



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

Función de los receptores GABA_A y GABA_B en la modulación de la
excitabilidad de las fibras aferentes primarias de ratas neuropáticas

TESIS

Que presenta

Ing. Gerardo Asiel Carballido Ramirez

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En la especialidad de

Neurobiología Celular y Molecular

Director de la Tesis

Dr. José Rodolfo Delgado Lezama

Agradecimientos

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por haberme otorgado la beca de maestría del 1 de septiembre de 2015 al 31 de agosto de 2017.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Rodolfo Delgado Lezama, por todo su apoyo y sobre todo por toda su paciencia durante este largo trabajo, por sus consejos y por todo el conocimiento y aptitudes que inculcó en mi para formarme como futuro investigador.

A mis compañeros de laboratorio Ximena, Pau y Beto, que me recibieron con los brazos abiertos en su laboratorio, por su apoyo y consejos durante mi maestría.

Dedicatoria

A mi familia y amigos, que sin todos ustedes no hubiera terminado otro capítulo en vida profesional, el ser investigador.

A ti mamá y papá, que gracias a ustedes soy la persona que soy y donde estoy, porque siempre me apoyaron, creyeron en mí aunque mis ideas parecieran inalcanzables o incluso fantasiosas. A pesar de que este camino parecía interminable, jamás dejaron que me rindiera y gracias a ustedes soy un maestro en ciencias. Que sobre el éxito está la humildad y la familia, que cualquiera que sea mi sueño siempre debo confiar en mí y luchar hasta hacerlo realidad.

A mis hermanos, que siempre me demuestran que a pesar de las adversidades uno debe seguir adelante, disfrutar lo que uno hace y sobre todo disfrutar de cada momento.

A ustedes amigos Fany y Ernesto, que me brindaron su amistad incondicional desde el primer día y gracias a ustedes hicieron estos dos años uno de los mejores de mi vida.

“Zwei Dinge sind unendlich, das Universum und die menschliche Dummheit, aber bei dem Universum bin ich mir noch nicht ganz sicher.” – Albert Einstein

*“Hay dos cosas infinitas: el universo y la estupidez humana. Y del universo no estoy seguro” –
Albert Einstein*

Índice general

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción	3
1. GABA.....	3
2. Receptores GABA _A	3
2.1 Distribución de los rGABA _A en el cerebro.....	4
2.2 Receptores GABA _A sinápticos y extrasinápticos.....	5
2.3 Función de los rGABA _A sinápticos y extrasinápticos	6
3. Receptores GABA _B	7
3.1 Función de los rGABA _B	8
3.2 Distribución de los rGABA _B en el cerebro.....	8
4. Distribución de los rGABA _A y rGABA _B en la médula espinal y GRD.....	9
5. Fibras aferentes primarias	11
5.1 Proyección de las FAP en la médula espinal	12
6. Dolor	14
6.1 Dolor neuropático.....	14
6.2 Neuropatía diabética.....	15
6.3 Neuropatía por lesión del sistema nervioso periférico.....	15
7. Función de los receptores a GABA en el GRD de las FAP	16
8. Fallas en la propagación de los PA en las neuronas sensoriales.....	19
Planteamiento del problema	21
Hipótesis	22
Objetivos	22
1. Objetivo general.....	22
2. Objetivos específicos	22
Materiales y métodos.....	23
1. Animales.....	23
2. Procedimientos generales	23
3. Registro y estimulación	24
4. Drogas	24

5. Análisis de datos.....	24
Resultados.....	25
1. La neuropatía por LNE y por diabetes modifica el tamaño del PAc evocado por las aferentes primarias A α / β y C.....	25
1.1 Comparación de los PAc de las FAP A α / β evocados en NE-GRD-RD L4 y L5 de ratas <i>naïve</i> , neuropáticas por LNE y diabéticas.....	25
1.2 Comparación de los PAc de las FAP C evocados en NE-GRD-RD L4 y L5 de ratas <i>naïve</i> , neuropáticas por LNE y diabéticas.....	26
2. Función de los rGABA _A y rGABA _B en las FAP A α / β	29
3. Función de los rGABA _A y rGABA _B en las FAP C.....	30
3.1 Estimulación a ~30xU.....	32
3.2 Estimulación a ~50xU.....	32
4. Función de los rGABA _A y rGABA _B en propagación de PA de la unión T de las FAP A α / β	36
4.1 Efecto de la EAF en los PAc de las FAP A α / β	37
5. El GABA exógeno cortocircuita las membranas de las FAP A α / β y C.....	42
5.1 Acción del GABA exógeno en las FAP A α / β y C.....	42
6. El cortocircuito de las neuronas sensoriales no modifica la falla en la propagación de PA en las aferentes primarias A β	43
Discusión.....	46
Conclusiones.....	57
Bibliografía.....	58

Abreviaturas

5-HT	Serotonina	NKCC1	Cotransportador Na ⁺ K ⁺ Cl ⁻
ACSF	Fluido cerebro espinal artificial	PA	Potencial de acción
CA	Cuerno de Amón	PAC	Potencial de acción compuesto
CGP-55845	(2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-Diclorofenil) etil]amino-2-hidroxipropil] (fenilmetil) ácido fosfínico	PAD	Despolarización de las aferentes primarias
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina	PKC γ	Proteín cinasa C isoforma γ
FAP	Fibras aferentes primarias	PTX	Picrotoxina
GABA	Ácido γ -aminobutírico	RD	Raíz dorsal
GABA-T	GABA transaminasa	rGABA _A	Receptor GABA _A
GAD	Glutamato descarboxilasa	rGABA _B	Receptor GABA _B
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía	rGABA _C	Receptor GABA _C
GRD	Ganglio de la raíz dorsal	α_5 GABA _A	Receptor GABA _A que contiene la subunidad α_5
EAF	Estimulación a alta frecuencia	SNC	Sistema nervioso central
i.p.	Intraperitoneal	SNP	Sistema nervioso periférico
IPSP	Potencial postsináptico inhibitor	TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
KCC2	Cotransportador K ⁺ Cl ⁻ isoforma 2	TrkA	Receptor a tropomisina quinasa A
KCC3	Cotransportador K ⁺ Cl ⁻ isoforma 3	TTX	Tetrodotoxina
L-655,708	Etil (S)-11,12,13,13a-Tetrahidro-7-metoxi-9-oxo-9H-imidazo[1,5-a]pirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-1-carboxilato	U	Umbral
LNE	Ligadura de nervio espinal	VC	Velocidad de conducción
MAP	Modulador alostérico positivo		
NE	Nervio espinal		
NE-GRD-RD	Nervio espinal en continuidad con el ganglio de la raíz dorsal y la raíz dorsal		
NGF	Factor de crecimiento del nervio		
NK1	Neurokinina 1		

Resumen

Las neuronas sensoriales o fibras aferentes primarias expresan receptores GABAérgicos. Interesantemente, la acción del GABA cambia de inhibidor a excitador en el sistema nervioso periférico debido a la alta expresión del NKCC1 y la baja expresión del KCC2, lo que permite una alta concentración de Cl⁻ intracelular y que despolarice a las neuronas de las aferentes primarias. Esta despolarización, conocida como PAD que regula la liberación de neurotransmisor en las terminales de las fibras aferentes primarias e inhiben a neuronas de la médula espinal, la cual paradójicamente está relacionada con la inhibición presináptica. Además la unión T de las neuronas sensoriales en el ganglio de la raíz dorsal funciona como un filtro pasa bajas, capaz de filtrar potenciales de acción provenientes de la periferia para evitar una sobre estimulación de las neuronas de la médula espinal. En la neuropatía por lesión de nervios espinales o diabetes se han observado cambios en la expresión de canales y receptores a neurotransmisores, además de la pérdida del filtro en la unión T. Mediante registros electrofisiológicos se demostró que la activación con GABA (5 μM), el bloqueo de los α_5 GABA_A y rGABA_A con L-655, 708 (20 μM) y picrotoxina (100 μM), respectivamente, reducen el área bajo la curva de los potenciales de acción evocados por la fibras aferentes A α / β y C en ratas *naïve* y en ratas neuropáticas por lesión de nervios y diabetes, y que existen alteraciones electrofisiológicas de los potenciales de acción en la neuropatía. Estos datos sugieren que los rGABA_A modulan la excitabilidad de las neuronas sensoriales a través de la despolarización tónica y que la expresión de rGABA_A y rGABA_B disminuye por la neuropatía, ocasionando cambios en los PA. Por otro lado, este trabajo aporta evidencia de la presencia de la falla en la propagación de los potenciales de acción en ratas *naïve* a través de la estimulación de un tren de 20 choques a 200 Hz y que éste se pierde por la neuropatía. Además, esta propiedad de filtrado no se afecta por el bloqueo y activación de los rGABA_A y rGABA_B al menos en ratas *naïve*.

