et. al, 2002).

En México no existen informes exactos de la prevalencia de la lesión medular, pero se estima que la ocurrencia anual tan solo en la Ciudad de México es de 18.1 por millón de habitantes y ocurre con más frecuencia en hombres en edad productiva que se encuentran en la tercera década de la vida (Pardini, 1998).

En este mismo estudio se reportó que en la Ciudad de México la relación hombre mujer es de 6 a 1. Siendo la causa más frecuente la caída de altura en 34.5%, seguida de la herida por arma de fuego de 29% y 26.7% el accidente automovilístico.

CAPÍTULO II: Sistemas monoaminérgicos y serotonina

2.1 Las monoaminas y su función en la regeneración neuronal y regulación de la conducta motriz

La regeneración neuronal es un fenómeno que involucra una gran diversidad de factores, por lo que depende de la supervivencia de neuronas que fueron lesionadas, la interacción con otras neuronas, las proteínas de la matriz extracelular, factores solubles y la actividad neuronal, entre otros factores. Los neurotransmisores y sus receptores también son factores clave de la regeneración neuronal (Vargas J., et al., 2019).

Los neurotransmisores monoaminérgicos han sido de interés porque se les ha asociado a diversos procesos en el movimiento de los animales. Estos neurotransmisores se dividen en catecolaminas (epinefrina, dopamina y norepinefrina), e indolaminas (serotonina). Las aminas son compuestos orgánicos derivados del amoniacó y que resultan de la sustitución de uno o varios hidrógenos de la molécula de amoniacó por otros sustituyentes o radicales. Según se sustituyan uno, dos o tres hidrógenos, las aminas son primarias, secundarias o terciarias. Asimismo, las monoaminas son sustancias que se derivan por descarboxilación de aminoácidos que tienen un grupo amino (Ácidos amino carboxílicos) y un anillo de benceno; una de sus propiedades es servir de precursores en la síntesis de ciertas hormonas o sustratos de fermentos. Una de las características principales de las monoaminas es que están distribuidas en todo el sistema nervioso. Los neurotransmisores monoaminérgicos que tienen diversas funciones de neuromodulación, regulan la atención, los estados emocionales y las funciones viscerales fundamentales. La inhibición o la excitación de cada una de las diferentes monoaminas puede deprimir o impulsar al sistema nervioso a conseguir diversas metas en contexto.

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5HT) (figura 1), es una indolamina sintetizada a partir del aminoácido L-triptófano, que procede de la dieta. El L-triptófano llega al cerebro desde la circulación sanguínea pasando la barrera hematoencefálica por medio del transportador específico de aminoácidos neutros. Una vez en que llega al citoplasma de las neuronas serotoninérgicas, el L-triptófano es hidroxilado a 5-hidroxitriptófano (5HTP) mediante la acción de la enzima triptófano hidroxilasa, el L-aminoácido aromático descarboxilasa le quita el grupo carboxilo al 5-hidroxitriptófano dando como resultado la serotonina. Se ha demostrado que la serotonina participa en guiar los conos de crecimiento en el cultivo neuronal, además de la extensión de los axones y la sinaptogénesis (Spencer, Klumperman y Syed, 1998). Estudios sobre la secreción somática de serotonina permiten proponer que este neurotransmisor tiene efectos en procesos que suceden fuera de la sinapsis (De Miguel y Trueta, 2004), como la regeneración axonal.

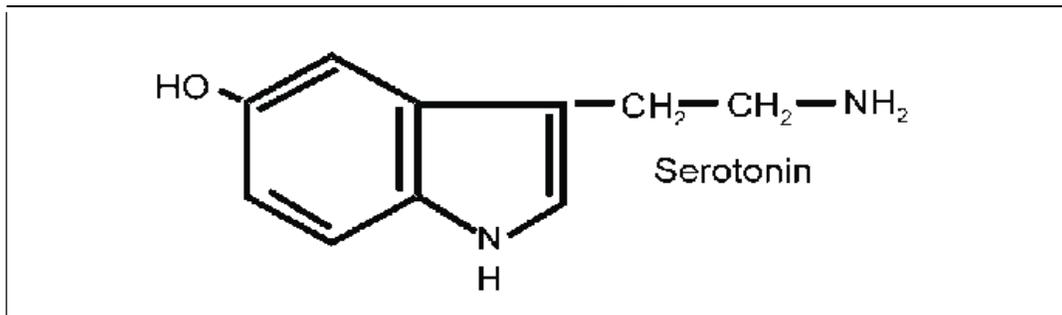


Figura 1. Estructura química de la serotonina

Por otro lado, la dopamina (Figura 2) es una catecolamina cerebral que está implicada en el control o modulación de numerosos procesos fisiológicos, localizada en diferentes áreas cerebrales, está implicada en funciones de control motor, control respiratorio y cardiovascular, procesamiento de información sensorial, funciones autónomas, reproducción, respuestas al estrés o control endocrino. La dopamina se sintetiza a partir del aminoácido semiesencial L-tirosina, que puede proceder de la dieta o de la transformación del aminoácido fenilalanina en el hígado. Llega al cerebro desde la circulación sanguínea pasando

la barrera hematoencefálica mediante un transportador específico de aminoácidos neutros.

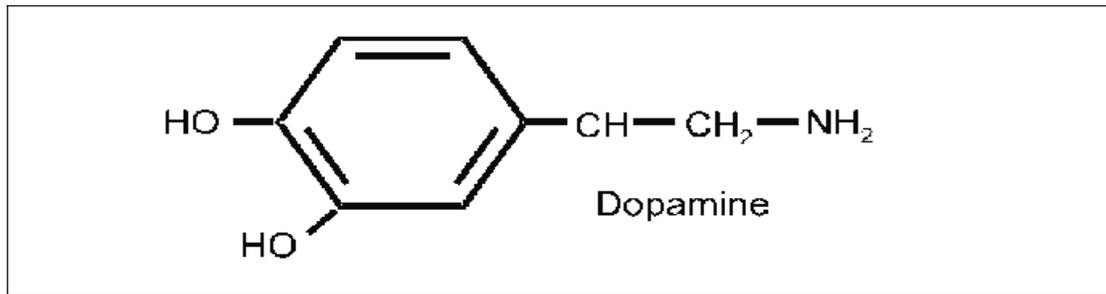


Figura 2. Estructura química de la Dopamina

2.2 Potencial de las monoaminas para participar en la recuperación motora después de una lesión

Hay estudios que muestran que la serotonina está asociada no solo a regeneración neurítica sino a recuperación funcional motora. Se ha reportado, que la actividad constitutiva del receptor de serotonina 2C aumenta la excitabilidad de las neuronas caudales en una lesión espinal en ratas, lo que finalmente lleva a una recuperación de funciones motoras (Fouad, Rango, Vavrek, Murray, Sanelli y Bennett, 2010).

También otros experimentos han demostrado la importancia del sistema serotoninérgico en la recuperación de la motricidad luego de una lesión medular. La aplicación de 5 HT en la médula espinal, su precursor 5 – Hidroxitriptofano o agonistas de los receptores serotoninérgicos activan los circuitos motores locales con lesión espinal a nivel de la vértebra torácica número 13, esta activación causa una mejor recuperación de la locomoción de estos animales (Brusteiny Rossignol, 1998). Además, la serotonina puede propiciar la regeneración neuronal ya que permite la entrada de calcio por medio de su receptor tipo 3, y de esta manera induce el crecimiento neurítico (Homma, Kitamura, Ogawa y Oka 2006).

La dopamina es otro neurotransmisor que tiene un papel fundamental en el movimiento, como se ve en la enfermedad de Parkinson, un trastorno que afecta la motricidad, donde se presenta escasez y lentitud de movimientos, aumento del

tono muscular (rigidez), rostro inexpresivo y un temblor característico y un equilibrio inestable, aquí las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra del SNC degeneran, lo que trae como consecuencia un déficit de dopamina en diversas áreas (Langston, Irwin y Ricaurte, 1987).

En 2004, Höglinger y sus colaboradores por medio de diversos experimentos en roedores observaron una disminución en la tasa de proliferación celular de la zona subventricular y del giro dentado del hipocampo cuando se inducían una baja de dopamina al administrar intracerebralmente 6-hidroxidopamina (6OHDA), lo cual correlaciona con lo encontrado postmortem en cerebros de personas con Parkinson donde estaba disminuida la proliferación celular en la zona subventricular y el número de células progenitoras neuronales en el bulbo olfatorio y el giro dentado. Lo anterior sugiere que la dopamina es uno de los factores que regulan la neurogénesis en el cerebro adulto de mamíferos, incluido el humano.

CAPÍTULO III: Estudio de los invertebrados en la regeneración

3.1 Estudios de regeneración en organismos invertebrados

Para comprender aún más el proceso de regeneración del SNC se han estudiado animales invertebrados con capacidad de regeneración espontánea de su SNC después de una lesión. Las sanguijuelas ofrecen algunas ventajas útiles para este propósito. Del SNC de estos animales se tiene bastante información como son: la ubicación de las neuronas en los ganglios de su SNC, la morfología y la actividad eléctrica de las neuronas motrices y sensoriales, así como sus conexiones en el SNC (Muller y Carboneto, 1971).

Lo anterior permite abordar el problema de regeneración neurítica con técnicas actuales a diversos niveles (De Miguel, Muller, Adams y Nicholls, 2002) además, morfológicamente la microglía de estos anélidos es parecida a la de mamíferos (Coggeshall and Fawcett, 1964; Elliott and Muller, 1981) y este tipo de células gliales tiene un papel fundamental en la regeneración neurítica ocurrida en sanguijuelas por lo que se estima que si se controla experimentalmente ciertos factores como la expresión de moléculas como la laminina puede tener efectos

parecidos en sus homólogos mamíferos (VonBernhardi y Muller, 1995). Otra de las ventajas de utilizar a estos animales, es que están bien descritas las conductas realizadas por sanguijuelas y se tiene conocimiento de los circuitos neuronales que las generan. En 2005, Kristan, Calabrese y Friesen reportaron los circuitos neuronales que originan seis conductas de estos animales, tal como: latidos del corazón, natación, flexión local, acortamiento, arrastre y la alimentación.

3.2 Regeneración neurítica y recuperación funcional motora en sanguijuelas

Al cortarse los axones de un segmento del SNC en la sanguijuela, las partes anterior y posterior del cuerpo se desconectan y los movimientos rítmicos de natación se ven afectados, ya que no se extienden desde la cabeza hasta la cola. Sin embargo, después de algunas semanas, se produce la regeneración y la sanguijuela vuelve a nadar normalmente (Nicholls 1987, citado en Mladinic, Muller y Nichols, 2009). Estos animales responden experimentalmente a la 5-HT exógena, como es a la adición de ésta al agua, y desencadena la natación en animales que han sido privados de ese neurotransmisor tras la inyección de 5, 7-dihidroxitriptamina (Glover y Cramer, 1982). Experimentalmente se ha visto que la adición de serotonina a cultivos de células específicas de sanguijuela genera regeneración neurítica, como es el caso de las neuronas AL1 en ganglios del SNC de la sanguijuela *Haementeria officinalis*, las cuales incrementan la longitud su crecimiento, así como su ramificación y el número de neuritas primarias (Vargas et al., 2019).

Método

4.1 Planteamiento del problema

La incapacidad de regeneración espontánea del Sistema Nervioso Central después de una lesión en vertebrados superiores (incluido el del ser humano) supone un gran reto, ya que aquí no solamente se aprecia un daño estructural sino también la pérdida de diversas funciones. Clínicamente, las personas con lesiones en el SNC pueden quedar con una grave afectación lo cual representa

tanto un problema de salud como un problema social y económico en México y en todo el mundo (OMS, 2013; Sampedro, 2013; Pardini, 1998).

La falla en la regeneración neurítica es un problema complejo en el cual intervienen diversos factores (Schwab y Bartholdi, 1996, Horner y Gage, 2000). Entre ellos, se ha estudiado los neurotransmisores monoaminérgicos para la inducción de regeneración neurítica y es posible que tengan efectos positivos en la recuperación de funciones motrices perdidas después de una lesión en el SNC (Spencer, Klumperman y Syed, 1998; De Miguel y Trueta, 2004; Fouad, Rango, Vavrek, Murray, Sanelliy y Bennett, 2010; Brustein y Rossignol, 1998; Homma, Kitamura, Ogawa y Oka, 2006).

Para este propósito el sistema nervioso de la sanguijuela permite abordar la explicación del funcionamiento neuronal por su simplicidad anatómica y su semejanza funcional al resto de los animales, por citar un ejemplo, las células de la microglía de sanguijuelas son muy parecidas a las encontradas en mamíferos de acuerdo con (VonBernhardi y Muller, 1995). Este animal posee un alto grado de capacidad de regeneración neurítica a nivel de SNC lo que también le permite volver a moverse normalmente después de una lesión (Nicholls, 1987 citado en Mladinic, Muller y Nichols, 2009).

4.2 Pregunta de investigación

¿La depleción de las monoaminas interferirá en la recuperación funcional motora después de una lesión en el SNC de sanguijuelas *Haementeria officinalis* ?

4.3 Hipótesis

La depleción de monoaminas interferirá con la recuperación funcional motriz después de una lesión del SNC de sanguijuelas *Haementeria officinalis*

4.4 Objetivos

Objetivo general:

Establecer si la depleción de monoaminas induce cambios en el porcentaje total de animales con recuperación funcional motora de las conductas de nado y marcha en sanguijuelas *Haementeria officinalis* con una lesión en SNC.

Objetivos específicos:

- a) Precisar cómo es la motricidad normal en las conductas de nado y marcha en sanguijuelas *Haementeria officinalis*.
- b) Definir cómo se modifican las conductas de nado y marcha tras la lesión del SNC de sanguijuelas *Haementeria officinalis*.
- c) Delimitar si la depleción de monoaminas en sanguijuelas *Haementeria officinalis* modifica la motricidad del nado y marcha, y de qué forma.
- d) Especificar cómo afecta en el porcentaje de animales recuperados la depleción de monoaminas después de una lesión en SNC de sanguijuelas *Haementeria officinalis*
- e) Identificar cómo afecta el porcentaje de animales recuperados la restitución de serotonina (5-HT) después de una lesión en el SNC y la previa depleción de monoaminas en sanguijuelas *Haementeria officinalis*.

4.4 Diseño de estudio

Experimental con muestreo probabilístico aleatorio simple.

4.5 Población y muestra

Población: sanguijuelas *Haementeria officinalis*.

Muestra: 96 sanguijuelas divididas en 5 ensayos o series experimentales. Se hicieron 5 grupos de trabajo (control, reserpina, lesión, lesión-reserpina y lesión-reserpina-serotonina; tabla 1).

4.7 Variables

Variables independientes

Lesión en el sistema nervioso central

Definición conceptual: daño en los tejidos neurales del SNC lo que lleva a que la función motriz se pierda cuando se interrumpen las conexiones neuríticas.

Definición operacional: obturación mecánica por medio de hacer presión con pinzas en el nervio conectivo entre el ganglio 7 y 8 de sanguijuelas *Haementeria officinalis*. Haciendo, de este modo, que los axones se separen, pero se conserve la vaina que los envuelve.

Vaciamiento de monoaminas.

Definición Conceptual: impedir el almacenamiento de monoaminas en vesículas sinápticas, por lo que no se liberan a la hendidura sináptica e imposibilitando su uso en la sinapsis neuronal

Definición Operacional: Disminución del contenido de monoaminas por inyección intracorporal de reserpina 50 mg/g de peso entre los ganglios 9 y 10 de sanguijuelas *Haementeria officinalis*.

Restitución de serotonina.

Definición conceptual: introducción al organismo de serotonina después de haber vaciado el sistema de la sanguijuela de este neurotransmisor.

Definición operacional: incremento en contenido de serotonina por la incubación de sanguijuelas *Haementeria officinalis* en solución de 5-HT una hora diaria por 30 días.

Variable dependiente

Recuperación motriz.