Abstract

Sensory neurons or primary afferent fibers express GABAergic receptors. Interestingly, the GABA action changes from inhibitory to excitatory neurotransmitter in peripheral nervous system due to increased NKCC1 expression and decreased KCC2 expression, which allows a high chloride intracellular concentration and a depolarization of primary afferent neurons. This depolarization, known as PAD regulates neurotransmitter release in primary afferent fibers terminals and inhibits spinal cord neurons, which paradoxically is related with presynaptic inhibition. In addition, dorsal root ganglion (DRG) neurons T-junction works as low-pass filter, capable to filter action potentials (AP) from periphery to avoid an over stimulation of spinal cord neurons. In neuropathy induced by spinal nerves injury (SNI) or diabetes, it has been observed changes in channels or neurotransmitter receptors expression, also the filter-loss in T-junction. By means of electrophysiological recordings, it was shown that shunting with GABA (5 μ M), α_5 GABA_AR and GABA_AR blocking with L-655, 708 (20 μ M) and picrotoxin (100 μ M), respectively, reduced the area under the curve of AP evoked by A α / β and C afferent fibers in naive rats, neuropathy by SNI or diabetes. There was electrophysiological alterations of AP in neuropathy. These data suggest that GABA_AR modulate DRG neurons excitability through a tonic despolarization and the GABA_AR and GABA_BR expression is reduced in neuropathy, which explains the changes in the AP. In addition, this work provides evidence of the presence of AP propagation failure in naive rats through stimulating with a train of 20 pulses, 1.5xU and 200 Hz and its loss in neuropathy. Also, this filtering property is not affected by GABA_AR or GABA_BR activation or blocking at least in naïve rats.

Introducción

1. GABA

En el SNC de los mamíferos, el GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio. El GABA se sintetiza a partir del glutamato por la GAD y es metabolizado posteriormente por la GABA-T produciendo semialdehído succínico (Watanabe *et al.*, 2002). Además, este neurotransmisor se ha encontrado en organismos procariontes y en plantas (Shelp *et al.*, 1999).

Estudios cuantitativos y semicuantitativos de niveles de GABA, GAD y GABA-T han demostrado su presencia en la sangre, vasos sanguíneos, corazón, músculo esquelético, tracto gastrointestinal, hígado, páncreas, riñón, vejiga, órganos reproductores masculinos y femeninos, pulmón, pituitaria, tiroides, glándula adrenal, timo, glándula salival, piel y ganglio simpático (Tanaka 1985; Erdö y Kiss 1986).

El GABA actúa a través de tres tipos de receptores: GABA_A, GABA_B y GABA_C. Los rGABA_A y rGABA_C son miembros de la super familia de canales de Cl⁻ activados por ligando y median una actividad inhibitoria rápida (Chebib y Johnston 1999; Farrant y Nusser, 2005; Olsen y Sieghart, 2008). Los rGABA_B pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G y regulan canales de Ca²⁺ y K⁺ que median una inhibición de largo plazo (Kerr y Ong, 1995).

2. Receptores GABA_A

En el SNC de los vertebrados maduros, el GABA tiene una acción inhibitoria, debido a que la concentración intracelular de Cl⁻ es menor comparada con la del medio extracelular. Cuando el GABA se une al rGABA_A, éste se abre y permite el flujo del Cl⁻ dentro de la neurona. De este modo, el GABA hiperpolariza la membrana neuronal, reduciendo la excitabilidad de la neurona (McDonald y Olsen, 1994; Watanabe *et al.*, 2002).

El rGABA_A es un canal pentamérico permeable a Cl⁻ y a HCO₃⁻. Cada subunidad está compuesta por un dominio N terminal extracelular y por cuatro dominios transmembranales hidrofóbicos (M1 – M4) seguido de un dominio C

terminal extracelular (Barnard *et al.*, 1998; Chebib y Johnston, 2000; Watanabe *et al.*, 2002) (**Fig. 1A**). Las cinco subunidades del rGABA_A forman una estructura cuasisimétrica alrededor del canal iónico, y la región M2 forma la pared del poro del canal (Chebib y Johnston, 2000) (**Fig. 1B**).

Hasta la fecha, se han identificado las subunidades α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π , ρ_{1-3} (Barnard *et al.*, 1998; Olsen y Sieghart, 2008). Aunque matemáticamente existen miles de combinaciones posibles, sólo se han encontrado una docena en el SNC. Esta diversidad de subunidades le confiere al receptor propiedades específicas como son: cinética del canal, afinidad por el GABA, velocidad de desensibilización, localización subcelular y perfil farmacológico (Farrant y Nusser, 2005). Se ha demostrado por estequiometría que la composición de estos receptores es de dos subunidades α , dos β y una γ , donde esta última puede ser remplazada con otra subunidad. Varios estudios han demostrado que los receptores $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ son los más abundantes en el cerebro (Tretter *et al.*, 1997) (**Fig. 1C**). Las subunidades δ o ϵ se pueden ensamblar en el rGABA_A en lugar de la subunidad γ . La subunidad π ha sido encontrada fuera del SNC en órganos como útero, glándula prostática, timo y pulmón (Hedblom y Kirkness, 1997).

2.1 Distribución de los rGABA_A en el cerebro

Las subunidades del rGABA_A se distribuyen de modo no homogéneo en el cerebro de mamíferos adultos: (i) Las subunidades α_1 , β_2 , β_3 y γ_2 están extensamente distribuidas en el cerebro como son: el bulbo olfatorio, regiones de la corteza cerebral, hipocampo, ganglios basales, tálamo, hipotálamo, tallo cerebral y cerebelo (Fritschy y Mohler, 1995). (ii) Las subunidades α_2 , α_3 , α_5 y δ están limitadas a ciertas regiones como son: bulbo olfatorio, hipocampo, regiones del tálamo, hipotálamo y tallo cerebral (Fritschy y Mohler, 1995). (iii) La subunidad α_1 está expresada en regiones donde la subunidad α_2 está expresada en niveles bajos (Fritschy y Mohler, 1995). (iv) La subunidad α_3 está expresada en regiones donde la subunidad α_1 está expresada en niveles bajos como son: bulbo olfatorio, ganglios basales, tálamo e hipotálamo (Fritschy y Mohler, 1995). (v) La subunidad α_4 es abundante en el hipocampo (Fritschy y Mohler, 1995). (vi) La subunidad α_5 está

expresada en ciertas regiones relacionadas con la función de la memoria (Fritschy y Mohler, 1995). (vii) La subunidad α_6 está expresada exclusivamente en las células granulares del cerebelo (Watanabe *et al.*, 2002). (viii) Finalmente, la subunidad ϵ está expresada únicamente en algunas regiones del hipotálamo e hipocampo (Watanabe *et al.*, 2002).

2.2 Receptores GABA_A sinápticos y extrasinápticos

Como se explicó anteriormente, cuando el GABA se une al rGABA_A, la permeabilidad al Cl⁻ aumenta, esto permite la entrada neta de aniones al interior de la neurona produciendo una hiperpolarización postsináptica de la neurona, es decir un IPSP. Este incremento en la conductancia de la membrana (apertura de canales) ocurre en menos de 30 ms y da lugar a la inhibición fásica, es decir, estos receptores se activan e inactivan rápidamente (Farrant y Nusser, 2005).

En años recientes, se ha demostrado que algunos rGABA_A se localizan fuera del espacio sináptico. El GABA puede escaparse de la sinapsis y activar estos receptores o incluso activar receptores de neuronas adjuntas (fenómeno conocido como *spillover*). A estos receptores se les denomina extrasinápticos. Poseen más afinidad por el GABA que los sinápticos. Además, la duración de activación e inactivación es mayor comparada con la fásica, lo que mantiene activados a los rGABA_A tónicamente (Farrant y Nusser, 2005).

Los receptores sinápticos están conformados principalmente por la subunidad γ_2 en asociación con las subunidades α_1 , α_2 o α_3 ($\alpha_1\beta_{2/3}\gamma_2$, $\alpha_2\beta_{2/3}\gamma_2$ y $\alpha_3\beta_{2/3}\gamma_2$) (Farrant y Nusser, 2005). Mientras que los receptores que contienen a las subunidades α_4 , α_5 o α_6 y la subunidad δ ($\alpha_6\beta_x\delta$, $\alpha_4\beta_x\delta$ y $\alpha_5\beta_x\gamma_2$) son predominante o exclusivamente extrasinápticos. No obstante, esto no es una regla generalizada, ya que se ha observado que algunos receptores sinápticos se localizan en sitios extrasinápticos (Farrant y Nusser, 2005; Brickley y Mody, 2012)

En un trabajo realizado por Böhme y colaboradores (2004), a través de la mutación y transfección de rGABA_A en células HEK 293 lograron identificar los receptores con mayor afinidad (EC₅₀) por GABA. Mediante ensayos de *binding* y mutaciones en la subunidad α determinaron que la subunidad α_6 es la que posee

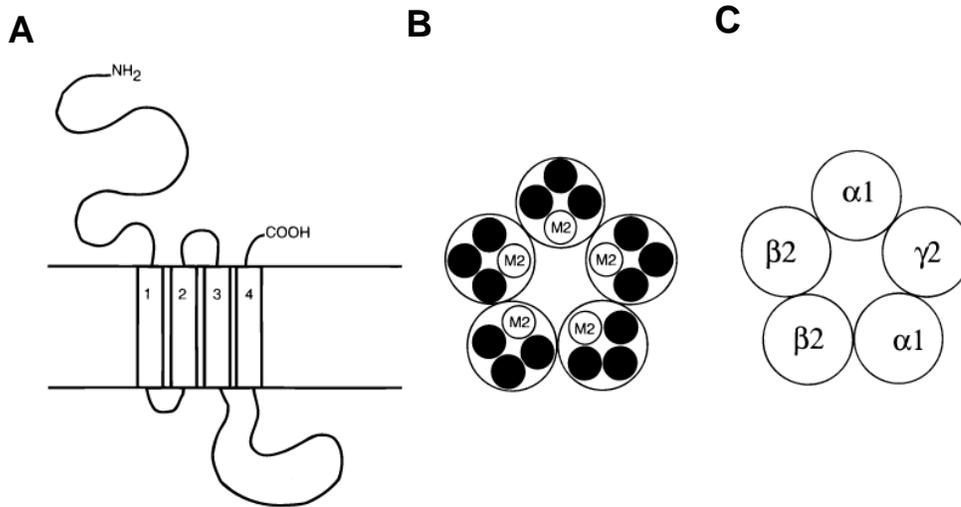


Figura 1. Representación del canal iónico GABA activado por ligando. **A.** Estructura general de una de las cinco subunidades mostrando los cuatro pases transmembranales (M1 – M4). **B.** Arreglo pentamérico de las subunidades mostrando la región M2 que forma el poro del canal. **C.** Receptor GABA_A formado por dos subunidades α_1 , dos subunidades β_2 y una subunidad γ . (Imagen tomada y editada de Chebib y Johnston, 2000)

mayor afinidad ($1.0 \pm 0.03 \mu\text{M}$) y la subunidad α_3 con menor afinidad ($2.9 \pm 0.1 \mu\text{M}$), quedando en el siguiente orden: $\alpha_6 > \alpha_1 > \alpha_2 > \alpha_4 > \alpha_5 \gg \alpha_3$. Por lo tanto, los receptores con las subunidades $\alpha_6\beta_3\delta$ y $\alpha_4\beta_3\delta$ (extrasinápticos) tienen la más baja EC_{50} para GABA ($\sim 0.3 - 0.7 \mu\text{M}$) mientras que la configuración $\alpha_1\beta_3\gamma_2$, $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ (sinápticos) son un orden de magnitud mayores ($\sim 6 - 14 \mu\text{M}$) (Farrant y Nusser, 2005).

2.3 Función de los rGABA_A sinápticos y extrasinápticos

Las interneuronas GABAérgicas del SNC previenen a las neuronas de la sobreexcitación a través de la inhibición fásica, y así evitar el desarrollo de patologías en la actividad neuronal (Farrant y Nusser, 2005).

Una de las funciones más importantes de la inhibición fásica es la generación de actividades rítmicas o sincronizadas en la red neuronal. Por ejemplo, la actividad de las neuronas corticales y las células en canasta del hipocampo que inervan regiones perisomáticas de las células piramidales está determinada por interneuronas GABAérgicas granulosas. Estas interneuronas controlan el número de células piramidales activas y la frecuencia de disparo, esto es esencial en la generación y mantenimiento de las oscilaciones theta, gamma y de alta frecuencia

(Jonas et al., 2004). El rol de la inhibición fásica en la generación o regulación de la actividad sincrónica de una población de neuronas también se ha observado en otras regiones del cerebro como el tálamo (Huntsman *et al.*, 1999) y el bulbo olfatorio (Laurent, 2002).

Por otro lado, los rGABA_A extrasinápticos modulan la excitabilidad de las neuronas, ésto se ha observado en las células piramidales de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, que expresan al α_5 GABA_A (Glykys y Mody, 2007) donde estos receptores muestran una fuerte rectificación de salida y así un mayor efecto modulador ante una entrada excitadora (Pavlov *et al.*, 2009). En hipocampo, los receptores extrasinápticos son capaces de modular la excitabilidad sin alterar la sensibilidad de las neuronas. También se ha observado que el bloqueo de la inhibición tónica facilita la excitabilidad de las interneuronas, permitiendo un incremento en la frecuencia de los IPSPs en células piramidales de CA1 (Semyanov *et al.*, 2003).

Estos receptores extrasinápticos son de gran importancia, ya que se les asocia con varios desórdenes y patologías como alteraciones del sueño, estrés y trastornos psiquiátricos, epilepsia, dependencia al alcohol, memoria y aprendizaje (Brickley y Mody, 2012).

3. Receptores GABA_B

Los rGABA_B pertenecen a la súper familia de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G con siete dominios transmembranales, al igual que los receptores metabotrópicos del glutamato (RmGlu), receptores sensores de Ca²⁺ y receptores de la lengua para umami y del sabor dulce (Malcangio, 2017). Es un heterodímero formado por dos subunidades, GABA_{B1} y GABA_{B2} (**Fig. 2**). La subunidad GABA_{B1} contiene un dominio extracelular largo que une al GABA (Bettler *et al.*, 2004) u otro ligando como el baclofen (Benarroch, 2013). La subunidad GABA_{B2} une al receptor con la proteína G. La activación del rGABA_B resulta de un cambio conformacional de las dos subunidades (Benarroch, 2013).