Definición conceptual: vuelta al estado anterior de la lesión en cuanto a funciones de movimiento.

Definición operacional: presencia de nado al menos una vez con onda sincrónica, presencia de nado asincrónico o parcial; y presencia de al menos una serie de marcha en sanguijuelas *Haementeria officinalis*.

4.8 Procedimientos

I. Mantenimiento de los organismos: se usaron organismos invertebrados del *Phylum* de los anélidos: *Haementeria officinalis*, sanguijuela mexicana de la colonia de animales del Laboratorio de Regeneración Neuronal (INR) y originalmente obtenidos de lagos y presas de la meseta central de México. Los organismos se mantuvieron en recipientes herméticos individuales una sanguijuela en cada recipiente durante los 30 días de registro; el agua es potable y se cambió cada 3 días, manteniendo los sujetos experimentales a temperatura ambiente.

II. Grupos de trabajo: se establecieron 5 series experimentales, la siguiente tabla (tabla 1) especifica los organismos usados en cada grupo.

GRUPO SERIE	CONTROL	LESIÓN	RESERPINA	LESIÓN+ RESERPINA	LESIÓN+ RESERPINA + 5 HT
Serie experimental 1	3	3	3	3	3
Serie experimental 2	3	3	3	3	3
Serie experimental 3		6		6	6
Serie experimental 4		6		6	6
Serie experimental 5	6	6	6	6	6

Tabla 1. Cantidad de sanguijuelas usadas por grupo de trabajo y serie experimental.

- a) **Control:** se mantuvieron a los organismos en los recipientes sin ningún tratamiento.
- b) **Lesión:** a los organismos se les anestesió en etanol al 9% durante 20 minutos y luego con ayuda de alfileres se les fijó en un plato con cera, donde se les hizo una incisión ventral en la piel dejando expuesto su nervio

conectivo; se lesionó con pinzas por medio de compresiones el segmento comprendido entre el ganglio 7 y 8 (figura 3 y 4 A-D) se eligió esta zona por dos razones: a) la primera anatómica y metodológica ya que ésta es la zona intermedia entre el ganglio que controla el aparato reproductor del animal (ganglios 5 y 6), que se encuentra anteriormente, mientras que posteriormente, se hallan los ciegos del aparato digestivo altamente vascularizados; así, es mejor evitar ambas estructuras anatómicas ya que ocasionaría fallas en sistemas más allá de los puramente motores; b) una ventaja anexa de elegir esta zona es por fines prácticos ya que al encontrarse este sitio aproximadamente a la mitad del cuerpo del animal los efectos de la lesión son fácilmente visibles. Con las compresiones aplicadas, los axones a lo largo del cordón nervioso se obturaron, pero la vaina del nervio conectivo no se separó. Luego se registró en video el desarrollo de su movilidad.

- c) Reserpina:** a las sanguijuelas se les inyectó 50 microgramos de reserpina por cada gramo de peso, lo que causó la depleción de monoaminas en el sistema del animal y se tomó registros en video de su movilidad (figura 2 F).
- d) Lesión +Reserpina:** a los animales se les anestesió en etanol al 9% después se les inyectó 50 microgramos/g de peso de reserpina, y se les hizo una incisión ventral dejando expuesto su nervio conectivo para así lesionarlo con pinzas y luego se tomó registros en video de su movilidad.
- e) Lesión +Reserpina +Serotonina:** a las sanguijuelas se les anestesió en etanol al 9% después se les inyectó 50mg/g de peso de reserpina, y se les hizo una incisión ventral dejando expuesto su nervio conectivo para así lesionarlo con pinzas; después se incubó a los organismos en 500 microlitros de solución de serotonina (0.4mg/ml) en recipientes herméticos de 2 ml de volumen durante una hora diaria para restituir este neurotransmisor a su SNC y se tomó registros en video de su movilidad.

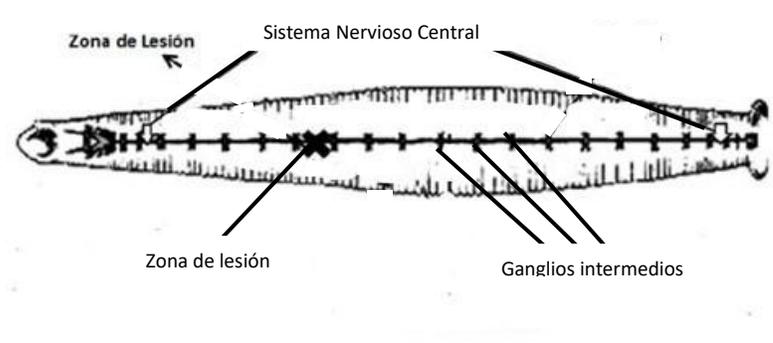


Figura 3. El Sistema Nervioso Central de la sanguijuela. Éste cuenta con 31 ganglios unidos por el nervio conectivo; 4 están fusionados en la cabeza o región anterior (lado izquierdo), 21 ganglios intermedios y 7 están fusionados en la cola o región posterior (lado derecho). La lesión se efectuó entre los ganglios intermedios números 7 y 8, en el nervio conectivo (cruz negra).

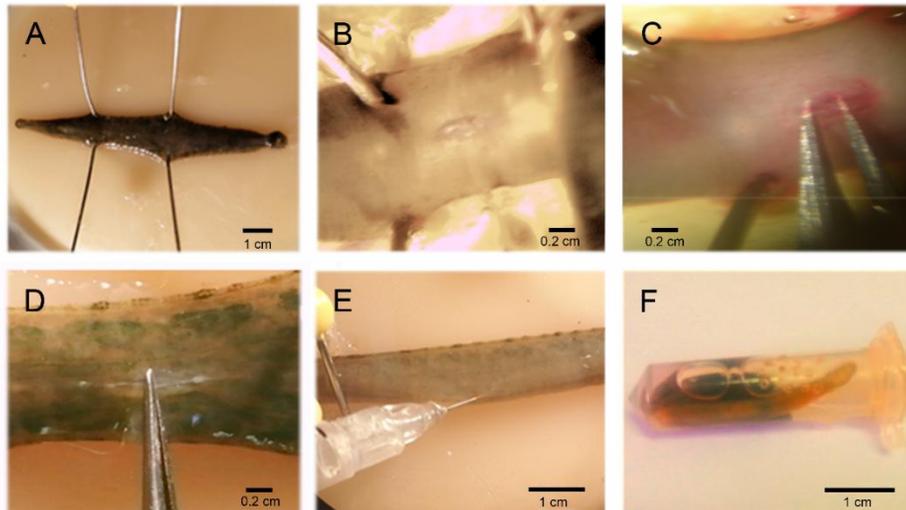


Figura 4. Métodos. **A.** Se fijó la sanguijuela con alfileres a una cama de cera, previa anestesia. **B.** Se hace una incisión ventral en la piel que deje descubierto el nervio conectivo. **C.** Se expone el nervio conectivo con ayuda de pinzas. **D.** Se hizo presión con las pinzas, obturando el nervio conectivo. **E.** Se inyectó el fármaco Reserpina que causa la depleción de monoaminas. **F.** En ciertos grupos se incubó en una solución de serotonina a los organismos.

Referencia de la figura: Vargas y Vargas 2022. *Bio Jour Sci & Tech Res.* DOI: 10.26717/BJSTR.2022.44.006999

III. **Registro conductual:** se registraron con grabaciones en video las conductas motrices. Cada día durante 30 días después de la lesión. De estos videos se seleccionaron imágenes indicativas de cada conducta estudiada. En cada serie experimental de 18 organismos se formaron al azar los grupos: control, lesión, reserpina, lesión + reserpina y lesión + reserpina + serotonina. Cada uno de los organismos se mantuvo aislado en un recipiente de vidrio rectangular (con 22.4 cm de largo, 12.7 cm de ancho y 14.8 cm de profundidad) con 1 L agua potable y etiquetado con sus datos de identificación. Antes de aplicar los tratamientos farmacológicos se registró la conducta motriz de los organismos, los registros se hicieron diariamente a las 12 h del día durante 30 días.

La conducta o recuperación motriz se observó de tres formas:

- a) **Presencia o ausencia de nado:** es el desplazamiento en el agua formando ondas senoidales de la cabeza a la cola.
- b) **Presencia o ausencia de nado parcial:** es el movimiento de la sanguijuela hecho en el agua que consiste en formar una onda senoidal del punto de la lesión a la cola.
- c) **Presencia o ausencia de marcha:** desplazamiento en el fondo o en las paredes de los contenedores. En este movimiento se ven implicadas las ventosas del organismo (presentes en la cabeza y la cola) y puede iniciarse con dos tipos diferentes de secuencias, pero siempre se requerirá que mínimo la ventosa trasera se encuentre pegada en un inicio a una de las paredes del recipiente. Cualquiera de estas dos secuencias se tomará como movimiento de marcha (la realización de una secuencia completa de marcha ya sea tipo A o tipo B se tomará como positivo a la presencia de esta conducta).

a. **Secuencia de inicio de marcha tipo a:** con la ventosa de la cola fijada al fondo, extender la parte anterior del cuerpo hacia adelante o hacia un lado, fijar la ventosa de la cabeza al fondo, soltar la ventosa de la cola, contraer el cuerpo haciendo un

movimiento de acordeón y fijar la nuevamente la ventosa posterior cerca de la ventosa de la cabeza.

b. Secuencia de inicio de marcha tipo b: con la ventosa trasera y la delantera pegadas se despegan la ventosa trasera, se contrae el cuerpo en forma de acordeón y desplaza la ventosa trasera a una posición más cercana a la ventosa delantera y luego despegan la ventosa delantera

La marcha y el nado de la sanguijuela son conductas que involucran el sistema motor y por ende la actividad muscular, en forma de contracción de los anillos transversales y longitudinales a todo lo largo del animal y también (en el caso de la macha) el uso de ambas ventosas. Es por lo que, para la realización de estos comportamientos, se requiere que los impulsos nerviosos que los coordinan viajen a lo largo del nervio conectivo; es así que, tanto el nado como la marcha, son adecuados para un experimento que involucre una lesión del SNC y su recuperación funcional, decir, nos son de utilidad por sus rutas neuronales de funcionamiento y además por la viabilidad de registro.

Existen otros posibles indicadores como la velocidad del nado y la marcha (distancia y tiempo) que no es posible que sean usados como guías para la recuperación funcional ya que se ven modificados con la inyección de reserpina

En la siguiente figurase explica las acciones realizadas en cada grupo.

CONTROL	LESIÓN	RESERPINA	LESIÓN+RESERPINA	LESIÓN+ RESERPINA+ SEROTONINA
	 Anestesiarse en sol. de etanol  Hacer incisión ventral y obturación de nervio conectivo	 Anestesiarse en sol. de etanol  Inyectar reserpina	 Anestesiarse en sol. de etanol  Inyectar reserpina  Hacer incisión ventral y obturación de nervio conectivo	 Anestesiarse en sol. De etanol  Inyectar reserpina  Hacer incisión ventral y obturación de nervio conectivo  Diariamente poner a incubar la sanguijuela con sol. de serotonina

Figura 5. Grupos de trabajo. El Grupo control contiene organismos a los que no se les aplicó ningún tratamiento experimental. Cada grupo de trabajo se ilustra con viñetas para su mejor comprensión

4.9 Análisis estadístico

1. Se hizo un registro de presencia (SI) o ausencia (NO) de las conductas: nado y marcha.
2. Se obtuvo la frecuencia de nado y marcha, y el porcentaje de animales recuperados a los días 2, 7 y 21 para cada conducta en cada uno de los grupos de cada serie experimental y la media del porcentaje de cada conducta y el error estándar de las 5 series para el grupo correspondiente.

A continuación, se muestra un ejemplo del procedimiento suponiendo datos para el día 7

a) Se obtiene el total de animales que presentan la conducta (en este ejemplo se utiliza la conducta de nado).

GRUPO	CONTROL		LESIÓN		RESERPINA		LESIÓN+ RESERPINA		LESIÓN+ RESERPINA + 5 HT	
	Total de sujetos	Total animales que nadan	Total de sujetos	Total animales que nadan	Total de sujetos	Total animales que nadan	Total de sujetos	Total animales que nadan	Total de sujetos	Total animales que nadan
S.1	6	6	6	5	6	6	6	3		
S.2	6	6	6	6	6	5	6	2		
S.3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	2
S.4	3	3	3	2	3	3	3	0	3	2
S.5			6	5			6	1	6	3

Tabla 2. Ejemplo de tabla con el total de animales y aquellos que realizan la conducta. s: serie experimental.

b) Se obtiene el porcentaje de recuperación de cada conducta (en este caso la conducta de nado).

GRUP SERIE	CONTROL			LESIÓN			RESERPINA			LESIÓN+ RESERPINA			LESIÓN+ RESERPINA + 5 HT		
	Total	Nado	%	Total	Nado	%	Total	Nado	%	Total	Nado	%	Total	Nado	%
S.1	6	6	100%	6	5	83.3%	6	6	100%	6	3	50%			
S.2	6	6	100%	6	6	100%	6	5	83.3%	6	2	33.3%			
S.3	3	3	100%	3	3	100%	3	3	100%	3	1	33.3%	3	2	66.6%
S.4	3	3	100%	3	2	66.6%	3	3	100%	3	0	0%	3	2	66.6%
S.5				6	5	83.3%				6	1	16.6%	6	3	50%

Tabla 3. Ejemplo de tabla con porcentajes de recuperación. En la tabla se muestra el total de sanguijuelas de cada grupo de trabajo, la cantidad de animales que realizaron y la conducta y esa cantidad qué porcentaje representa del total de animales.

s: serie experimenta

c) Se promediaron los porcentajes de cada grupo sumando las series correspondientes. Es decir, para obtener el porcentaje promedio del grupo de Lesión se sumaron $83.3+100+100+66+83.3$ y el resultado se dividió entre 5; mientras que para obtener el promedio del grupo Lesión+reserpina+5HT se sumó $66.6 + 66.6+50$ y el resultado se dividió entre 3.

Este mismo procedimiento se siguió con cada uno de los 5 grupos. El cuadro de porcentajes promedio por grupo para este ejemplo (en la conducta de nado al día 7 sería el siguiente.

	CONTROL	LESIÓN	RESERPINA	LESIÓN+ RESERPINA	LESIÓN+ RESERPINA + 5HT
PORCENTAJE PROMEDIO	100	76.58	95.82	26.64	61

Tabla 4. Ejemplo de porcentajes promedio de recuperación motora

Cada porcentaje de la tabla se obtuvo promediando los porcentajes de las 5 series experimentales (s.1, s.2, s.3, s.4, s.5) de cada grupo de trabajo (control, lesión, reserpina, lesión + reserpina, lesión+reserpina+5-HT). Sin embargo, en los experimentos este trabajo, en los grupos control no hubo modificación de las conductas de nado; y en el grupo reserpina, la inyección de este fármaco, no modificó la presencia de las conductas de nado y marcha respecto al grupo control. El 100% de los animales control e inyectados con reserpina no modificaron la presencia de estas conductas.

Para el análisis de los datos, se registró para cada animal si tenía o no tenía la formación de por lo menos una onda sincrónica en la conducta de nado o la realización de por lo menos una serie de movimientos de marcha. Luego se obtuvo los porcentajes de recuperación para cada grupo. Con los porcentajes de

recuperación se reportaron como valor promedio \pm error estándar. El nivel de significancia entre los valores promedio de los grupos se estableció en 95% acorde a la prueba t-student no pareada. Los cálculos se realizaron con el programa Sigma Plot2001 (SystatSoftware Inc., USA). Con esta prueba se contrastaron los grupos: Lesión contra Lesión+Reserpina y Lesión contra Lesión+Reserpina+5HT; también se contrastó el grupo Lesión+Reserpina contra el grupo Lesión+Reserpina +5HT. Este procedimiento se realizó en las conductas de nado y marcha.

Las tablas de datos muestran los porcentajes de recuperación en los días 2, 7 y 21 ya que son días representativos del efecto de la lesión y la recuperación de las conductas de nado y marcha; los cuáles fueron determinados previamente mediante experimentos realizados en el laboratorio de Regeneración Neuronal. Al día 2 se observa perfectamente la desincronía en el movimiento de las sanguijuelas: del punto de lesión a la cabeza hay movimiento mientras que del punto de lesión a la cola el animal está completamente inmovilizado. En el día 7 gran parte de los organismos lesionados se han recuperaron. Por último, se decidió hacer un último análisis al día 21 para analizar la recuperación después de 3 semanas de la lesión.

Resultados

1.- Nado y marcha normal de organismos sanos.

La motricidad normal de la conducta de nado las sanguijuelas es el nado sincrónico; donde estos animales dibujan una onda senoidal al nadar, que se extiende de la cabeza a la cola; se observa que la sanguijuela forma una S en este tipo de conducta (figura 6, figura 7A; figura 8A).

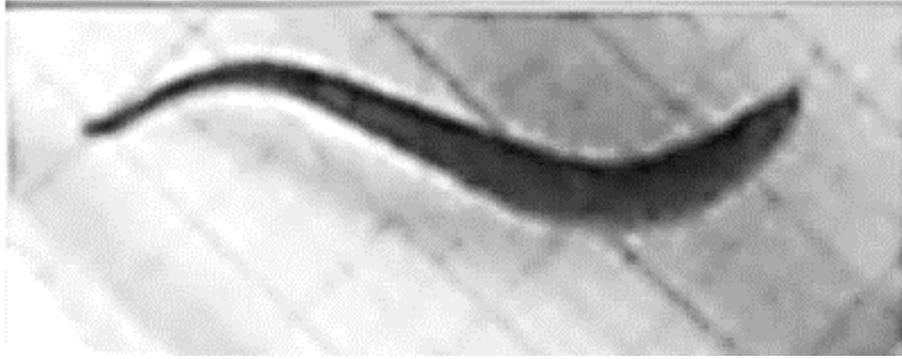


Figura 6. Nado sincrónico de una sanguijuela. La sanguijuela realiza la conducta de nado al dibujar una onda senoidal sincrónica de la cabeza a la cola. La cabeza está ubicada a la izquierda de la imagen y la sanguijuela tiene una longitud de 10 cm.

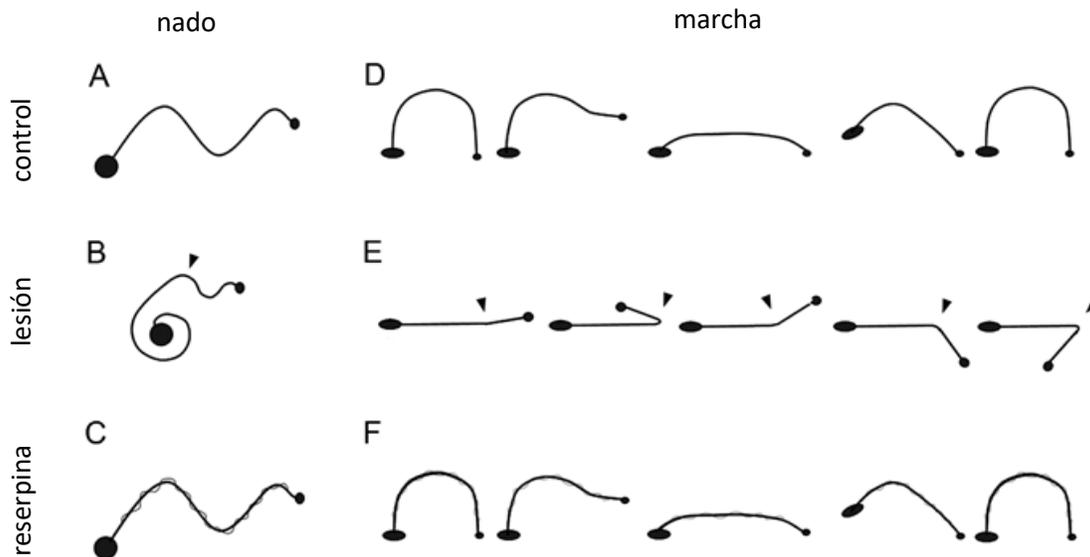


Figura 7. Diagrama de las conductas de nado y marcha de sanguijuelas sanas, lesionadas y con inyección de reserpina. **A**, cuando nadan ellas forman una onda senoidal continua de la cabeza (círculo pequeño) a la cola (círculo grande). **B**, en sanguijuelas lesionadas, el nado senoidal se origina de la cabeza al punto de lesión, mientras el resto del cuerpo permanece contraído. **D**, cuando se efectúa la conducta de marcha, despegar la ventosa anterior, extiende el cuerpo, adhiere la ventosa anterior al substrato, despegar la ventosa posterior, contrae el cuerpo y adhiere la ventosa posterior. **E**, durante la marcha la porción anterior del animal se mueve de la cabeza al sitio de la lesión pero de manera independiente al resto del

cuerpo. **C, F**, la inyección de reserpina no tiene efecto en la presencia de estas conductas.

Referencia de la figura: Vargas y Vargas 2022. *Bio Jour Sci & Tech Res*.DOI: 10.26717/BJSTR.2022.44.006999

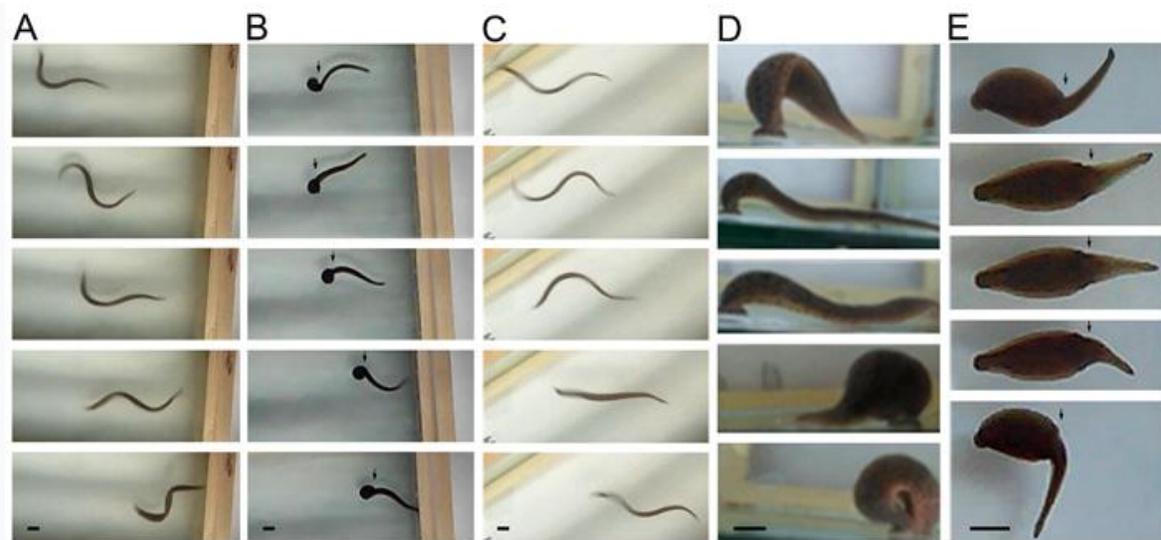


Figura 8. Series de movimiento de la sanguijuela sana y lesionada. A, mientras nadan, los animales forman ondas senoidales de la cabeza (derecha de la imagen) a la cola (izquierda de la imagen). B, la lesión del sistema nervioso central (SNC) provocó la pérdida de la continuidad de la onda senoidal, que se originó en la cabeza hasta el área de la lesión (punta de flecha).C, una semana después, se recuperan las habilidades de natación, formando ondas senoidales completas desde la cabeza hasta la cola. D, en la deambulacion, la ventosa posterior está adherida (derecha en las imágenes), el cuerpo del animal se extiende y la ventosa anterior se adhiere al sustrato; el cuerpo del animal se contrae, y la ventosa posterior se suelta y vuelve a adherirse cerca de la ventosa anterior. Este es un movimiento continuo que permite el desplazamiento del animal sobre el sustrato. E, la lesión del sistema nervioso provoca asincronía de movimientos en el cuerpo anterior y caudal a la lesión. Mientras que la parte posterior de la ventosa se adhiere al sustrato, la porción anterior se mueve independientemente del área de la lesión (flecha). **Referencia de la figura:** Vargas y Vargas 2022. *Bio Jour Sci & Tech Res*.DOI: 10.26717/BJSTR.2022.44.006999

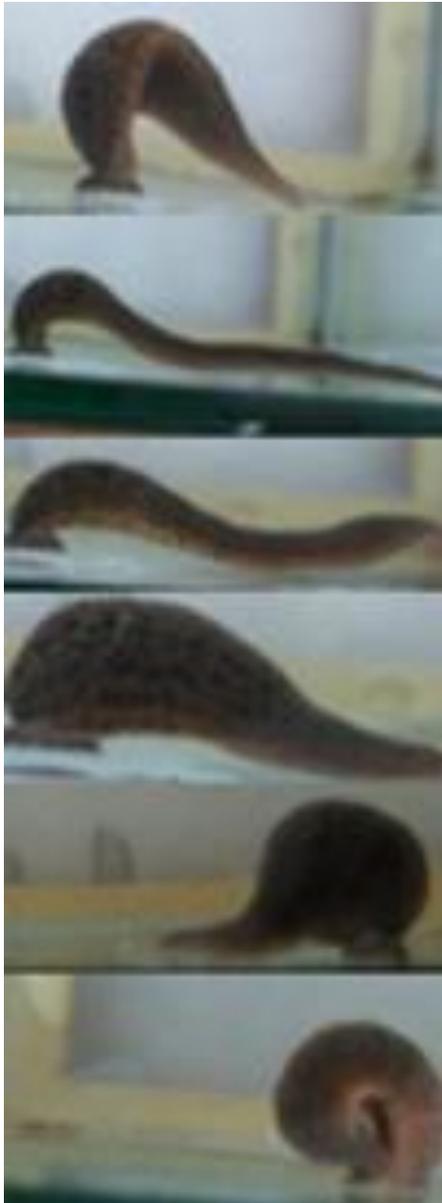


Figura 9. Serie de movimientos involucrados en la marcha. La marcha es una conducta compleja, donde la ventosa trasera inicia pegada al sustrato, (lado izquierdo de la imagen A) la ventosa delantera se despega y el organismo se extiende hacia al frente (B) y pega la ventosa delantera al sustrato (C-D). Despega la ventosa trasera y contrae la parte media del cuerpo (E) y pega la ventosa trasera junto a la delantera (F). Estos movimientos se repiten de manera cíclica durante la conducta de marcha.

Referencia de la figura: Vargas y Vargas 2022. *Bio Jour Sci & Tech Res.* DOI:

10.26717/BJSTR.2022.44.006999

Por otro lado, la marcha es una conducta compleja compuesta por una serie de movimientos rítmicos que de forma general empiezan con la ventosa trasera pegada al sustrato y la delantera despegada del mismo; la sección anterior del cuerpo se extiende hacia adelante y la ventosa delantera se fija al piso; después, la parte media del cuerpo de la sanguijuela se contrae en forma de acordeón y se despega la ventosa trasera para pegarse

cerca a la ventosa delante. Este ciclo de pasos se suele repetir en la marcha normal (figura 9, figura 7D).

2. Nado y marcha en animales lesionados.

Tanto el nado como la marcha se modifican después de una lesión en SNC; los animales pasan de perder toda movilidad justo después de la lesión a tener solo movimiento de la cabeza al punto de lesión por lo que cuando intentan nadar solamente logran un nado incompleto o parcial (Figura 7B y figura 8B); y en caso de la marcha, ésta no se logra porque el organismo no coordina sus movimientos.

La parte corporal anterior a la lesión se mueve independientemente a la parte posterior (figura 7E y figura 8E).

Al día 2 los animales lesionados se mueven desincronicamente al intentar nadar (Figura 10) y realizar la conducta de marchar; pues solo tienen movilidad del punto de la lesión hacia a la ventosa delantera, mientras la parte posterior carece de movimiento sincronizado. Al día 7 la mayoría de las sanguijuelas nada de nuevo sincrónicamente ($63.33\% \pm 13.33$, tabla 6, figura 12) y también la mayoría han recuperado la conducta marcha ($79.99\% \pm 13.33$, tabla 9, Figura 14).

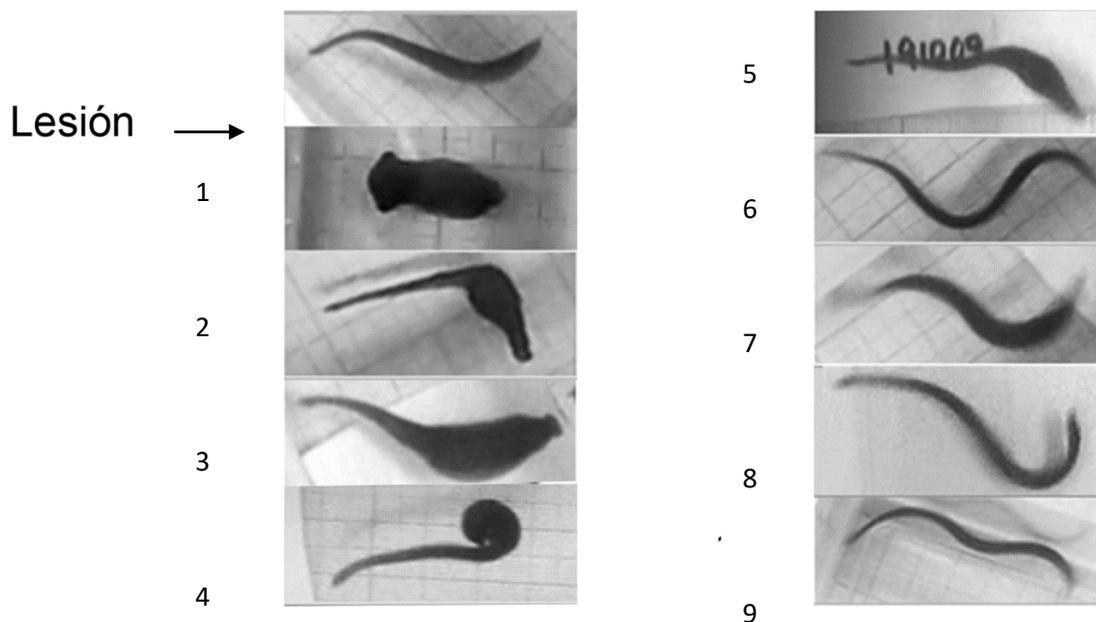


Figura 10. Imagen de la recuperación del nado sincrónico después una lesión en SNC. En el día cero antes de la lesión del SNC, los animales se encuentran sanos y forman una onda senoidal continua y sincrónica de la cabeza a la cola. Después de la lesión los animales permanecen inmóviles por alrededor de 24 h (día 1). Los animales se mueven asincrónicamente desde el sitio de la lesión (día 2). Cuando nadan, ondas senoidales son generadas de la cabeza al sitio de la lesión y el resto del cuerpo es arrastrado sin formar ondas senoidales. En el día 7, la mayoría de los animales lesionados han recuperado la habilidad de nadar formando ondas continuas de la cabeza a la cola. En el día 21 los animales conservan la habilidad de nadar (imagen no mostrada). Las conductas de los días 2, 7 y 21 fueron usadas para el análisis de datos. Referencia de la figura: Vargas y Vargas 2022. *Bio Jour Sci & Tech Res*.DOI: 10.26717/BJSTR.2022.44.006999

3.- Efecto de la reserpina en el nado y la conducta de marcha en animales tratados

La inyección de reserpina en sanguijuelas no tuvo efectos en la sincronía del nado 83.33 ± 9.62 $p=0.42$ vs control (tabla 6, figura 12) y tampoco fue significativa la comparación respecto al grupo de lesión $63.33\% \pm 13.33$ $p= 0.69$; además, se caracterizó porque los bordes del animal fueran ondulados (como hojas de encino, figura 11). En la ejecución de la marcha, la reserpina tampoco modifica el movimiento sincrónico y coordinado con la secuencia de eventos previamente descritos, por lo que éste se lleva a cabo de manera normal $94.44\% \pm 5.55$ $p= 0.49$ vs control (tabla 9, figura 14). Tampoco es significativa la comparación del grupo reserpina vs el grupo lesión $79.99\% \pm 13.33$ en la realización de la marcha $p= 0.57$.