3.1 Función de los rGABA_B

Los rGABA_B juegan un papel muy importante en la inhibición de la transmisión sináptica. En el cerebro, estos receptores están localizados tanto pre y postsinápticamente (Kaupmann *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 2002). Presinápticamente, los autoreceptores GABA_B controlan la liberación de GABA, mientras que los heteroreceptores GABA_B regulan la liberación de otros neurotransmisores como glutamato, noradrenalina, dopamina, 5-HT, sustancia P y somatostatina (Kaupmann *et al.*, 1997). Este efecto presináptico se lleva a cabo principalmente a través de la inhibición de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje de alto umbral tipo N o tipo P/Q vía subunidades G βγ (Bettler *et al.*, 2004).

Los rGABA_B postsinápticos modulan la excitabilidad neuronal mediante la apertura de canales rectificadores de K⁺ vía subunidades G βγ al igual que los presinápticos. Además, en algunas neuronas generan una IPSC por la activación de canales de K⁺ (GIRK o Kir3). El efecto fisiológico de la activación de estos canales es normalmente una salida de K⁺, resultando en una hiperpolarización (Bettler *et al.*, 2004). Además los rGABA_B también pueden inhibir la actividad de la adenil ciclasa (Kerr y Ong, 1995).

3.2 Distribución de los rGABA_B en el cerebro

En el cerebro, la distribución de los rGABA_B es distinta a la de los rGABA_A, aunque hay regiones donde ambos receptores están presentes. La distribución del receptor GABA_{B1} se ha observado en los núcleos septohipocampal, periventricular, supraquiasmático y supraóptico, en células de Purkinje en el cerebelo, y en células granulares y piramidales del hipocampo y giro dentado (Lu *et al.*, 1999). La distribución del receptor GABA_{B2} está presente en la corteza cerebral, tálamo, cerebelo e hipotálamo (Clark *et al.*, 2000).

4. Distribución de los rGABA_A y rGABA_B en la médula espinal y GRD

Las subunidades de los rGABA_A se expresan diferenciadamente en la médula espinal: (i) en la lámina I de Rexed se expresan las subunidades α_2 , α_3 , β_2 , β_3 y γ_2 (Bolhalter *et al.*, 1996; Paul *et al.*, 2012); (ii) en la lámina II también se expresan las subunidades anteriores (Persohn *et al.*, 1991; Bolhalter *et al.*, 1996) y la subunidad α_5 (Paul *et al.*, 2012; Bravo-Hernández *et al.*, 2016; Pérez-Sánchez *et al.*, 2016); (iii) en la lámina III se expresan las subunidades α_1 , α_2 , α_3 , α_5 , β_2 , β_3 y γ_2 (Persohn *et al.*, 1991; Paul *et al.*, 2012), aunque la subunidad α_5 se expresa más abundantemente en la capa interna (Bravo-Hernández *et al.*, 2016) y la subunidad α_3 en la capa externa (Bolhalter *et al.*, 1996); (iv) en las láminas IV y V hay expresión de la subunidad α_5 en células donde no está la subunidad α_1 , además hay una mayor expresión de las subunidades α_3 , β_2 , β_3 y γ_2 en células pequeñas, también se encuentra la subunidad α_2 donde su expresión en la médula espinal es un poco difusa (Bolhalter *et al.*, 1996); (v) en las láminas VI – VIII, las subunidades α_3 , β_2 , β_3 y γ_2 se expresan de manera extendida en las neuronas. En contraste, las subunidades α_1 y α_5 están en un grupo de neuronas más restringidas, mientras que la subunidad α_2 se expresa en muy pocas neuronas aisladas en esta capa. Cabe mencionar que la subunidad α_3 es la subunidad más abundante de las láminas VI – VIII (Bolhalter *et al.*, 1996); (vi) en las motoneuronas (lámina IX) se expresan las subunidades α_2 y γ_2 , aunque algunas también expresan la subunidad α_5 (Bolhalter *et al.*, 1996); (vii) en la lámina X se expresan las subunidades α_1 , α_3 , β_2 , β_3 , γ_2 (Bolhalter *et al.*, 1996) y α_2 (Paul *et al.*, 2012).

También existe evidencia de que los rGABA_B se expresan en la médula espinal. Towers y colaboradores (2000) por medio de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica demostraron que dichos receptores se expresan en las láminas II, IX y X.

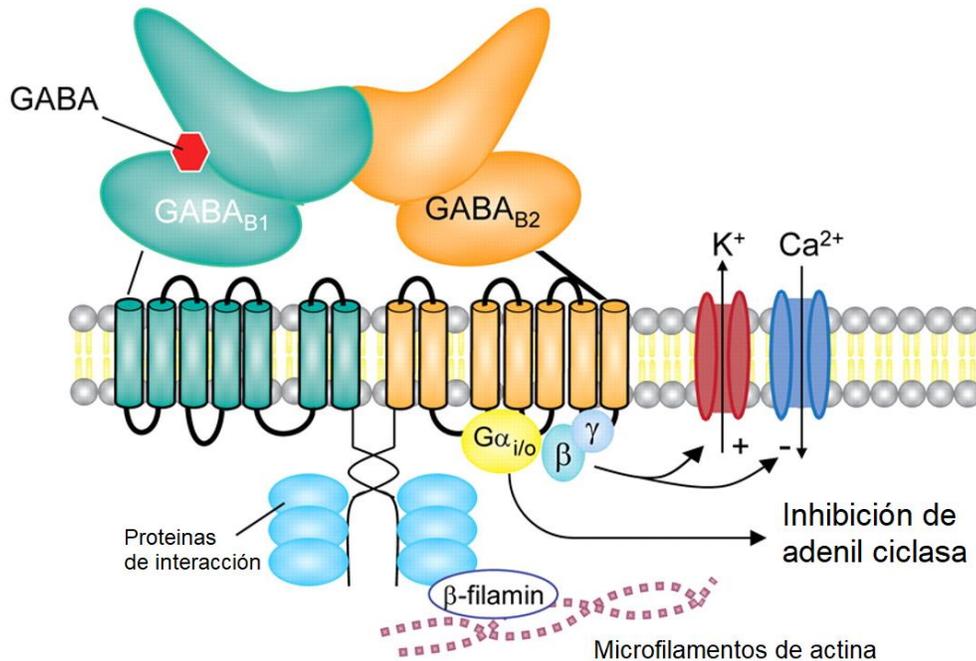


Figura 2. Representación esquemática del rGABA_B. Los rGABA_B poseen dos subunidades GABA_{B1} y GABA_{B2}, la subunidad GABA_{B1} posee el sitio de unión a GABA y la subunidad GABA_{B2} activa la proteína G para activar o inactivar canales de K⁺ y Ca²⁺ dependiendo de su función vía proteína G βγ, también inhibe la adenil ciclasa vía proteína G α_{i/o}. Un gran número de proteínas se han encontrado que interactúan estos receptores con las colas citoplasmáticas como factores de transcripción de zipper de leucina (ATF-4, CHOP), proteínas como 14-3-3, factor sensible a N-etilmaleimida (NSF), tamalina y MUPP-1. Proteínas que interactúan con el citoesqueleto como β-filamentos (Bettler et al., 2004). (Imagen tomada y editada de Benarroch, 2013).

Además de la médula espinal, ambos receptores GABA_A y GABA_B se expresan en el GRD de las FAP, como los rGABA_A con las subunidades α₂ (Persohn et al., 1991; Bolhalter et al., 1996; Paul et al., 2012), α₃ (Bolhalter et al., 1996; Knabl et al., 2008; Paul et al., 2012) y α₅ (Paul et al., 2012; Loeza-Alcocer et al., 2013; Bravo-Hernández et al., 2016). Por otro lado, se ha observado la expresión de las subunidades GABA_{B1} y GABA_{B2} de los rGABA_B en el GRD de las FAP (Towers et al., 2000; Charles et al., 2001)

5. Fibras aferentes primarias

Las FAP son neuronas pseudo unipolares cuyo soma se encuentra en el GRD con una terminal periférica y otra central que emanan desde una rama axonal común (Basbaum *et al.*, 2009). La terminal de la rama periférica del axón es la única parte de la neurona que es sensible a estímulos naturales. Las propiedades de la terminal periférica determinan la función sensorial de cada una de estas neuronas. Las FAP transmiten hacia la médula espinal la intensidad del estímulo codificada en frecuencia de potenciales de acción, con lo cual estas neuronas son adecuadas para cumplir sus dos funciones principales: (i) transducción del estímulo y (ii) transmisión de la información codificada del mismo al SNC (Kandel, 2013).