Al día 21, al ser comparadas en la conducta de nado sincrónico, las sanguijuelas tratadas con reserpina $49.99\% \pm 16.66$ vs el grupo de sanguijuelas control no se encontraron diferencias significativas $p=0.09$ y tampoco al compararse el grupo reserpina con el grupo lesión $46.66\% \pm 14.33$ $p=0.30$. En cuanto a la conducta de marcha, al compararse las sanguijuelas tratadas con reserpina 72.22 ± 20.03 vs control las diferencias son no significativas $p= 0.23$ al igual que al compararse el grupo reserpina vs lesión 79.99 ± 16.66 , $p=0.77$.

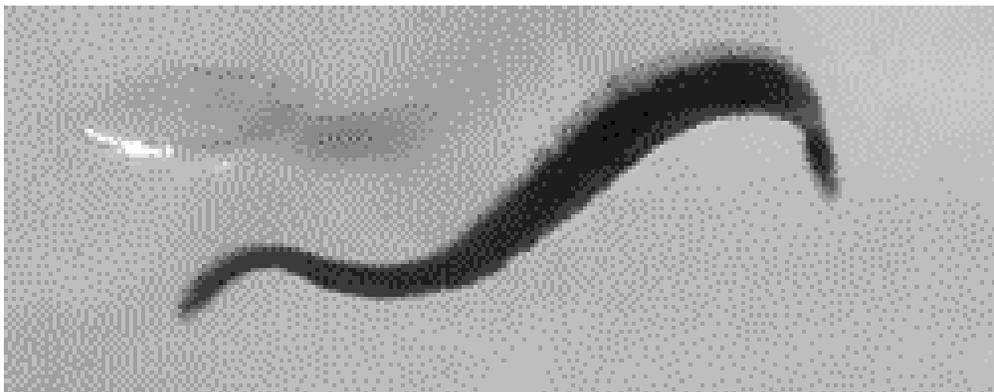


Figura 11. Sanguijuela inyectada con reserpina. El organismo mantiene su movimiento sincrónico de la cabeza a la cola. El efecto de la reserpina es que los bordes del animal se ondulan, como si fuera el borde de una hoja de encino.

4.-Porcentajes de recuperación motriz en los grupos y series de trabajo

a) Porcentaje de recuperación del nado a los días 2, 7 y 21

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTAL	ES
Lesión	0.00%	0.00%	16.66%	0.00%	0.00%	3.33%	±3.33
Lesión +Reserpina	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	±0
Lesión + reserpina + serotonina	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	16.66%	3.33%	±3.33
Control	100.00%	100.00%			100%	100%	±0.00
Reserpina	100.00%	100.00%			83.33%	94.44%	±5.55

Tabla 5. Porcentajes de recuperación de nado al día 2, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTAL
Lesión	0 de 3	0 de 3	1-6	0 de 6	0 de 6	1 de 24
Lesión +Reserpina	0 de 3	0 de 3	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 24
Lesión + reserpina + serotonina	0 de 3	0 de 3	0 de 6	0 de 6	1 de 6	1 de 24
Control	3 de 3	3 de 3			6 de 6	12 de 12
Reserpina	3 de 3	3 de 3			5 de 6	11 de 12

Tabla 6. Número de animales que recuperaron el nado al día 2, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTALES	ES
Lesión	66.66%	33.33%	100.00%	33.33%	83.33%	63.33%	±13.33
Lesión +Reserpina	0.00%	33.33%	33.33%	0.00%	0.00%	13.33%	±8.16
Lesión +Reserpina + Serotonina	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	16.66%	3.33.00%	±3.33
Control	100.00%	100.00%			100%	100	±0.00
Reserpina	66.66%	100%			83.33%	83.33	±9.62

Tabla 7. Porcentajes de recuperación de nado al día 7 de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTAL
Lesión	2 de 3	2 de 3	6-6	2 de 6	5 de 6	17 de 24
Lesión +Reserpina	0 de 3	2 de 3	2 de 6	0 de 6	0 de 6	4 de 24
Lesión + reserpina + serotonina	0 de 3	0 de 3	0 de 6	0 de 6	1 de 6	1 de 24
Control	3 de 3	3 de 3			6 de 6	12 de 12
Reserpina	2 de 3	3 de 3			5 de 6	11 de 12

Tabla 8. Número de animales que recuperaron el nado al día 7, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTALES	ES
Lesión	33.33%	0.00%	83.33%	66.66%	50.00%	46.664	±14.33
Lesión +Reserpina	0.00%	0.00%	66.66%	0.00%	33.33%	19.99%	±13.33
Lesión + Reserpina + Serotonina	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	33.33	6.66%	±6.66
Control	100.00%	100.00%			100%	100%	±0.00
Reserpina	33.33%	66.66%			83.33%	60.99%	±14.61

Tabla 9. Porcentajes de recuperación de nado al día 21 de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTALES
Lesión	1 de 3	0 de 3	5 de 6	4 de 6	5 de 6	15 de 24
Lesión +Reserpina	0 de 3	0 de 3	4 de 6	0 de 6	2 de 6	6 de 24
Lesión + Reserpina + Serotonina	0 de 3	0 de 3	0 de 6	0 de 6	1 de 6	1 de 24
Control	3 de 3	3 de 3			6 de 6	12 de 12
Reserpina	1 de 3	2 de 3			5 de 6	8 de 12

Tabla 10. Número de animales que recuperaron el nado al día 21, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.

b) Porcentaje de recuperación de la marcha a los días 2, 7 y 21

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTALES	ES
Lesión	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	33.33%	6.66%	±6.66
Lesión +Reserpina	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	±0.00
Lesión + reserpina + serotonina	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	16.66%	3.33%	±3.33
Control	100.00%	100.00%			100%	100.00%	±0.00
Reserpina	100.00%	100.00%			83.33%	94.44%	±0

Tabla 11. Porcentajes de recuperación de marcha al día 2 de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTALES
Lesión	0 de 3	0 de 3	0 de 6	0 de 6	2 de 6	2 de 24
Lesión +Reserpina	0 de 3	0 de 3	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 24
Lesión + reserpina + serotonina	0 de 3	0 de 3	0 de 6	0 de 6	1 de 6	1 de 24
Control	3 de 3	3 de 3			6 de 6	12 de 12
Reserpina	3 de 3	3 de 3			5 de 6	11 de 12

Tabla 12. Número de animales que recuperaron la marcha al día 2, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTALES	ES
Lesión	66.66%	100.00%	100.00%	33.33%	100.00%	79.99.%	±13.33
Lesión +Reserpina	0.00%	0%	33.33%	66.66%	66.66%	33.33%	±14.9
Lesión + Reserpina + Serotonina	0.00%	33.33%	100.00%	16.66%	66.66%	37.49%	±21.91
Control	100.00%	100.00%			100%	100.00%	±0.00
Reserpina	100.00%	100.00%			83.33%	94.44%	±5.5

Tabla 13. Porcentajes de recuperación de marcha al día 7 de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTALES
Lesión	2 de 3	3 de 3	6 de 6	2 de 6	6 de 6	19 de 24
Lesión +Reserpina	0 de 3	0 de 3	2 de 6	4 de 6	4 de 6	10 de 24
Lesión + Reserpina + Serotonina	0 de 3	1 de 3	6 de 6	1 de 6	2 de 6	10 de 24
Control	3 de 3	3 de 3			6 de 6	12 de 12
Reserpina	3 de 3	3 de 3			5 de 6	11 de 12

Tabla 14. Número de animales que recuperaron la marcha al día 7, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTALES	ES
Lesión	100.00%	100.00%	83.33%	16.66%	100.00%	79.99%	±16.16
Lesión +Reserpina	0.00%	0.00%	50.00%	50.00%	66.66%	33.33%	±13.94
Lesión + Reserpina +Serotonina	33.33%	66.66%	66.66%	0.00%	66.66	46.66%	±13.33
Control	100.00%	100.00%			100%	100.00%	±0.00
Reserpina	33.33%	100.00%			83.33%	72.22%	±20.03

Tabla 15. Porcentajes de recuperación de marcha al día 21 de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTALES
Lesión	3 de 3	3 de 3	5 de 6	1 de 6	6 de 6	18 de 24
Lesión +Reserpina	0 de 3	0 de 3	3 de 6	3 de 6	4 de 6	10 de 24
Lesión + Reserpina +Serotonina	1 de 3	2 de 3	4 de 6	0 de 6	2 de 6	9 de 24
Control	3 de 3	3 de 3			6 de 6	12 de 12
Reserpina	1 de 3	3 de 3			5 de 6	9 de 12

Tabla 16. Número de animales que recuperaron la marcha al día 21, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.

5.-Efecto del vaciado de neurotransmisores monoaminérgicos en el porcentaje de recuperación del nado y la marcha en animales lesionados.

El vaciado de monoaminas provoca que los efectos de la lesión en el SNC en el nado y la marcha duren más tiempo, por lo que al día 7 el porcentaje de recuperación del nado en sanguijuelas inyectadas con reserpina y lesionadas es $13.33\% \pm 8.16$, decreciendo en comparación con las sanguijuelas lesionadas $63.33\% \pm 8.16$ $p=0.01$ (tabla 11, figura 12). En la conducta de marcha, El vaciado de monoaminas con la inyección de reserpina indujo que la recuperación fuera al día 7 el porcentaje de $33.33\% \pm 14.9$ por lo que también decreció en comparación con animales exclusivamente lesionados $p=0.04$ (tabla 11, figura 14).

Al día 21 el porcentaje de recuperación del nado de animales lesionados fue de $46.66\% \pm 14.33$ pero con el vaciado las monoaminas fue de $19.99\% \pm 13$ ($p=0.21$). La recuperación de la marcha fue de $79.99\% \pm 16.66$ mientras que al vaciarse las monoaminas la recuperación fue de $33.33\% \pm 13.94$ ($p=0.6$).

6.- Efecto de la restitución aguda de serotonina en animales lesionados y sin neurotransmisores monoaminérgicos al día.

Al día 2 no se observó ningún efecto de la restitución de serotonina y la mayoría de los animales se encontró inmovilizada por la lesión (tabla 11). Al día 7, la restitución de serotonina de manera aguda no tuvo efecto en el porcentaje de recuperación la recuperación del nado sincrónico en animales lesionados y sin monoaminas ($3.33\% \pm 3.33$) porque, comparado con el grupo lesión, comparado con el grupo LR su significancia fue de $p= 0.28$ (tabla 11, figura 12), aunque tuvo una significancia de $p= 0.002$. La restitución de serotonina tampoco tuvo efecto en la recuperación de la marcha de sanguijuelas (37.49 ± 21.91). Cuando se comparó el grupo lesión, reserpina, serotonina contra el grupo lesión reserpina no existieron diferencias significativas ($p= 0.087$, tabla 11, figura 14).

Al día 21 el porcentaje de recuperación del nado fue de 46.66 ± 14.33 y que el vaciado de monoaminas y restitución de serotonina produjo un porcentaje de recuperación de 6.66 ± 6.66 ($p=0.035$) mientras que la comparación entre el grupo LR 19.99 ± 13.33 y LRS fue $p=0.50$. En cuanto a la conducta de macha el porcentaje de recuperación del grupo LRS fue de $46.66\% \pm 13.33$ y al compararlo contra el grupo lesión ($79.99\% \pm 16.66$) se obtuvo $p=0.15$. Por otro lado, al comparar el grupo LRS vs el grupo LR ($33.33\% \pm 13.94$) se encontró que no hay diferencias entre los grupos ($p=0.50$).

		DÍA 2	DÍA 7	DÍA 21
Nado sincrónico	Lesión	3.33+-3.33 n= 5	63.33+-13.33 n = 5	46.66+- 14.33 n=5
	L+R	0+-0 n= 5	13.33+-8.16 n=5 (p=0.01)	19.99+- 13.33 n=5 (p=0.21)
	L+R+S	3.33+-3.33 n= 5	3.33+-3.33 n= 5 (p= 0.002) LRvsLRS p=0.28	6.66+-6.66 n=5 (p=0.035) LR VS LRS p=0.50
	R	66.66+-33.33 n= 3	83.33+-9.62 n= 3(vs contr 0.15) vs L p= 0.33	83.22 +- 9.62 n=3 (vs control p=0.055)vs L p=.53
Marcha	Lesión	6.66+-6.66 n= 5	79.99+-13.33 n= 5	79.99+-16.16 n= 5
	L+R	0+-0 n= 5	33.33+-14.9 n= 5 p= 0.04	33.33+-13.94 n= 5 (p=0.06)
	L+R+S	3.33+-3.33 n=5	37.49%+-21.91 n= 5 p= 0.12 LRVSLRS p=0.87	46.66+-13.33 n= 5 (p=0.15) LR VS LRS p=0.5
	R	100+-0 n=3	94.44+- 5.55 n= 3 (R vs contr p=0.49) R vs L p=0.57	72.22+-20.03 n= 3 (R vs contr 0.23) R vs L p=0.77

Tabla 17. Porcentajes de recuperación, y valor p de nado sincrónico y marcha a los días 2,7 y 21. En negritas se muestran los valores que presentaron diferencias significativas con respecto al grupo lesionado (L). LRvsLRS: comparación entre los grupos lesión+reserpina y lesión+reserpina+serotonina. R vs contr.: comparación entre los grupos reserpina y control. R vs L: comparación entre los grupos reserpina y lesión.

Estudio de nado parcial en sanguijuelas lesionadas

Dado el potencial de nado de estos organismos, en el que, aun estando lesionados, pudieron nadar, aunque de forma atípica. Se evaluó el nado de organismos lesionados, a lo cual llamó nado parcial y consistió en la generación de ondas senoidales de la cabeza al punto de lesión, mientras el resto del organismo permaneció inmobilizado, ya sea enrollado en sí mismo o extendido sin formar una onda senoidal.

1.- Nado y marcha en animales lesionados.

Al día 2 el $40\% \pm 24.49$ los animales lesionados pudieron nadar parcialmente generando ondas senoidales de la cabeza a la zona de lesión y mostrando su potencial de moverse aun estando recién lesionadas. Al día 7 el $49.99\% \pm 18.25$ de sanguijuelas lesionadas presentaba nado parcial y al día 21 el $53.33\% \pm 22.60$ (tablas 13 y 14. Figuras 16 y 17. La inyección de reserpina no afectó el nado parcial. El 16.66% de las sanguijuelas inyectadas recuperó la conducta de nado parcial al día 7 (tabla 13, figura 16) sin tener diferencias con el grupo control ($p=0.09$) mientras que al compararlo con el grupo lesión la significancia fue de $p=0.60$. Al día 21 el $49.99\% \pm 16.66$ de las sanguijuelas presentó la conducta de nado parcial y al comparar este grupo con el grupo control se obtuvo $p=0.09$; y vs el grupo de lesión la significancia fue de $p=0.93$.

El vaciado de neurotransmisores monoaminérgicos y la restitución de serotonina no tuvieron efecto en el porcentaje de recuperación del nado parcial.

Al día 2 el $53.33\% \pm 22.60$ ya presentaba nado parcial. Al día 7 el porcentaje de nado parcial fue de $66.86\% \pm 13.94$ ($p=0.48$, tabla 13, figura 16). Al día 21 la conducta de nado parcial se presentó en un $53.33\% \pm 22.60$ en sanguijuelas lesionadas mientras que en animales sin monoaminas el porcentaje fue de $66.66\% \pm 11.78$ ($p=0.61$). Al día 2 el $33.33\% \pm 23.57$ de sanguijuelas con restitución de serotonina ya presentaba nado parcial. Al día 7 en esta conducta no hubo diferencias significativas ($p=0.15$) entre el grupo de LRS ($83.33\% \pm 10.54$) y el grupo de lesión ($49.99\% \pm 18.25$); tampoco hubo diferencias comparando el grupo

LRS contra el grupo lesión con inyección de reserpina ($66.66\% \pm 13.94$, $p=.31$). Al día 21 el porcentaje de recuperación de la lesión fue de $53.33\% \pm 22.60$ mientras que el grupo de restitución de serotonina tuvo un porcentaje de recuperación de $83.33\% \pm 10.54$ ($p=0.26$) y comparándolo con el grupo LR ($66.66\% \pm 11.78$) se obtuvo un nivel de significancia de $p=0.32$

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTALES	ES
Lesión	0.00%	100.00%	0.00%	0.00%	100.00%	40.00%	± 24.49
Lesión +Reserpina	66.66%	100.00%	0.00%	0.00%	100.00%	53.33%	± 22.60
Lesión + reserpina + serotonina	33.33%	100.00%	0.00%	0.00%	16.66%	33.33%	± 23.57
Control	0.00%	0.00%			0%	0.00%	± 0.00
Reserpina	0.00%	0.00%			16.67%	5.55%	± 5.55

Tabla 18. Porcentajes de recuperación de nado parcial al día 2 de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTALES
Lesión	0 de 3	3 de 3	0 de 6	0 de 6	6 de 6	3 de 24
Lesión +Reserpina	2 de 3	3 de 3	0 de 6	0 de 6	6 de 6	11 de 24
Lesión + reserpina + serotonina	1 de 3	3 de 3	0 de 6	0 de 6	1 de 6	5 de 24
Control	0 de 3	0 de 3			0 de 6	0 de 12
Reserpina	0 de 3	0 de 3			1 de 6	1 de 12

Tabla 19. Número de animales que recuperaron el nado parcial al día 2, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTALES	ES
Lesión	66.66%	66.60%	0.00%	16.66%	100.00%	49.99%	± 18.25
Lesión +Reserpina	66.66%	66.66%	100.00%	83.33%	16.66%	66.66%	± 13.94
Lesión + reserpina + serotonina	100.00%	100.00%	100.00%	50.00%	66.66%	83.33%	± 10.54
Control	0.00%	0.00%			0%	0%	± 0.00
Reserpina	33.33%	0.00%			16.67%	16.66%	± 9.62

Tabla 20. Porcentajes de recuperación de nado parcial al día 7 de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTALES
Lesión	2 de 3	2 de 3	0 de 6	1 de 6	6 de 6	11 de 24
Lesión +Reserpina	2 de 3	2 de 3	6 de 6	5 de 6	1 de 6	16 de 24
Lesión + reserpina + serotonina	3 de 3	3 de 3	6 de 6	3 de 6	4 de 6	19 de 24
Control	0 de 3	0 de 3			0 de 6	0 de 12
Reserpina	1 de 3	0 de 3			1 de 6	2 de 12

Tabla 21. Número de animales que recuperaron el nado parcial al día 7, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTALES	ES
Lesión	66.66%	100.00%	0.00%	0.00%	100.00%	53.33%	±22.60
Lesión +Reserpina	66.66%	100.00%	33.33%	83.33%	50.00%	66.66%	±11.78
Lesión + Reserpina + Serotonina	100.00%	100.00%	100.00%	50.00%	66.66	83.33%	±10.54
Control	0.00%	0.00%			0%	0%	±0.00
Reserpina	66.66%	33.33%			16.67%	38.88%	±14.69

Tabla 22. Porcentajes de recuperación de nado parcial al día 21 de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.

	S-1	S- 2	S-3	S-4	S-5	TOTALES
Lesión	2 de 3	3 de 3	0 de 6	0 de 6	6 de 6	11 de 24
Lesión +Reserpina	2 de 3	3 de 3	2 de 6	5 de 6	3 de 6	15 de 24
Lesión + Reserpina + Serotonina	3 de 3	3 de 3	6 de 6	3 de 6	4 de 6	19 de 24
Control	0 de 3	0 de 3			0 de 6	0 de 12
Reserpina	2 de 3	1 de 3			1 de 6	4 de 12

Tabla 23. Número de animales que recuperaron el nado parcial al día 21, de las 5 series experimentales en función de los grupos de trabajo.

		DÍA 2	DÍA 7	DÍA 21
Nado parcial	Lesión	40+-24.49 n= 5	49.99+-18.25 n= 5	53.33+-22.60 n= 5
	L+R	53.33+-22.60 n= 5	66.66+- 13.94 n= 5 ($p=0.48$)	66.66+-11.78 n= 5 ($p=0.61$)
	L+R+S	33.33+-23.57 n= 5	87.5+-12.50 n= 5 ($p=0.15$) LRVSLRS $p=0.31$	83.33+-10.54 n= 5 ($p=0.26$) LR VS LRS $p= 0.32$
	R	5.55+-5.55 n= 3	16.66+-9.62 n= 3 (vs contr. $p=0.27$) vs L $p=0.23$	38.88+-14.69 n= 3 (vs contr. $p=0.13$) vs L $p=0.66$

Tabla 24. Porcentajes de recuperación de nado parcial. Porcentajes de recuperación y error estándar de nado parcial a los días 2, 7 y 21; y nivel de significancia.

Discusión

En el presente estudio se cumplieron los objetivos planteados.

1) Se pudo precisar cómo es la motricidad normal en las conductas de nado y marcha en sanguijuelas *Haementeria officinalis*. Siendo, en el caso del nado, la formación de una onda senoidal de la cabeza a la cola; y en el caso de la marcha una serie de acciones que de forma general empiezan con la ventosa trasera pegada al sustrato y la delantera despegada del mismo; la sección anterior del cuerpo se extiende hacia adelante y la ventosa delantera se fija al piso; después, la parte media del cuerpo de la sanguijuela se contrae en forma de acordeón y se despega la ventosa trasera para pegarse cerca a la ventosa delante. Este ciclo de pasos se suele repetir de forma rítmica.

2) También se constató que tras la lesión del SNC de sanguijuelas *Haementeria officinalis* cambiaron su nado y marcha ya que en ambas se apreciaba desincronía a partir del punto de lesión.

3) Se delimitó que la depleción de monoaminas en sanguijuelas *Haementeria officinalis* no modifica la presencia y sincronía de las conductas de nado y marcha,

4) Se especificó que el porcentaje de animales recuperados se vio disminuido significativamente por la depleción de monoaminas después de una lesión en SNC de sanguijuelas *Haementeria officinalis*. La recuperación de la conducta de nado pasó del 63% en el día 7 al 13% en animales sin monoaminas. Y en la conducta de marcha pasó del 90% al 33% en animales sin monoaminas.

5) Se identificó que el porcentaje de animales recuperados por la restitución aguda de serotonina (5-HT. 0.4mg/ml) después de una lesión en el SNC y la previa depleción de monoaminas en sanguijuelas *Haementeria officinalis* no tuvo efectos significativos en los porcentajes de recuperación.

Teniendo en consideración lo arriba mencionado, es posible decir que se cumplió el objetivo general al establecer que la depleción de monoaminas induce cambios en el porcentaje total de animales con recuperación funcional motora de las conductas de nado y marcha en sanguijuelas con una lesión en SNC.

Se comprueba así la hipótesis de que la depleción de monoaminas interfiere con la recuperación funcional motriz después de una lesión del SNC. Reduciendo al 20% los animales recuperados en la conducta de nado y al 41% los animales recuperados en la conducta de marcha.

De acuerdo con los resultados antes citados podemos observar que la falta de monoaminas (debido a una inyección de reserpina) interfiere con la recuperación de la función del nado al día 7. Esto revela la importancia de la presencia de monoaminas para la recuperación del nado sincrónico perdido por una lesión en SNC y respalda la importancia de las monoaminas en los procesos de movilidad de los animales.

Lo anterior se escribe en sintonía con las diferencias significativas en la conducta de marcha también en el día 7, ya que los grupos donde se inyectó reserpina y se lesionó el SNC comparado con los grupos lesión fueron menores en porcentaje de recuperación

Las diferencias en los porcentajes de recuperación con la lesión y la recuperación con la inyección de reserpina previa lesión sugieren que las monoaminas son esenciales en la recuperación motora, por lo que su falta en el organismo cuando hay una lesión en SNC puede evitar la misma.

La diferencia en los porcentajes de recuperación de las conductas del nado y la marcha se debe la activación de diferentes circuitos neuronales y las monoaminas actúan de diferente forma en las conductas de nado y marcha.

Aunque la comparación de los grupos de organismos lesionados (grupo L) contra sanguijuelas lesionadas, sin monoaminas y con restitución de serotonina (grupo LRS) fue significativa en nado, pero no en marcha; y la comparación no significativa del grupo LRS y el grupo LR, nos muestra estadísticamente que la sola restitución de serotonina no es la causa entre la significancia entre grupos L y LRS de nado sincrónico.

Estos resultados indican diversos escenarios que de nuevo nos llevan a pensar en rutas funcionales diferentes de la serotonina. Entre estos escenarios podemos mencionar que tal vez la cantidad de serotonina necesaria para activar la conducta deba ser en una diferente concentración ya que en el presente trabajo se usó una concentración 0.4 mM y de acuerdo con O'Gara et. al., (1991) la aplicación en baño de serotonina de 10 μ M o serotonina, dopamina, octopamina o histamina a 1mM no altera el tiempo que dura el nado en las sanguijuelas tratadas con reserpina, esto debido a que de acuerdo a sus investigaciones las sanguijuelas tratadas con reserpina pueden tener una duración del tiempo de nado mayor lo podría indicar que las monoaminas también pueden tener un papel en la inhibición de la actividad de natación; por lo que posiblemente la restitución de diferentes dosis de serotonina active diferentes mecanismos, un segundo escenario nos

indica que es posible que estas conductas necesiten de la restitución del neurotransmisor 5-HT por exposición crónica (Nusbaum y Kristan, 1985); o con diferente técnica de aplicación ya que, mientras el tratamiento agudo con reserpina suprime la actividad de natación en cordones nerviosos que están aislados (Hashemzadeh-Gargari y Friesen, 1989) el tratamiento con reserpina en sanguijuelas intactas hace que la duración de la actividad de natación sea más larga, (O’Gara et al., 1991) una tercera posibilidad es que el tipo de receptor a serotonina correcto no se esté activando en los procesos para la recuperación motora o bien la regeneración neurítica; (como Vargas, Alfaro y Pérez, en 2019 señalan en su estudio). Otra posibilidad y tal vez no la última puede verse en la necesidad de la acción conjunta de dopamina, octopamina y serotonina, la acción de una sola (que no sea la serotonina en forma aguda) o alguna dupla de estas monoaminas para la recuperación de diversas conductas (como puede verse en Puhl y Mesce, 2008; Hashemzadeh-Gargari y Friesen 1989).

La inyección de reserpina (50 microgramos/gramo de peso) tiene efecto en una variedad de conductas en las sanguijulas tal como, el tiempo de nado, el número de succiones para alimentarse y la velocidad en que realizan la conducta de marcha (O’Gara, Chae, Latham y Friesen, 1991); sin embargo, las conductas analizadas en este estudio, presencia del movimiento sincrónico al nadar y presencia de la serie de movimientos de marcha, no se vieron afectados. Asimismo, la inyección de reserpina no modificó la presencia de estas conductas de nado y la marcha respecto al grupo control.

Con la inyección de reserpina, aunque la movilidad sigue presente, sus cualidades se ven ligeramente modificadas, por ejemplo: los bordes de los animales se observaban ondulados asemejando la apariencia de los bordes de las “hojas de encino” y con modificaciones en la velocidad de su desplazamiento (lo cual se pudo discernir con ayuda de la toma de video en cámara digital). Todo lo anterior muestra su participación en la motricidad en general, e incluso, al ser el aparato digestivo uno de los mayores reservorios de 5-HT es comprensible que esta zona sea una de las más afectadas; ya se observaba aplanada en los animales

tratados. Además, de acuerdo con O'Gara et. al., (1991) en el nado las sanguijuelas tratadas con reserpina expresan inicialmente a veces ondulaciones en algunos segmentos anteriores. Luego el número de segmentos aumentaría hasta que la sanguijuela fuera produciendo movimientos de natación relativamente normales.

Por otro lado, hablando en términos de las implicaciones clínicas de la investigación, en estudios anteriores se plantea que es posible que el tratamiento solo con serotonina no tenga cambios significativos en la recuperación motora, sino que sea necesaria la actividad física que lo complemente; como lo evidencia Chollet et. al., (2001) con la realización de un experimento, con 113 personas incluidas, donde la prescripción temprana de fluoxetina (un fármaco que ayuda a la recaptación de serotonina) combinada con fisioterapia mejoró la recuperación motora después de tres meses de un accidente cerebro vascular lo cual pone a la combinación de serotonina más fisioterapia como una dupla que potencializa la recuperación; a diferencia del experimento de Dennis et. al, (2019) donde la administración durante 6 meses, de manera diaria, de 20 mg de fluoxetina después de un accidente cerebro vascular no mejora los resultados funcionales.

Los organismos estudiados en los experimentos de la presente investigación muestran un gran potencial de movilidad aún estando lesionados, efectuando nado parcial o movimientos asincrónicos pre-marcha. En muchos de los casos los organismos pudieron moverse a los pocos días de la lesión generando la interrogante interesante de si la movilidad participa en el proceso de recuperación espontánea de estos organismos, develando a la movilidad durante la recuperación como un factor para la recuperación de lesiones motrices, tal como lo observado en los pacientes del estudio de Cholett y cols. (2011) en donde la movilidad de los pacientes, forzada por la fisioterapia, favoreció su recuperación. La generación de un grupo de experimentos inmovilizando los organismos durante su recuperación, permitiría evaluar el efecto del movimiento durante la recuperación.

Las conductas de nado y marcha son fácilmente observables en las conductas de la sanguijuela *Haementeria officinalis* y el efecto de la lesión de su sistema nervioso central se puede discriminar. La lesión de su sistema nervioso central entre los ganglios 7 y 8 de su cadena ganglionar y sus efectos en la motricidad se pueden discernir para evaluar los tiempos de recuperación de conductas motrices. Con este protocolo de lesión y recuperación fue posible evaluar el papel de neurotransmisores monoaminérgicos por la aplicación del fármaco reserpina para eliminarlos del SNC.

Conclusión

La falta de monoaminas interfiere con la recuperación de la conducta de nado disminuyendo el porcentaje de animales recuperados. También, la falta de monoaminas disminuye el porcentaje de recuperación en la conducta de marcha.

La restitución aguda de serotonina conjugada con la depleción de monoaminas, disminuye la recuperación funcional, pero los datos estadísticos nos indican que esto no es debido a la acción de la serotonina; para que esto sea posible, probablemente es necesaria la exposición crónica a 5-HT o la activación de diferentes vías de acción del neurotransmisor o la acción de otras monoaminas (como la dopamina y la octopamina por separado o en conjunto) las que modulen el proceso.

Estos resultados nos proporcionan evidencia de la importancia de las monoaminas para la movilidad y en específico para la recuperación funcional después de una lesión de sistema nervioso central en organismos invertebrados lo cual permitirá guiar futuras investigaciones en organismos vertebrados como por ejemplo roedores.