Las FAP se pueden clasificar por su blanco periférico (por ejemplo, aferente cutánea, articular o visceral), VC (la cual depende de su tamaño y mielinización, entre otros), propiedades de respuesta (incluyendo modalidades sensoriales y la intensidad del estímulo necesario para activarlas) y por el fenotipo neuroquímico (como la expresión de péptidos) (Todd, 2010). Las características antes mencionadas están interrelacionadas. Las aferentes cutáneas mielinizadas (conocidas como fibras A β) surgen de mecanorreceptores de bajo umbral, que responden al tacto o al movimiento del cabello (Todd, 2010; Braz *et al.*, 2014), además las aferentes poco mielinizadas (conocidas como fibras A δ) y las aferentes no mielinizadas (o desmielinizadas) (conocidas como fibras C) provienen de nociceptores o termorreceptores (Millan, 1999; Basbaum *et al.*, 2009). Recientemente, se ha reportado que no todas las fibras C son nociceptores. Interesantemente, un grupo de aferentes desmielinizadas responden a estímulos inocuos (no dolorosos) y están relacionadas a estímulos placenteros al tacto (Olausson *et al.*, 2008).

La velocidad de conducción varía dependiendo de varios factores como el diámetro de la fibra y la presencia o no de mielina (**Tabla 1**). En humanos, la presencia de las fibras C en la piel es del 70%, 10% de A δ y 20% de A α/β (Millan, 1999).

Por sus propiedades neuroquímicas las fibras nociceptivas se dividen en dos grandes grupos (Snider y McMahon, 1998); aquellas que contienen neuropéptidos (también llamadas peptidérgicas), como la sustancia P (Lawson *et al.*, 1997), CGRP, también expresan el receptor a neurotrofina TrkA, el cual responde al NGF (Basbaum *et al.*, 2009; Braz *et al.*, 2014), y aquellas que no contienen neuropéptidos (también llamadas no peptidérgicas) que expresan el receptor a neurotrofina c-Ret y actúa con el GDNF, al igual que neurturina y artemina (Basbaum *et al.*, 2009) además de expresar el receptor a la lectina IB4 (Braz *et al.*, 2014).

5.1 Proyección de las FAP en la médula espinal

En el asta dorsal de la médula espinal, las terminales de las aferentes primarias tienen una distribución específica determinada por su funcionalidad (**Fig. 3**). Las fibras de bajo umbral y de rápida conducción A β , proyectan a las láminas más profundas (III, IV y V). Los nociceptores A δ proyectan a la lámina I y además a la lámina V. En contraste, los nociceptores C proyectan más superficialmente a las láminas I y II (Basbaum *et al.*, 2009; Todd, 2010). Cabe mencionar que las fibras C muestran un patrón de proyección a las láminas más superficiales del asta dorsal (Snider y McMahon, 1998). La mayoría de las fibras C peptidérgicas inervan la lámina I y la parte más dorsal de la lámina II. Por otro lado, las aferentes no peptidérgicas terminan en la región media de la lámina II (Basbaum, 2009). La parte más ventral de la lámina II está caracterizada por la presencia de interneuronas excitadoras que expresan la PKC γ (Malmberg *et al.*, 1997).

Las terminales de las aferentes primarias hacen sinapsis con interneuronas, las cuales abundan en las láminas I – III (Todd, 2010; Braz *et al.*, 2014). Las interneuronas pueden clasificarse en dos principales grupos: excitadoras (glutamatérgicas) e inhibitoras (GABAérgicas y/o glicinérgicas). En la rata, el GABA está presente en ~25%, 30% y 40% de las neuronas de las láminas I, II y III, respectivamente (Polgar *et al.*, 2003). Las interneuronas hacen sinapsis con neuronas de proyección, por ejemplo, en la lámina III las neuronas de proyección que expresan al receptor NK1 recibe numerosas sinapsis de interneuronas

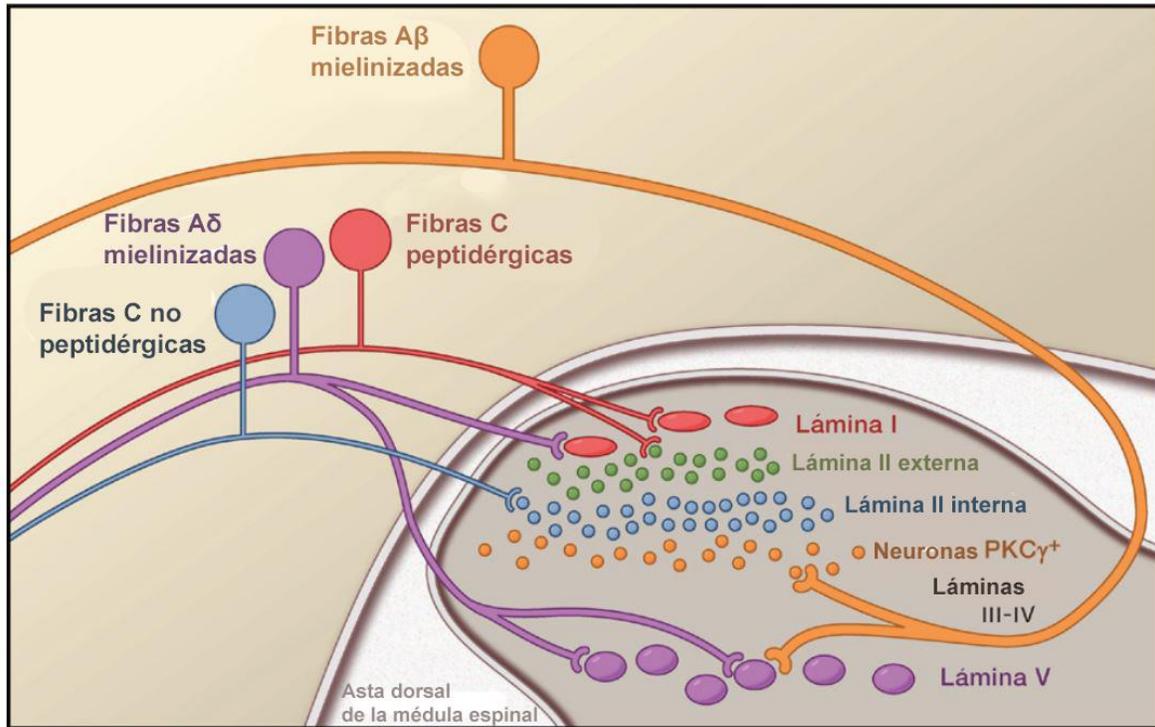


Figura 3. Conexiones entre las FAP y las neuronas de la médula espinal. Existe una organización laminar muy precisa del asta dorsal de la médula espinal; los subgrupos de las FAP inervan a la médula espinal en láminas específicas. Los nociceptores desmielinizados tipo C peptidérgicos (rojo) y los poco mielinizados (morado) terminan sus axones más superficialmente, donde hacen sinapsis con neuronas de proyección (rojo) de la lámina I e interneuronas (verde) de la lámina II externa. Los nociceptores amielinizados no peptidérgicos (azul) hacen sinapsis con interneuronas (azul) en la lámina II interna. En contraste, las terminales de las fibras Aβ mielinizadas (naranja) hacen sinapsis con interneuronas que expresan PKCγ de la región ventral de la lámina II interna, además las fibras Aβ proyectan sus axones a la lámina V (morado), donde convergen con las fibras Aδ (Basbaum et al., 2009). (Imagen editada y tomada de Basbaum et al., 2009).