Referencias

- Brustein, E. y Rossignol, S. (abril, 1999). Recovery of locomotion after ventral and ventrolateral spinal lesions in the cat. II. Effects of noradrenergic and serotonergic drugs. *JNeurofisiol*; 81(4):1513-30.doi: 10.1152/jn.1999.81.4.1513.
- Centro colaborador de La Administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnología Médica. (2013). Vademecum. <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/r006.htm>
- Chollet, F., Tardy, J., Albucher, J. Thalamas, C., Berard, C. Lamy, C., Benjot, Y. Deltour, S. Jaillard, A., Niclot, P., Guillon, B., Moulin, T., Marque, P., Pariente, J., Arnaud, C., y Loubinoux, I. (2011). Fluoxetine for motor recovery after acute ischaemic stroke (FLAME): a randomised placebo-controlled trial. *TheLancetNeurology*, 10 (2) 123-130. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70314-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70314-8)
- Coggeshall. R. and Fawcett. D. (1964). The fine structure of the central nervous system of the leech, *Hirudo medicinalis*. *J. Neurophysiol*, 27 (2), 229- 289. <https://doi.org/10.1152/jn.1964.27.2.229>
- David, S., y Aguayo, L. J. (1981, 20 de noviembre). Axonal Elongation into Peripheral Nervous System "Bridges" After Central Nervous System Injury in Adult Rats. *Science*, 214 (4523), 931-933. <https://science.sciencemag.org/content/sci/214/4523/931.full.pdf>
- Elliott, E. and Muller. K. (1981). Long-term survival of glial segments during nerve regeneration in the leech. *Brain Research*, 218 (1-2), 99-113. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90991-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90991-4)
- Meed, G., Hackett, M., Lundström, E., Murra, V., Graeme, J., Hankey, J., y Dennis, M. (2019). The FOCUS, AFFINITY and EFFECTS trials studying the effect(s) of fluoxetine in patients with a recent stroke: a study protocol for three multicentre

randomised controlled trials. *Trials* 16, 369. <https://doi.org/10.1186/s13063-015-0864-1>

De Miguel, F. F., Muller, K. J., Adams, W. B., y Nicholls J. G. (2002, marzo). Axotomy of single fluorescent nerve fibers in developing mammalian spinal cord by photoconversion of diaminobenzidine. *Journal of Neuroscience Methods*, 117 (1), 73-79.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016502700200078X?via%3Dihub>

De Miguel, F. F y Trueta, C. (2004, abril). Synaptic and Extrasynaptic Secretion of Serotonin. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(2),297–312.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10571-005-3061-z>

Díaz-Torres, E., Vargas-Sánchez, J., Lomelí-Mejía, P., & Cruz-Orea, A. (2017).

Caracterización óptica del Sistema Nervioso Central de *Haementeria officinalis*. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, 38(1), 324-329. <https://doi.org/10.17488/rmib.38.1.28>

Fouad, K., Rango, M. M., Vavrek, R., Murray, K. C., Sanelliy, L., y Bennett D. J. (2010, 1 de diciembre). Locomotion After Spinal Cord Injury Depends on Constitutive Activity in Serotonin Receptors. *Journal of Neurophysiology*, 104 (6), 2975–2984. <https://journals.physiology.org/doi/pdf/10.1152/jn.00499.2010>

Goldberg A, Zurlo J, Rudacille D. (1996) The Three Rs and Biomedical Research. *Science*, 272(1403).

<https://www.science.org/doi/10.1126/science.272.5267.1403>

Glover, J., & Kramer, A. (1982). Serotonin analog selectively ablates identified neurons in the leech embryo. *Science*, 216(4543), 317–319.
doi:10.1126/science.7063890

Hashemzadeh-Gargari, H, y Friesen, W. (1989). Modulation of swimming activity in the medicinal leech by serotonin and octopamine. *Comp. Biochem. Physiol.* 94c (1) 195-302 [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(89\)90182-5](https://doi.org/10.1016/0742-8413(89)90182-5)

Höglinger, U. G. Rizk, P., Murie, M. P., Duyckaerts, C., Oertel, W. H., Caille, I., y Hirsch, E. C. (2004, julio). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nature Neuroscience*, 7 (7), 726-35.

https://www.researchgate.net/publication/8512618_Dopamine_depletion_impairs_precursor_cell_proliferation_in_Parkinson_disease

Homma, K., Kitamura, Y., Ogawa, H. & Oka, K., (2006, 10 de mayo) Serotonin induces the increase in intracellular Ca²⁺ that enhances neurite outgrowth in PC12 cells via activation of 5-HT₃ receptors and voltage-gated calcium channels. *Journal Neuroscience Research*, 84(2), 316-25.

<https://doi.org/10.1002/jnr.20894>

Horner, P. J. & Gage, F. H. (2000, 26 de octubre). Regenerating the damaged central nervous system. *Nature*, 407 (6807), 963-70.

<http://doi.org/10.1038/35039559>

Hubel D.H. & Wiesel, T.N. (1977). Plasticity of ocular dominance columns in the monkey striate cortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 278, 377-409. <https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rstb.1977.0050>

Kristan, W. B., Jr, Calabrese, R. L., & Friesen, W. O. (2005). Neuronal control of leech behavior. *Progress in neurobiology*, 76 (5), 279–327.

<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.09.004>

Langston, Irwin, y Ricourte. (1987). Neurotoxins, parkinsonism and Parkinson's disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 32 (1), 1949.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0163725887900623>

Mladinic, M., Muller, K., Nicholls, J., (2009, 15 de junio) Central nervous system regeneration: from leech to oposum. *The Journal of Physiology*, 587(Pt 12), 2775–2782. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.169938>

Muller, K. J., y Carbonetto, S. (1979, 1 de junio). The morphological and physiological properties of a regenerating synapse in the C.N.S. of the leech. *The Journal of Comparative Neurology*, 185 (3), 485-

516. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cne.901850305>

- Nieto, M. (2003, 1 de octubre). Reparación de las lesiones del sistema nervioso central. *Mente y cerebro*, 5, 10-17.
<https://www.investigacionyciencia.es/revistas/mente-y-cerebro/pensamiento-y-lenguaje-362>
- Nieto, M., Collazos, J. E., Taylor, J. S., Gudiño, G., Verdú, E., Pascual J. I., e Insausti, R. (2002, 16 de septiembre). Trauma en el sistema nervioso central y su reparación. *Revista de Neurología*, 35 (6), 534-552.
<https://doi.org/10.33588/rn.3506.2002414>
- Nusbaum, M., y Kristan, W. (1985). Swim initiation in the leech by serotonincontaining interneurons, cells 21 and 61. *J. exp. Biol.* 122, 277-302.
<https://doi.org/10.1242/jeb.122.1.277>
- O'Gara, B., Chae, H., Latham, L. y Friesen, W. (1991). Modification of Leech Behavior Patterns by Reserpine-Induced Amine Depletion, *The Journal of Neuroscience*, 11 (1): 96-110. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-01-00096.1991>
- OMS. (2013). Al menos 500 000 personas sufren lesiones medulares cada año.
<https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/spinal-cord-injury-20131202/es/>
- Pardini, M. (1998). Epidemiología en la lesión traumática medular en el Distrito Federal (Tesis de especialización).
<http://132.248.9.195/pdbis/260389/260389.pdf>
- Puhl, J., y Mesce, K. (2008). Dopamine Activates the Motor Pattern for Crawling in the Medicinal Leech *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28(16):4192-200.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0136-08.2008>

- Rodríguez, E. (2007). Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta bioethica*, 13(1), 25-40.
<https://dx.doi.org/10.4067/S1726-569X2007000100004>
- Spencer, G., Klumperman, J., y Syed, N. (1998). Neurotransmitters and neurodevelopment. Role of dopamine in neurite outgrowth, target selection and specific synapse formation, 5(4), 451-67.
<https://www.degruyter.com/view/j/revneuro.2003.14.3/revneuro.2003.14.3.217/revneuro.2003.14.3.217.xml>
- Schwab, M. E. & Bartholdi, D. (1996, abril). Degeneration and Regeneration of Axons in the Lesioned Spinal Cord. *PhysiologicalReviews*, 76(2), 319-370.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.2.319>
- Vargas, J. Alfaro-Rodríguez, A, y Pérez-Orive, J. (2019, 14 de febrero). Serotonin induces or inhibits neuritic regeneration of leech CNS neurons depending on neuronal identity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 52 (2), 1-9. <http://www.scielo.br/pdf/bjmbr/v52n2/1414-431X-bjmbr-52-2-e7988.pdf>
- Von Bernhardi, R., & Muller, K. J. (1995). Repair of the central nervous system: Lessons from lesions in leeches. *Journal of Neurobiology*, 27(3), 353–366.
doi:10.1002/neu.480270308

ANEXOS

Monoaminergic Neurotransmitters Promote the Percentage of Recovery of Swimming and Ambulation Behaviors following Central Nervous System Lesion in the Leech

Vargas J^{1*} and Vargas S^{1,2}

¹Laboratorio de Regeneración Neuronal, Instituto Nacional de Rehabilitación SS, México

²FES-Zaragoza, UNAM, México

*Corresponding author: Vargas J, Laboratorio de Regeneración Neuronal, Instituto Nacional de Rehabilitación SS, México



ARTICLE INFO

Received: April 26, 2022

Published: May 25, 2022

Citation: Vargas J, Vargas S. Monoaminergic Neurotransmitters Promote the Percentage of Recovery of Swimming and Ambulation Behaviors following Central Nervous System Lesion in the Leech. *Biomed J Sci & Tech Res* 44(1)-2022. BJSTR. MS.ID.006999.

Keywords: Monoaminergic Neurotransmitter; Serotonin; Central Nervous System Lesion; Reserpine; Motor Recovery; *Haementeria Officinalis* Leech

Abbreviations: MN: Monoaminergic Neurotransmitter; CNS: Central Nervous System; 5HT: Serotonin; MA: Monoamine

ABSTRACT

After central nervous system (CNS) injury, the body loses its ability to move at different levels depending on the extension of the lesion. Monoaminergic neurotransmitters play a determining role in animal movement and neuronal regeneration, suggesting they may have a role in motor function recovery after central injury. This study aimed to determine the role of monoaminergic neurotransmitters in the recovery percentage of swimming and ambulation after CNS lesion. The study tested the role of monoaminergic neurotransmitter depletion with reserpine on the recovery percentage of swimming and ambulation behaviors following obturation of the CNS in the Mexican leech, *Haementeria officinalis*. After neurotransmitter depletion, in one group serotonin was replaced to evaluate its role. Every experimental assay included: control, reserpine, lesion, reserpine-lesion, and reserpine-lesion-serotonin. In each group of 6 organisms, the recovery percentage of animals was determined. A total of seven assays were performed and reported as means±SE. After lesion, almost all of the injured animals lost swimming and ambulation behaviors. Seven days later, 68.42±11.11% (n=7) of the groups recovered their swimming ability, but with reserpine, only 4.71±4.71% (n=7, p=0.0002) and 94.28±5.71% recovered their ambulatory ability, but with reserpine, recuperated only 50.86±8.74% (n=7, p=0.0024). The exclusive injection of reserpine had no effect on these movement patterns. The acute administration of serotonin did not promote the recovery, 14.6±9% (n=5) and 55.8±10.95% (n=5) respectively. Monoaminergic neurotransmitters promoted the recovery percentage in swimming and ambulation abilities after CNS lesion. The restored serotonin did not contribute to the recovery percentage.

Introduction

One of the great problems in neuroscience is the fact that central nervous system (CNS) axons are unable to regenerate and successfully reconnect with their targets in superior vertebrates. This failure contrasts with the regeneration abilities in the

peripheral nervous system and among inferior vertebrates and invertebrates [1]. However, using peripheral nerve bridges, David and Aguayo [2] demonstrated the regenerative potential of CNS neurons, which is dependent on their environment. This problem

of regenerative failure is also of clinical interest due to them any individuals harboring CNS injuries that in many cases, lead to various motor and/or cognitive disabilities. In the field of motor and cognitive rehabilitation, several therapies have been developed to strengthen intact connections and promote the reconnection of injured axons. However, conduct recovery still depends on neuronal regeneration and the successful reconnection of neurons with their targets. Despite the biological and clinical interest of neuronal regeneration and the functional recovery of compromised abilities due to CNS injury, the problem remains to be solved. This issue is complex, multifactorial, and neither its determining elements nor their degree of involvement have been determined. This study focused on the role of monoaminergic neurotransmitters since these molecules are highly involved in the physiological processes of animal mobility, and have several effects on neuritogenesis.

Monoaminergic neurotransmitters play an important role in neuritic regeneration. Serotonin acts on neuritic axonal growth, it guides the growth cones, and participates in synaptogenesis [3,4] and many receptors may mediate its mechanism of action [5]. Studies on the somatic secretion of serotonin have posited that this neurotransmitter acts on processes that occur away from the synapses [6,7] and may participate in neuritogenesis. Further, dopamine is one of the factors regulating neuritogenesis [8-10] and neurogenesis in the mammalian adult brain, including humans [11,12]. Likewise, octopamine (OA) is present in invertebrates such as annelids, mollusks, and arthropods, acting on neuronal and behavioral plasticity. OA has been reported to participate in neuritogenesis [13]. OA is structurally and functionally similar to adrenergic transmitters which is present in vertebrates but not in invertebrates [14,15]. All have been recognized as playing a well-described role in animal movement regulation [16]. Their depletion with non-specific drugs such as reserpine, or specific to each neurotransmitter, modifies different features of motor behaviors in animals [17]. An increase in blood serum serotonin leads to behavioral changes in animals in terms of mobility [18] such as aggressiveness in vertebrates and invertebrates. Dopamine is key to movement [19,20] as reflected in Parkinson's disease, a disease compromising movement due to the degeneration of dopaminergic neurons, and that leads to a dopamine deficit in several areas of the brain [21]. Likewise, octopamine plays a role in the movement and behavior of animals [14,15,22].

All of the above underscore the importance of monoaminergic neurotransmitters in animal motor functions and in neuritic regeneration, suggesting that monoamines overall or independently, may play a relevant role in motor recovery after CNS injury. In the study of neuronal regeneration and functional recovery, invertebrate animals have been used due to their spontaneous neuronal regeneration ability and their recovery of motor function

following CNS injury. After CNS injury in the leech, this animal spontaneously recovers motor function [23]. Many behaviors such as swimming, flexion, shortening, drag, feeding, and heartbeat have been described as well as the neuronal circuits associated with these neurotransmitters [17,24]. The addition of serotonin to their environmental water; triggers swimming in animals depleted of this neurotransmitter after 5, 7-dihydroxytryptamine administration [25]. Likewise, in culture, adding serotonin to specific leech neuron cultures induces neuritic regeneration, as in AL1 cells that increase their number of primary neurites, their length, and their ramification; however, in other cells such as Retzius cells, serotonin has an inhibitory effect [26].

The study's aim was to determine the role of monoaminergic neurotransmitters on the percentage of animals that recovered their swimming and ambulatory functions after CNS injury. The CNS cord was injured, and monoamine depletion was tested with intra-corporeal reserpine injection in the Mexican leech, *Haementeria officinalis*; this leech, as *Hirudo medicinalis*, the European medicinal leech, spontaneously recovers motor function after induced injury. Behavioral recovery was evaluated, and the recovery percentage was quantified. Serotonin was also replaced to establish the degree of its effects. In this work we find that these neurotransmitters promote the recovery percentage in swimming and ambulation abilities after CNS lesion. Acutely administered serotonin did not contribute to the recovery percentage.

Material and Methods

Maintenance of the Organisms

Invertebrate organisms of the Phylum Annelida were used: *Haementeria officinalis* is a Mexican leech from our Neuronal Regeneration Laboratory (NRL) animal colony. The procurement and maintenance of *Haementeria officinalis* samples has been previously described [26]. These organisms were originally collected in the lakes and dams of the central Mexican plateau by a researcher authorized by the local "Direction of Agricultural Development". The organisms weighed between 0.5 and 0.8g and were placed in individual 1L containers with water (E-pura, Mexico), labeled, and maintained at laboratory temperatures and conditions. All procedures were approved by the Institutional Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (INR-CICUAL No. 15/11).

Study Groups and Experiment Series

Seven experimental or repetition series were performed. At each repetition, 5 study groups were created (control, injury, reserpine, injury-reserpine, injury-reserpine-serotonin) with 6 organisms each, to determine the recovery percentage in each group. The "control" animals were neither treated nor injured, the

CNS was injured in the "injury" group, in the "reserpine" group, the drug was injected intracorporeally, the drug was injected and the CNS injured in the "reserpine-injury" group, and in the "reserpine-injury-serotonin" group, the animals were injected, their CNS was injured, and serotonin was replaced.

Swimming and Ambulation Motor Behaviors

Swimming in control, uninjured, non-injected animals, follows a continuous, sine-wave pattern originating at the head and ending at the tail (Figure 1A), and the animal flattens its body in a dorsoventral axis. After injury, the animal becomes immobile for 1 to 2 days, and subsequently begins to move and swim creating incomplete sine-waves that begin at the head and end at the injury level. The area posterior to the injury does not form a sinus-wave (Figure 1B) and does not flatten. This type of swimming was not considered normal. After several days, the animal recovered and swam forming complete waves from head to tail. Reserpine injection did not affect the animal's sine-wave swim pattern, but

the body's lateral edges became undulated, like the edges of an oak leaf (Figure 1C). The usual ambulation pattern of the healthy animal on a solid substrate includes release of the anterior sucker, body extension, adhesion of the frontal sucker to the substrate, release of the posterior sucker, body contraction, and adhesion of the posterior sucker to the substrate (Figure 1D). After injury, the animal remains immobile for 1 to 2 days, and subsequently begins to move; injured animals can release the frontal sucker and extend the anterior part of their body, but they cannot adhere the frontal sucker, moving the anterior part of their body above the injury, asynchronously from the rest of the body; over a few days, they can do so, but they are unable to release the posterior sucker (Figure 1E). These movements were not considered normal ambulation. Recovery of normal ambulation was established once the animal could adhere and release both suckers in a synchronous movement that allowed displacement on the substrate. Reserpine injection has no effect on the normal movement pattern (Figure 1F).

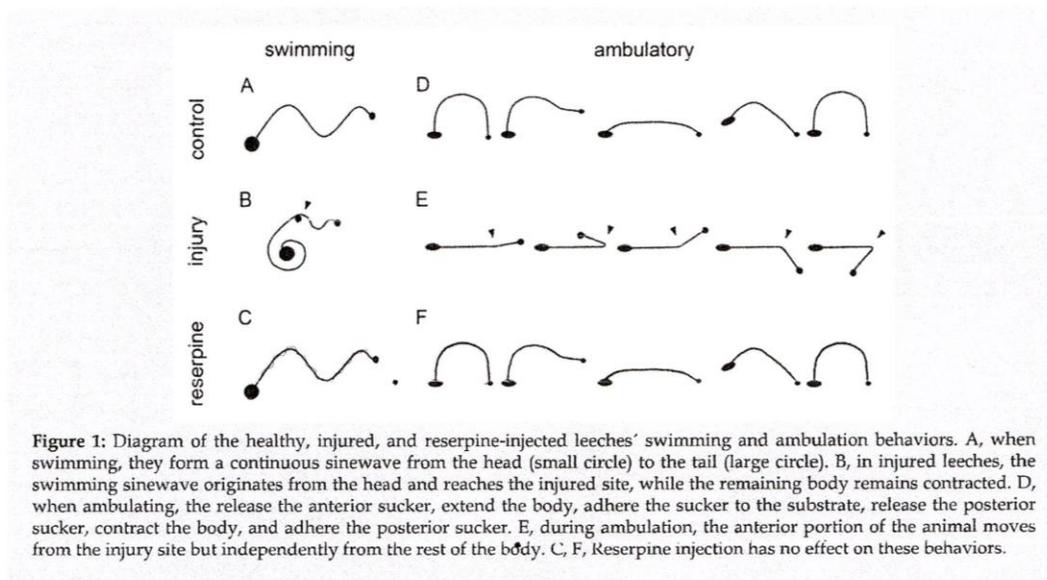


Figure 1: Diagram of the healthy, injured, and reserpine-injected leeches' swimming and ambulation behaviors. A, when swimming, they form a continuous sinewave from the head (small circle) to the tail (large circle). B, in injured leeches, the swimming sinewave originates from the head and reaches the injured site, while the remaining body remains contracted. D, when ambulating, the release the anterior sucker, extend the body, adhere the sucker to the substrate, release the posterior sucker, contract the body, and adhere the posterior sucker. E, during ambulation, the anterior portion of the animal moves from the injury site but independently from the rest of the body. C, F, Reserpine injection has no effect on these behaviors.

CNS Injury

The animals were anesthetized with 9% ethanol, for 20 minutes. They were fixated with 4 pins on a wax dish, and a ventral incision was made at the level of the 7th and 8th ganglia; with microdissection forceps, the connecting nerve between the ganglia were exposed (Figures 2A & 2C), and with another forceps, its central part was obturated causing an injury 300 micrometers

in length (Figure 2D). Obturation was performed with the same forceps in all cases, there were no irregularities on contact surfaces, the edges were blunt, and the blade measured 300 micrometers in width. Injury was caused by pressing on the forceps 10 consecutive times, the position of the forceps' blades was inverted, and pressure was applied 10 more times, the forceps was again inverted, and again, pressure was applied 10 more times. This same procedure was followed in all of the injured groups.

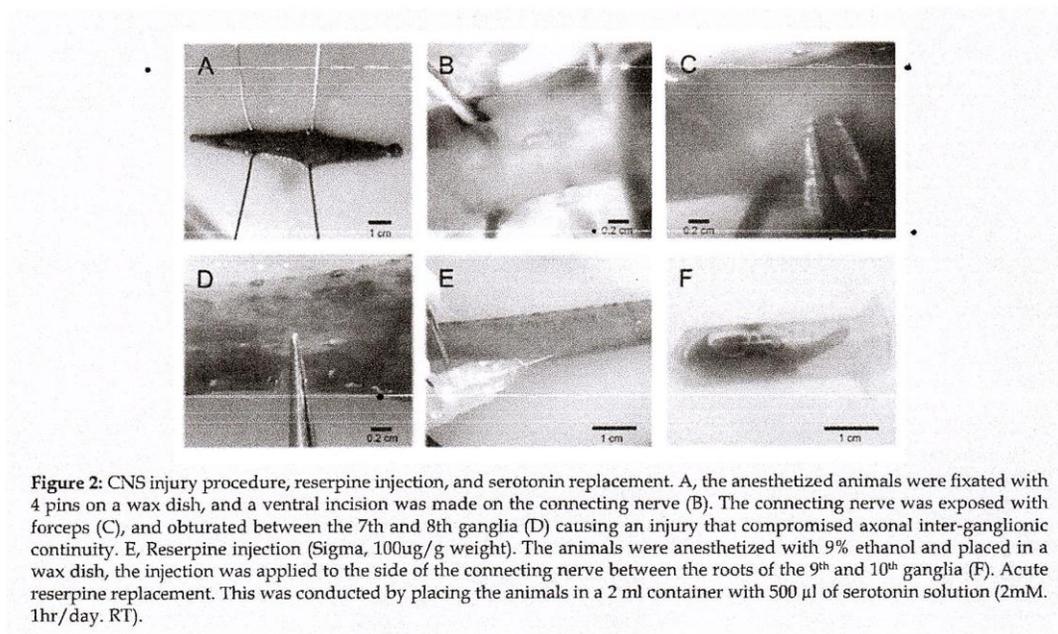


Figure 2: CNS injury procedure, reserpine injection, and serotonin replacement. A, the anesthetized animals were fixated with 4 pins on a wax dish, and a ventral incision was made on the connecting nerve (B). The connecting nerve was exposed with forceps (C), and obturated between the 7th and 8th ganglia (D) causing an injury that compromised axonal inter-ganglionic continuity. E, Reserpine injection (Sigma, 100ug/g weight). The animals were anesthetized with 9% ethanol and placed in a wax dish, the injection was applied to the side of the connecting nerve between the roots of the 9th and 10th ganglia (F). Acute reserpine replacement. This was conducted by placing the animals in a 2 ml container with 500 μ l of serotonin solution (2mM. 1hr/day. RT).

Reserpine Injection

The animals' CNS were depleted of monoamines with reserpine [10]. Reserpine (100 μ g/g of the animal's humid weight, Sigma) was injected with an insulin syringe in organisms anesthetized with 9% ethanol and extended in a wax dish. The 9th and 10th ganglia were located, and the injection was applied between the peripheral nerves of these ganglia, to the side of the connecting nerve (Figure 2E). This procedure was used in the organisms in the groups treated with reserpine. The injury-reserpine group included animals injected with reserpine and injured 24 hours after injection.

Serotonin Replacement

The injured animal group that was injected with reserpine and in whom serotonin was replaced, included organisms injected with reserpine, their CNS was injured 24 hr. later, and during their recovery, they were incubated daily with serotonin (serotonin chlorhydrate, Sigma), for one hour (2mM). This is the concentration at which the resting animals become active and begin to swim vigorously in the containers. The animals were individually placed in 2 mL containers, previously perforated in their upper area to

allow air flow, and 500 μ L of the serotonin solution were added (2mM. 1h/day. RT. Figure 2F). After incubation, the animals were washed and directly placed in their original containers.

Behavioral Registry and Statistical Analysis

For 30 days after injury, the motor skill development of each organism was registered on video. The presence or absence of swimming and ambulation behaviors in each animal were registered. For data analysis, we recorded for each animal, whether or not they had the normal behavior of swimming or ambulatory, we obtained the percentage of recovery of motor skills in each group of 6 organisms. With the recovery percentages, we obtained statistical parameters of the 7 repetitions, and reported the percentage of recovered animals as the mean \pm standard error. The level of significance was established at 95% according to the unpaired Student t test. Calculations were performed with the Sigma Plot 2001 program (Systat Software Inc., USA). The data tables show the recovery percentages on days 2, 7 and 21 since they are representative days of the effect of the injury and the recovery of swimming and ambulatory behaviors (Figure 3).

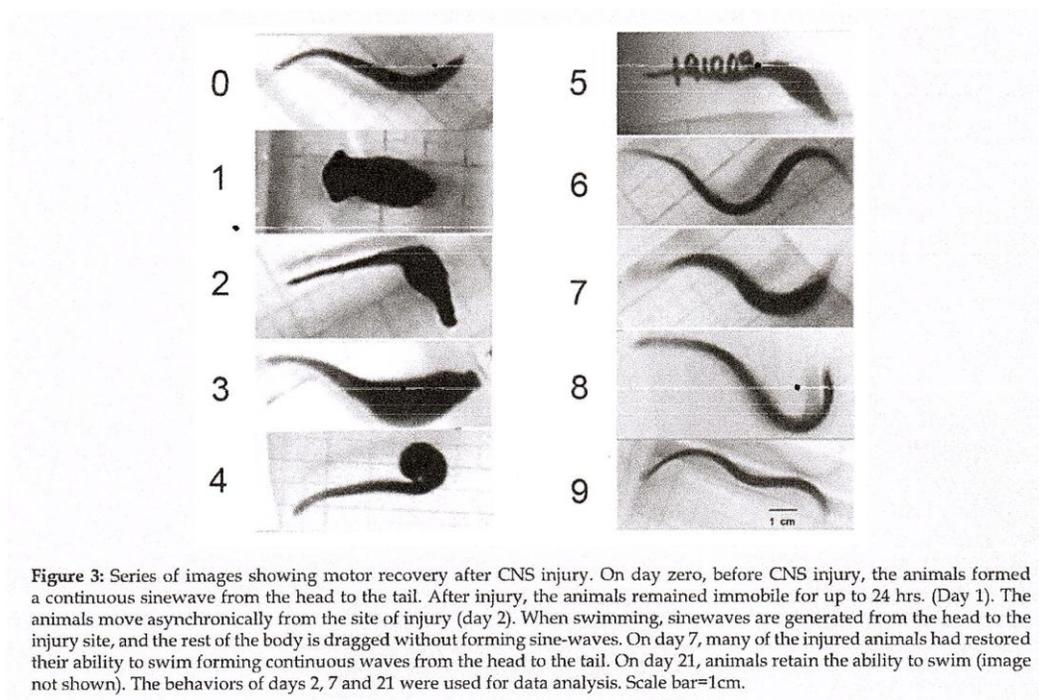


Figure 3: Series of images showing motor recovery after CNS injury. On day zero, before CNS injury, the animals formed a continuous sine-wave from the head to the tail. After injury, the animals remained immobile for up to 24 hrs. (Day 1). The animals move asynchronously from the site of injury (day 2). When swimming, sine-waves are generated from the head to the injury site, and the rest of the body is dragged without forming sine-waves. On day 7, many of the injured animals had restored their ability to swim forming continuous waves from the head to the tail. On day 21, animals retain the ability to swim (image not shown). The behaviors of days 2, 7 and 21 were used for data analysis. Scale bar=1cm.

Results

Recovery of Swimming and Ambulation Behaviors After Injury

When swimming, the animals flatten their bodies dorsoventrally, and generate continuous sinus-wave shaped undulations from the head to the tail (Figure 4A). After injury, the organisms remain immobile for 24 to 48 hours at the bottom of the container, and subsequently begin their recovery; the animals can swim but using only the body portion anterior to the injury (Figure 4B). Seven days after injury, many animals recovered their swimming abilities forming sinus-wave from head to tail (Figure 4C). When ambulating at the bottom of the container, they move by adhering their suckers and contracting and extending their bodies in alternate movements (Figure 4D). During the first few days after injury, the animals are able to adhere the posterior sucker, extend their body and attempt to adhere the anterior sucker. However, they are unable to contract the body. They generate movement attempts in different directions

with the anterior sucker but are unable to release the posterior sucker nor coordinate body contraction or extension (Figure 4E). They can adhere both suckers but independently from the extension and contraction of the body, as seen by the separation of movement from the area of injury.

Monoamine Depletion with Reserpine Prolonged the Effect of CNS Injury

Five days after injury, these animals swim by contracting the posterior part of their body, and only generate sine-waves from the head to the injury site, but 10 days later, they can swim forming complete sine-waves (Figure 5). Likewise, on day 5, the animals still lack ambulatory synchronicity, that is recovered by day 10. Monoaminergic neurotransmitter depletion with reserpine injection, leads to persistence of swimming and ambulatory disability 10 days after injury (Figure 5). Reserpine injection did not modify the sine-wave swimming pattern nor ambulation synchronicity.

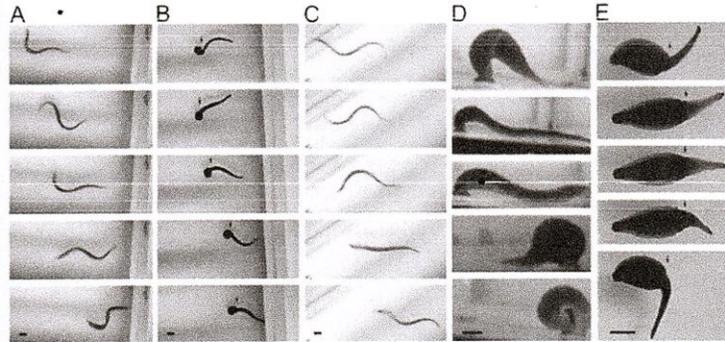


Figure 4: Series of images showing swimming and ambulation behaviors.

- A) While swimming, the animals form sine-waves. The sine-wave begins at the head (right in images) and ends at the tail (left side).
- B) Central nervous system (CNS) injury led to loss of the sine-wave's continuity, originating in the head to the area of injury (arrowhead).
- C) One week later, swimming abilities are recovered, forming full sine-waves from head to tail.
- D) In ambulation, the posterior sucker is adhered (right in images), the animal's body extends, and the anterior sucker adheres to the substrate; the animal's body contracts, and the posterior sucker is released and adheres again close to the anterior sucker. This is a continuous movement that allows the animal's displacement on the substrate.
- E) Nervous system injury causes movement asynchrony in the anterior body and caudal to the injury. While the posterior sucker is adhered to the substrate, the anterior portion moves independently from the area of the injury (arrow).