	Aferente cutánea	Aferente muscular	Humano		Rata	
			Diámetro (μm)	VC (m/s)	Diámetro (μm)	VC (m/s)
Mielinizada	Aβ	II	>10	30 – 100	40	14 – 30
Poco mielinizada	Aδ	III	2 – 6	4 – 36	26 – 40	2.2 – 8
Amielínicas	C	IV	0.4 – 1.2	0.5 - 2.0	<25	0.8 – 1.3

Tabla 1: Diámetro y velocidad de conducción de las fibras aferentes primarias de humano (Kandel et al., 2013) y rata (Harper y Lawson, 1985).

GABAérgicas. Las neuronas gigantes de la lámina I también reciben contacto monosináptico por interneuronas GABAérgicas (Todd, 2010).

6. Dolor

Las neuronas del GRD transmiten la información somatosensorial hacia el SNC codificada en PA. Estas neuronas se clasifican en dos grupos principales: neuronas no nociceptivas que responden normalmente a estímulos no dolorosos; y las neuronas nociceptivas que responden normalmente a estímulos dolorosos (Fang *et al.*, 2005). El dolor se define como una experiencia emocional o sensorial no placentera asociada con el daño tisular real o potencial (IASP, 2011). Esta habilidad de detectar estímulos nocivos o dolor es esencial para el bienestar y sobrevivencia de los organismos (Basbaum *et al.*, 2009).

El dolor puede clasificarse en tres grupos. (i) el dolor nociceptivo, que se encarga de la protección del organismo, en esencia detecta los estímulos nocivos o que puedan ocasionar algún daño (calor, frío, algún objeto filoso, etc.) (Woolf, 2010). (ii) el dolor inflamatorio ocasionado por la activación del sistema inmune por el daño o infección de algún tejido, el cual promueve la activación del sistema inmune para la reparación del tejido causando hipersensibilidad e inflamación. Este tipo de dolor se considera de adaptación y de protección (Woolf, 2010). (iii) Finalmente, se encuentra el dolor patológico, que se produce por un mal funcionamiento del SN en la integración de la información del dolor. Este tipo de dolor no se considera como un síntoma, sino como una enfermedad, el cual ocurre por daño del SNC o SNP (dolor neuropático) o incluso en condiciones en las cuales no hay daño o inflamación (dolor disfuncional). Algunas condiciones que pueden provocar dolor disfuncional son fibromialgia, síndrome del intestino irritable, cistitis intersticial entre otros síndromes en el que existe dolor pero sin estímulo nocivo o patología inflamatoria periférica (Woolf, 2010).

6.1 Dolor neuropático

El término “dolor neuropático” es ampliamente usado para diferentes condiciones causadas por una lesión o enfermedad del SNP o SNC, que usualmente recibe y procesa la información somatosensorial (Jensen *et al.*, 2011). Algunas de las causas que puede generar dolor neuropático son el daño del SNP como neuralgia postherpética, lesión de nervios, neuralgia trigeminal, dolor

postamputación, entre otros más (Jensen y Finnerup, 2014). Adicionalmente, desórdenes del SNC como lesión de la médula espinal o esclerosis múltiple pueden causar dolor neuropático (Jensen y Finnerup, 2014). El dolor neuropático posee dos características clínicas: alodinia (dolor generado por un estímulo que normalmente no causa dolor) e hiperalgesia (un incremento en la respuesta del dolor producido por un estímulo que normalmente causa dolor) (IASP, 2011).

6.2 Neuropatía diabética

Por otro lado, la diabetes puede ocasionar cambios funcionales patológicos tales como retinopatía, nefropatía o neuropatía. Los mecanismos específicos que contribuyen a generar la neuropatía diabética no están completamente entendidos, aunque evidencia experimental muestra que la hiperglicemia, glucotoxicidad y algún daño en la señalización de la insulina podrían activar algunas vías bioquímicas que afectan el metabolismo celular. Estas alteraciones promueven cambios estructurales como la desmielinización segmental y microangiopatía, e induce apoptosis neuronal en el GRD, resultando en daño y pérdida de la mielinización y generando fibras desmielinizadas (Albers y Pop-Busui, 2014).

6.3 Neuropatía por lesión del sistema nervioso periférico

En los modelos de dolor crónico en roedores se evalúa la aparición y mantenimiento de la alodinia e hiperalgesia mecánica mediante filamentos de Von Frey aplicados en la planta de la pata de la extremidad posterior (Li et al., 2000; Kambiz, et al., 2014). Los estudios histológicos y electrofisiológicos han demostrado que la extremidad posterior de las ratas está inervada por el nervio safeno y las ramificaciones del nervio ciático: tibial y sural. (Kaizawa y Takahashi, 1970; Brunner et al., 1980; Swett et al., 1986). El nervio ciático proviene de los nervios espinales L3 hasta L6, aunque sus mayores componentes (tibial y sural) están en L4 y L5 (Schmalbruch, 1986) (**Fig. 4**), siendo muy baja la contribución de los nervios espinales L3 y L6. Se ha propuesto que cerca del 98 o 99% de todos los somas del nervio ciático residen en los GRD de L4 y L5 (Swett et al., 1991; Asato et al., 2000).

Se han propuesto diferentes modelos para generar dolor neuropático a través de la LNE. Modelos como el propuesto por Bennett y Xie (1998) o Seltzer y

colaboradores (1990) consisten en ligar los nervios espinales L4 y L5. Como resultado de tal acción, las ratas presentaban debilidad motriz. Es por ello que se propone una lesión segmental del nervio ciático, la LNE L5 únicamente o ligar L5 y L6 (Kim y Chung, 1992).

7. Función de los receptores a GABA en el GRD de las FAP

En el CNS adulto, los rGABA_A hiperpolarizan las neuronas (Bormann 1988) por la baja concentración intracelular de Cl⁻, la cual es determinada, en parte, por el NKCC1 que permite la entrada de cationes (Kahle *et al.*, 2008) y por el KCC2 y KCC3 que permite la salida de cationes (Kahle *et al.*, 2008). Contrario a lo que ocurre en el SNC, el GABA ejerce un efecto despolarizante en las neuronas sensoriales (Gallagher *et al.*, 1978; Gharagozloo *et al.*, 1990; Spitzer 2010; Zhu *et al.*, 2012) por la alta expresión del NKCC1 en el GRD (Pitcher y Cervero 2010; Bos *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015) mientras que el KCC2 y KCC3 están expresados en niveles más bajos o están ausentes (Alvarez-Leefmans *et al.*, 2001; Kanaka *et al.*, 2001; Price *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2012).

La alta expresión del NKCC1 mantiene altas concentraciones de Cl⁻ intracelular y resulta en un potencial de equilibrio del Cl⁻ positivo respecto al potencial de membrana en reposo, por lo que la apertura de los rGABA_A en las FAP causa una salida de iones de Cl⁻ neta y en consecuencia una despolarización de la neurona (Guo y Hu, 2014). Esta despolarización por GABA causa la PAD (Eccles *et al.*, 1961a; Rudomin y Schmidt, 1999; Kullmann *et al.*, 2005) que paradójicamente, está asociada con la inhibición presináptica (Rudomin y Schmidt, 1999) que regula la liberación de neurotransmisor en las FAP (Guo y Hu, 2014). Aunque no se conocen en detalles los mecanismos que producen la PAD y su correlación con la inhibición presináptica (Rudomin y Schmidt, 1999), existen diversas hipótesis que la explican: (i) la PAD podría mantener inactivados los canales de Na⁺ dependientes de voltaje de los axones de las aferentes primarias e interrumpir la propagación ortodrómica de los PA de la periferia; (ii) la PAD podría atenuar la amplitud de los PA propagados a través de un incremento en la conductancia de la membrana producida por la apertura de canales de Cl⁻ (cortocircuito); (iii) la PAD podría

inactivar canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje en las terminales reduciendo la entrada de Ca²⁺ en la presinapsis y así reducir la liberación de neurotransmisor (Rudomin y Schmidt, 1999; Price et al., 2009; Zeilhofer et al., 2012).