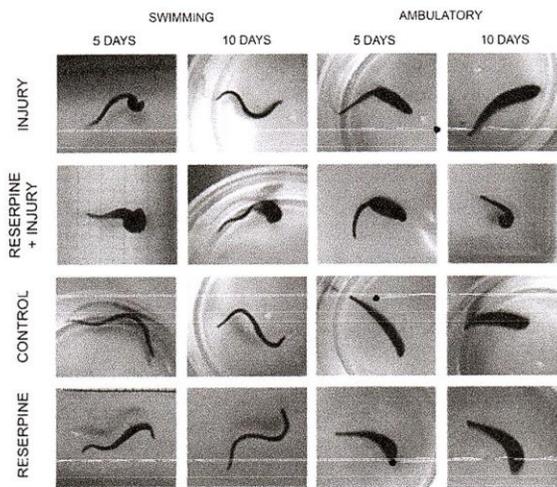


Figure 5: Behavior comparisons 5 and 10 days after CNS injury. Five days after injury, swimming and ambulation remain compromised in injured animals and in those injected with reserpine and injured. After 10 days, they recover swimming fully and ambulate with synchronic movements. However, reserpine injection induced persistence of the injury's effects. Reserpine injection did not affect the sine-wave swimming pattern nor ambulation synchrony.

Reserpine Injection Decreased the Recovery Percentage After Injury

Two days after CNS injury, almost all animals were unable to swim or deambulate (Tables 1 & 2). Seven days after injury, 68.42±11.11% of injured animals can swim forming a continuous sinus-wave from the head to the tail and also recover ambulatory synchronicity (94.28±5.71%) at the bottom of the container,

with alternate body extension and contraction, and adhering and releasing the suckers. The animals injected with reserpine and injured, the recovery percentage in swimming abilities decreased (4.71±4.71% p=0.0002) compared with the animals that were only injured (Table 1, Figure 6). Seven days after reserpine injection, the percentage of ambulation recovery decreased in the injured animals (50.86±8.74%, p=0.0024) in comparison with the recovery of animals that were only injured (94.28±5.71%, Table 2, Figure 7).

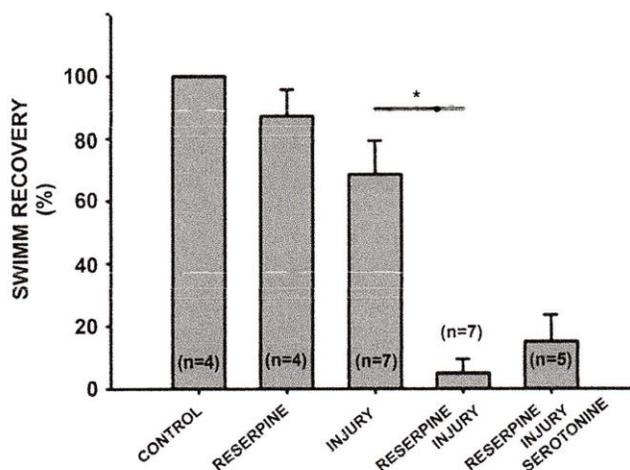


Figure 6: Graph of the percentage of swimming recovery 7 days after injury. The injection of reserpine did not affect swimming behavior, and all animals swam like those in the control group. Among the injured animals, 68.42% recovered the ability to swim forming continuous waves from the head to the tail. Monoaminergic neurotransmitter depletion associated with reserpine injection decreased the recovery percentage to 4.71% (p=0.0002, n=7), and the acute replacement of serotonin did not modify this recovery percentage (14.6±9%, p=0.31, n=5).

Table 1: Recovery percentage of swimming after intra-corporal injection of reserpine (100µg/g) and CNS injury. Data is presented as average values and standard errors. Bold numbers refer to the significant between-group differences: injury and reserpine-injury.

	Day 2	Day 7	Day 21
Control	100 (n=4)	100 (n=4)	100 (n=4)
Reserpine	95.75±4.2 (n=4)	87.25±8.1 (n=4)	78.25±15.8 (n=4)
Injury	2.85±2.85 (n=7)	68.42±11.11 (n=7)	77.66±16.49 (n=6)
Reserpine injury	0 (p=0.99; n=7)	4.71±4.71* (p=0.0002; n=7)	19.5±10.01* (p=0.01; n=6)
Reserpine injury serotonin	0 (n=4)	14.6±9 (n=5)	0 (n=4)

Table 2: Recovery percentage of ambulation after intra-corporal injection of reserpine (100µg/g) and CNS injury. Data is presented as average values and standard errors. Bold numbers refer to the significant between-group differences: injury and reserpine-injury.

	Day 2	Day 7	Day 21
Control	100 (n=4)	100 (n=4)	100 (n=4)
Reserpine	95.75±4.2 (n=4)	100 (n=4)	81.5±10.75 (n=4)
Injury	16.14±11.61 (n=7)	94.28±5.71 (n=7)	95.83±4.1 (n=6)
Reserpine injury	4.7±4.7 (p=0.38; n=7)	50.86±8.74* (p=0.0024; n=7)	55.5±18.01* (p=0.05; n=6)
Reserpine injury serotonin	0 (n=4)	55.8±10.95 (n=5)	70.5±14.3 (n=4)

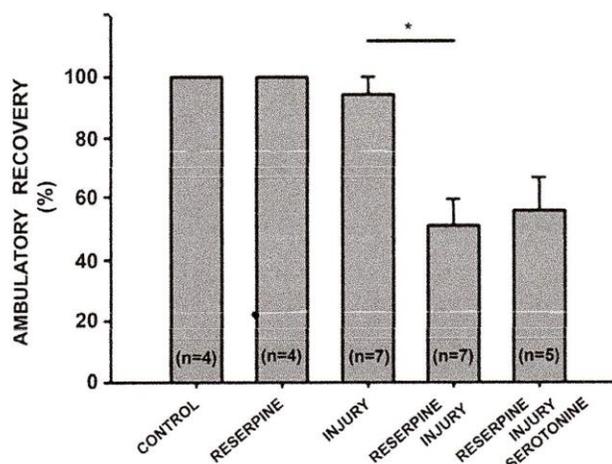


Figure 7: Graph of the percentage of ambulation recovery 7 days after injury. Reserpine injection did not affect the animals' ambulation behavior, and 100% of animals could move on the substrate just as the control group. Among the injured animals, 94.28% recovered the ability to ambulate continuously by adhering the suckers in an alternate manner and extending and contracting the body. Monoaminergic neurotransmitter depletion with reserpine injection decreased the recovery percentage to 50.86% (p=0.0024, n=7), and acute serotonin replacement did not modify this recovery percentage (55.8±10.95%, p=0.73, n=5).

Acute Serotonin Replacement had no Effect on the Recovery of Swimming or Ambulatory Skills

In five repetitions, acutely applied serotonin replacement, 500 µL (2mM) daily for one hour, had no effect on the percentages of swimming and ambulation skills in the injured animals treated with reserpine. In swimming skills, serotonin replacement led to a recovery of 14.6±9% (p=0.31), in comparison with the injury-reserpine group (4.71±4.71%. Table 1, Figure 5). Likewise, serotonin replacement induced an ambulatory recovery percentage

of 55.8±10.95% (p=0.73) compared with the injury-reserpine group (50.86±8.74%) (Table 2, Figure 6).

Discussion

Monoaminergic neurotransmitters promote the recovery of swimming (93%) and ambulation (46%) after CNS injury. Monoamine depletion via reserpine injection decreased the percentage of swimming and ambulation recovery in animals injured by obturation of their central nervous system. Seven days after injury, they decreased from 87.25% in swimming recovery

to 4.71%, and from 94.28% in ambulation recovery to 50.86%. This underscores the importance of these neurotransmitters in the process of motor recovery after CNS injury. The differences in the percentages of recovery of swim and ambulation skills on day 7, in both the animals that were only injured and in the injured group injected with reserpine, suggest that these behaviors follow different neuronal pathways. Indeed, both behaviors have been shown to be based in different groups of neurons [27]. These different circuits may possess different regeneration speeds and integration of their functional webs, leading to the differences in recovery percentages 7 days after injury. In terms of the CNS monoaminergic neurotransmitters, we question their degree of participation in functional recovery. In this study, after monoamine depletion with reserpine injection, serotonin was acutely replaced (2mM; 1hr/day). The recovery percentages in the injury-reserpine and the injury-reserpine-serotonin groups showed no significant differences in swimming or ambulatory skills, revealing that acute serotonin replacement has no effect on recovery percentages.

This lack of a positive serotonin effect is in accordance with results on its effect in some cultured neuronal types such as AE or Retzius cells [26]. In this study, serotonin either had no effect or had an inhibitory effect on the regeneration of specific neurons, whereby systemic serotonin replacement would not foster the regeneration of some neuronal types, and hence, the reestablishment or development of neuronal circuits required for swimming and ambulation motor behaviors. In the future a similar study, chronic testing of other serotonin concentrations would be of interest. Likewise, the role of dopamine and octopamine replacement on the functional recovery of motor skills in this system remains to be tested. The constitutive activity of the 2C serotonin receptor has been shown to increase the excitability of neurons caudal to a spinal injury in rats, and finally leads to recovery of some motor functions [28]. This and other experiments have established the relevance of the serotonergic system in motor function recovery after spinal cord injury. However, clinical trials conducted in humans have shown that drugs associated with serotonin and its receptors do not promote recovery after CNS injury [29]. Currently, there are controversial results on the role of serotonin and its receptors in functional recovery [30,31] and more studies need to be done on humans and other systems.

Acknowledgements

To Gabriela Montiel and Alejandra Zea for their participation in conducting experiments and data analysis.

References

- Horner PJ, Gage FH (2000) Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 407: 963-970.
- David S Aguayo LJ (1981) Axonal Elongation into Peripheral Nervous System "Bridges" After Central Nervous System Injury in Adult Rats. *Science* 214(4523): 931-933.
- Koert CE, Spencer GE, Minnen J, Li KW, Geraerts WPM, et al. (2001) Functional Implications of Neurotransmitter Expression during Axonal Regeneration: Serotonin, But Not Peptides, Auto-Regulate Axon Growth of an Identified Central Neuron. *J Neurosci* 21(15): 5597-5606.
- Alam T, Maruyama H, Li C, Pastuhov S, Nix P, et al. (2016) Axotomy-induced HIF-serotonin signaling axis promotes axon regeneration in *C. elegans*. *Nat Commun* 7: 1038.
- Homma K, Kitamura Y, Ogawa H, Oka K (2006) Serotonin induces the increase in intracellular Ca²⁺ that enhances neurite outgrowth in PC12 cells via activation of 5-HT₃ receptors and voltage-gated calcium channels. *J Neurosci Res* 84(2): 316-325.
- De-Miguel FF, Trueta C (2005) Synaptic and Extrasynaptic Secretion of Serotonin. *Cel Mol Neurobiol* 25: 297-312.
- Del-Bel E, De-Miguel FF (2018) Extrasynaptic Neurotransmission Mediated by Exocytosis and Diffusive Release of Transmitter Substances. *Front Synaptic Neurosci* 10: 13.
- Todd RD (1992) Neural development is regulated by classical neurotransmitters: dopamine D₂ receptor stimulation enhances neurite out growth. *Biol Psychiatry* 31(8): 794-807.
- Spencer GE, Klumperman, Syed NI (1996) Neurotransmitters and neurodevelopment. Role of dopamine in neurite outgrowth, target selection and specific synapse formation. *Cell Mol Neurobiol* 16: 577-589.
- Izumi Y, Wakita S, Kanbara C, Nakai T, Akaike A, Kume T (2017) Integrin α 5 β 1 expression on dopaminergic neurons is involved in dopaminergic neurite outgrowth on striatal neurons. *Sci Rep* 7: 42111.
- Höglinger UG, Rizk P, Murie MP, Duyckaerts C, Oertel WH, et al. (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7: 726-735.
- Mishra A, Singh S, Tiwari V, Parul, Shukla S (2019) Dopamine D₁ receptor activation improves adult hippocampal neurogenesis and exerts anxiolytic and antidepressant-like effect via activation of Wnt/ β -catenin pathways in rat model of Parkinson's disease. *Neurochem Int* 122: 170-186.
- Koon AC, Ashley J, Barria R, DasGupta S, Brain R, et al. (2011) Autoregulatory and paracrine control of synaptic and behavioral plasticity by octopaminergic signaling. *Nat Neurosci* 14: 190-199.
- Roeder T, Seifert M, Kähler C, Gewecke M (2003) Tyramine and octopamine: antagonistic modulators of behavior and metabolism. *Arch Insect Biochem Physiol* 54(1): 1-13.
- Roeder T (2005) Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. *Annu rev entomol* 50: 447-477.
- Li Y, Jiao Q, Du X, Bi M, Han S, et al. (2018) Investigation of Behavioral Dysfunctions Induced by Monoamine Depletions in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Front Cell Neurosci* 12: 241.
- O'Gara BA, Chae H, Latham LB, Friesen WO (1991) Modification of leech behavior patterns by reserpine-induced amine depletion. *J Neurosci* 11(1): 96-110.
- Crisp MK, Mesce KA (2006) Beyond the central pattern generator: amine modulation of decision-making neural pathways descending from the brain of the medicinal leech. *J Exp Biol* 209(9): 1746-1756.
- Alves SJ, Tecuapetla F, Paixão V, Costa RM (2018) Dopamine neuron activity before action initiation gates and invigorates future movements. *Nature* 554: 244-248.

20. Wolfram S (2007) Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci* 30(5): 203-210.
21. German DC, Manaye K, Smith WK, Woodward DJ, Saper CB (1989) Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease: computer visualization. *Ann Neurol* 26(4): 507-514.
22. Xu L, Jiang H, Chen X, Xiong Y, Lu X, et al. (2018) How Tyramine β -Hydroxylase Controls the Production of Octopamine, Modulating the Mobility of Beetles. *Int J Mol Sci* 19(3): 846.
23. Mladinic M, Muller KJ, Nicholls JG (2009) Central nervous system regeneration: from leech to opossum. *J Physiol* 587(12): 2775-2782.
24. Kristan WB, Calabrese RL, Friesen WO (2005) Neuronal control of leech behavior *Prog Neurobiol* 76(5): 279-327.
25. Glover J, Kramer A (1982) Serotonin analog selectively ablates unidentified neurons in the leech embryo. *Science* 216(4543): 317-319.
26. Vargas J, Alfaro-Rodriguez A, Pérez-Orive J (2019) Serotonin induces or inhibits neuritic regeneration of leech CNS neurons depending on neuronal identity. *Braz J Med Biol Res* 52(2): e7988.
27. Lamb DG, Calabrese RL (2011) Neural circuits controlling behavior and autonomic functions in medicinal leeches. *Neural Systems&Circuits* 1: 13.
28. Fouad K, Rango MM, Vavrek R, Murray KC, Sanelli L, et al. (2010) Locomotion After Spinal Cord Injury Depends on Constitutive Activity in Serotonin Receptors. *J Neurophysiol* 104(6): 2975-2984.
29. Leech KA, Kinnaird CR, Hornby TG (2014) Effects of Serotonergic Medications on Locomotor Performance in Humans with Incomplete Spinal Cord Injury. *J Neurotraum* 31(15): 1334-1342.
30. Chollet F, Tardy J, Albucler J, Thalamas C, Berard E, et al. (2011) Fluoxetine for motor recovery after acute ischaemic stroke (FLAME): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 10(2): 123-130.
31. Dennis M, Forbes J, Graham C, Hackett M, Hankey GJ, et al. (2019) Effects of fluoxetine on functional outcomes after acute stroke (FOCUS): a pragmatic, double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet* 393(10168): 265-274.

ISSN: 2574-1241

DOI: 10.26717/BJSTR.2022.44.006999

Vargas J. Biomed J Sci & Tech Res



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 License

Submission Link: <https://biomedres.us/submit-manuscript.php>



Assets of Publishing with us

- Global archiving of articles
- Immediate, unrestricted online access
- Rigorous Peer Review Process
- Authors Retain Copyrights
- Unique DOI for all articles

<https://biomedres.us/>