Además de producir la PAD en las FAP, se ha propuesto que los receptores a GABA podrían jugar un papel fundamental en la modulación de la transmisión nociceptiva y en el procesamiento del dolor en la médula espinal (Witschi *et al.*, 2011). Esta suposición está basada en el hecho de que la inflamación o el daño a los nervios generan alodinia, hiperalgesia y dolor espontáneo (Todd, 2010), lo que produce cambios plásticos en las FAP y en la médula espinal, como lo es la reducción de la inhibición GABAérgica y glicinérgica (desinhibición) en la zona superficial del asta dorsal de la médula espinal (Polgár y Todd, 2008) y reducción en la expresión de rGABA_A en el GRD de las FAP (Horch y Lisney, 1981; Kingery *et al.*, 1988; Bhisitkul *et al.*, 1990; Moore et al., 2002).

El procesamiento de la información del dolor se lleva a cabo en el asta dorsal superficial, la cual es mediada por interneuronas inhibitoras GABAérgicas por los rGABA_A y glicinérgicas (Todd, 2010). Esta inhibición generada por estos dos tipos de interneuronas son cruciales para la regulación del procesamiento de la información nociceptiva en la médula espinal y una pérdida de rGABA_A o glicinérgicos puede resultar en una hipersensibilidad al dolor (Bonin y de Koninck, 2013), pero no sólo la pérdida de receptores inhibidores pueden ser la causa de alodinia e hiperalgesia. También es posible que la inhibición GABAérgica sea menos efectiva debido a una alteración en el gradiente aniónico que cruza por la membrana neuronal (Todd, 2010), ésto es resultado de la disminución del KCC2, que mantendría altas concentraciones de Cl⁻ intracelular convirtiendo el efecto del GABA y de la glicina de inhibidor a excitador (Coull *et al.*, 2003; Zeilhofer *et al.*, 2012; Bonin y de Koninck, 2013). Controversialmente, se ha observado que la aplicación de agonistas o MAP de manera intratecal en ratas con dolor neuropático produce analgesia (Todd, 2010; Zeilhofer et al., 2012; Bonin y de Koninck, 2013).

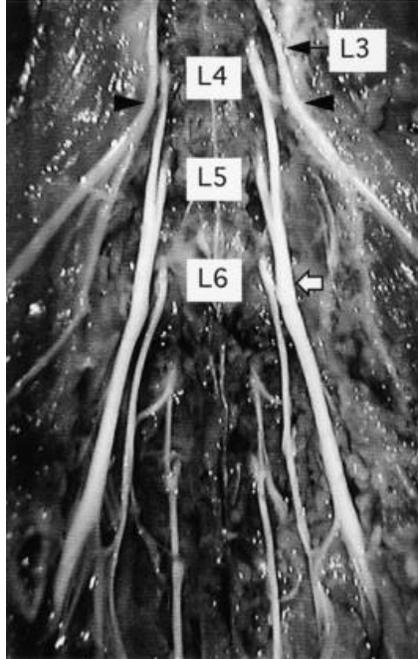


Figura 4. Vista frontal del nervio ciático. El nervio ciático está formado por la unión de L4 y L5. El nervio espinal L6 envía una delgada ramificación al nervio ciático en el lado izquierdo (flecha blanca). Las flechas negras indican la delgada conexión entre los nervios espinales L4 y L3 (Imagen tomada y editada de Asato et al., 2000).

Una de las posibles explicaciones es que la activación de los receptores GABAérgicos del tipo GABA_A restauraría la pérdida de la inhibición de las interneuronas GABAérgicas (Zeilhofer et al., 2012), por otro lado se ha postulado que la actividad de los rGABA_A fásicos, tónicos y glicinérgicos podrían mantener a la neurona cortocircuitada, generando una inhibición. El cortocircuito de la neurona permitiría remover el exceso de Cl⁻ intracelular permitiendo que el GABA pase de excitador a inhibidor, además el cortocircuito de la neurona podría estar deprimiendo la actividad neuronal (Bonin y de Konick, 2013). Aunque este hecho ya es aceptado, es difícil explicar cómo la activación de los rGABA_A produce analgesia (Todd, 2010).

8. Fallas en la propagación de los PA en las neuronas sensoriales.

Las extensas conexiones neuronales a través de los axones o dendritas proveen al sistema nervioso la estructura básica para la señalización y el procesamiento de la información (Zhou y Chiu, 2001). Por ejemplo, las fibras sensoriales antes de que arriben al asta dorsal de la médula espinal, presentan una bifurcación donde se conectan las terminales central (RD) y periférica (NE) con el soma localizado en el GRD, conocida como 'unión T'. Experimentos han mostrado que no todos los PA aferentes que se originan en la periferia llegan al cuerpo celular del GRD (Stoney 1990; Luscher *et al.*, 1994b), lo que sugiere que la unión T del GRD funciona como un interruptor o un filtro pasa bajas, que protegen al soma de una estimulación de entrada excesiva o de alta frecuencia. Esa falla en la propagación de los PA se debe a un desacople de impedancias (Gemes *et al.*, 2013) por las diferentes características eléctricas de las ramas de la neurona sensorial como los diferentes diámetros de los axones central y periférico, así como la capacitancia del soma (Du *et al.*, 2017) (**Fig. 5A**). Este fenómeno se ha observado en ratas adultas sanas (Fang *et al.*, 2005), en cobayos con inflamación periférica (Djoughri *et al.*, 2001) y recientemente en ratas con lesión de nervios espinales (Gemes *et al.*, 2013). Estos últimos autores han observado mediante registros intracelulares de PA de una sola neurona sensorial evocados por estimulación de la raíz central (**Fig. 5B**) que en ratas sanas no todos los PA de un tren de pulsos llegan al soma, caso contrario cuando se produce una lesión de nervios espinales, es decir hay pérdida del filtro. (**Fig. 5C**). Los autores proponen que la falla en la propagación de los PA ocurre en la unión T (Gemes *et al.*, 2013).

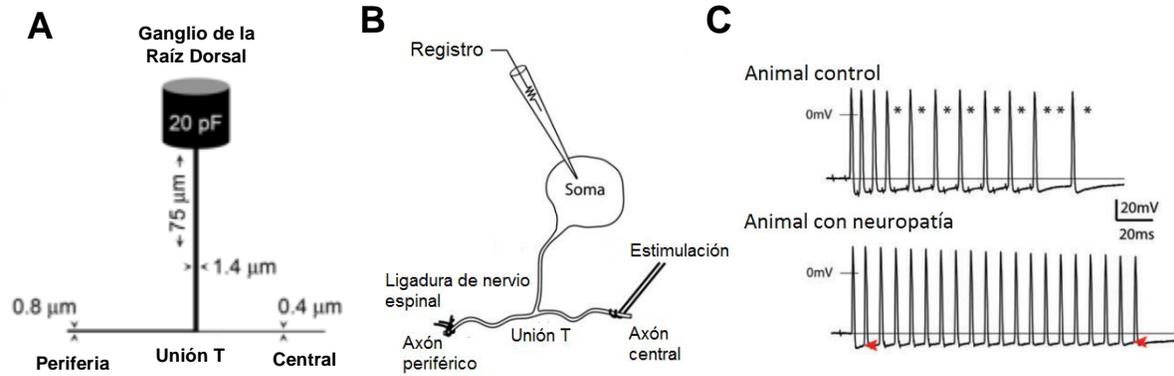


Figura 5. Filtro de PA en la unión T de las FAP. **A.** Esquema mostrando los diámetros de los axones que conforman la unión T de una neurona de las FAP (Imagen tomada y editada de Du *et al.*, 2017). **B.** Esquema mostrando el registro intracelular en el soma de una FAP, así como el sitio de estimulación eléctrica del axón central y el sitio de lesión del nervio periférico (Imagen tomada y editada de Gemes *et al.*, 2013). **C.** Registros de PA del soma de una neurona sensorial evocados por un tren de 20 pulsos eléctricos a 300 Hz; arriba, de una rata naïve y; abajo, de una rata con LNE L5. * PA no registrados en el soma por la estimulación con un tren de 20 pulsos, debido a la falla en la propagación de los PA presente en los animales control (Imagen tomada y editada de Gemes *et al.*, 2013).

Aunque los mecanismos biofísicos y moleculares que subyacen la pérdida de la conducción de los PA no se conocen bien, existen varias propuestas que explican esta propiedad. (i) Se ha observado que la depresión intracelular de Ca²⁺ reduce la falla en la propagación de dichos potenciales en la unión T (Luscher *et al.*, 1994b). (ii) Que la reducción del filtro de la unión T después de la lesión del nervio espinal por axotomización reduce la activación de canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ debido a una pérdida del flujo de Ca²⁺ a través de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Gemes *et al.*, 2013). (iii) Durante la inflamación periférica existe una sobreexpresión de canales de Na⁺ resistentes a TTX que podrían incrementar la corriente a través de ellos o disminuir el umbral de activación de los PA permitiendo que se activen con menor corriente (Djoughri *et al.*, 2001) y (iv) la aplicación de GABA activa a los rGABA_A aumentando la conductancia de la membrana resultando en una falla en la propagación de los PA a través de la unión T (Du *et al.*, 2017).

Planteamiento del problema

El papel de los receptores a GABA en la modulación de la información nociceptiva está ampliamente estudiado en médula espinal, sin embargo poco se ha publicado con respecto a las aferentes primarias. En la tortuga se ha demostrado que los receptores GABA_A y GABA_B se expresan en las aferentes primarias y se encuentran tónicamente activos por el GABA del medio extracelular. Existe evidencia indicando que en la rata se expresan estos receptores tanto en el GRD así como en las terminales de las aferentes primarias. Lo que no se conoce es el origen del GABA que los activa. Se ha propuesto que podría ser liberado por la glía satelital. En un trabajo se ha propuesto que el GABA es sintetizado en el soma de las neuronas sensoriales y liberado en vesículas (Du *et al.*, 2017)

A pesar de que se ha demostrado la expresión de receptores GABA_A y GABA_B en los axones y en el GRD de la rata, no se ha estudiado cómo estos receptores se encuentran tónicamente activos modulando la excitabilidad de la FAP y si esta modulación se altera en ratas con neuropatía inducida por diabetes o por LNE.

Por otro lado, existen estudios que han mostrado la presencia del filtro pasa bajas en la unión T en los diferentes tipos de neuronas sensoriales. No obstante, se desconoce la participación de los receptores al GABA en la función del filtro.

Con base a lo anterior, en este trabajo se plantean las siguientes preguntas: ¿Los receptores GABA_A y GABA_B expresados en las FAP de la rata se encuentran tónicamente activos? ¿Qué cambios produce el bloqueo de estos receptores en la excitabilidad de las fibras aferentes A α / β y C? ¿Se observan los mismos cambios en las ratas con neuropatía inducida por diabetes o LNE?

Hipótesis

En ratas *naïve* y neuropáticas, los receptores GABA_A y GABA_B se encuentran tónicamente activos en las FAP y modulan la excitabilidad de las FAP A α / β y C. Además, en las neuronas sensoriales de ratas neuropáticas diabéticas el filtro de la unión T se pierde.

Objetivos

1. Objetivo general

Determinar el efecto del bloqueo de los receptores GABA_A y GABA_B en la excitabilidad de las aferentes primarias de las raíces L4 y L5 en ratas con neuropatía inducida por diabetes y por LNE. Además, demostrar la existencia del filtro de los PAc en ratas *naïve* y neuropáticas.

2. Objetivos específicos

- a) Determinar el efecto del bloqueo de los receptores GABA_A y GABA_B en el PA evocado por estimulación de las fibras A α / β y C del NE-GRD-RD L4 y L5 en ratas *naïve* y neuropáticas
- b) Determinar el papel de los receptores GABA_A y GABA_B en el componente C en ratas *naïve* y neuropáticas
- c) Demostrar la presencia del filtro de los PA en ratas *naïve* y su pérdida en la neuropatía inducida por LNE y por diabetes
- d) Determinar el efecto del bloqueo de los rGABA_A y rGABA_B en el filtro de los PA.
- e) Determinar el efecto de la activación de los receptores GABA_A y GABA_B en el PA evocado por estimulación de las fibras A α / β y C del NE-GRD-RD L4 y L5 en ratas *naïve*.
- f) Determinar el efecto de la activación de los rGABA_A y rGABA_B en el filtro de los PA.

Materiales y métodos

1. Animales

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo con la aprobación del Comité Ético Experimental del CINVESTAV (0198-16) y de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y manejo de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Se emplearon ratas Wistar adultas hembra (180 – 230 g). Los animales se alojaron individualmente en cajas con acceso libre a comida y agua las 24 hrs y temperatura controlada (24°C), bajo condiciones controladas de luz – oscuridad (12 hrs).

2. Procedimientos generales

Para inducir la diabetes tipo I se les administró estreptozotocina (70 mg/kg) vía i.p. a la edad de 4 semanas. A partir de la semana 4, se hicieron mediciones periódicas semanales de la concentración de glucosa. Se seleccionaron sólo los animales que presentaron niveles de glucosa mayores a 250 mg/dl.

Para inducir neuropatía por LNE, se empleó el modelo propuesto por Kim y Chung (1992). Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (80 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg) vía i.p, colocadas en posición prona para realizar un corte longitudinal en la región sacra para acceder a los NE L5 y L6 que fueron ligados con sutura de 5-0. A las ratas que se les realizó la LNE, se les evaluó la alodinia táctil después de 14 días de la cirugía. En caso de las ratas diabéticas, se les hicieron pruebas de umbral táctil a las 8 semanas después de que presentaran diabetes. Para la prueba de umbral táctil se emplearon filamentos de von Frey con el método up - down, que consiste en estimular la pata de la rata con filamentos en un rango de 3.61 a 6.10 gr. Las ratas que retiraron la pata inferior con filamentos menores a 4 gr se consideraron alodínicas.

Las ratas alodínicas fueron anestesiadas con ketamina (80 mg/kg) y xilazina (5mg/kg) vía i.p. para realizar la laminectomía y extraer los NE-GRD-RD L4 y L5. Los NE-GRD-RD se colocaron en un vaso precipitado que contiene ACSF (en mM: NaCl 126, KCl 2.5, NaHCO₃ 26, MgCl₂ 2, C₆H₁₂O₆ 10, CaCl₂ 2, Na₂HPO₄ 1.25)

burbujeada con una mezcla de O₂ (95%) y CO₂ (5%). Después de la laminectomía, los animales fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital sódico.

3. Registro y estimulación

El PAc se registró colocando el NE-GRD-RD en una cámara de registro previamente perfundida con ACSF a temperatura ambiente (22 – 24 °C). El extremo del NE se succionó con un electrodo de vidrio conectado a un estimulador de pulsos rectangulares (Neuro Data PG400), mientras que el extremo de la RD se succionó con un electrodo de vidrio conectado a un amplificador de AC (Grass P511) con ganancia de x1000 y un filtro pasa bandas de 0.1 a 3 kHz.

El NE fue estimulado con un pulso rectangular (1 pulso cada 5 s, 500 ms, 2xU) durante aproximadamente 3 hrs para su estabilización. Una vez estabilizado el registro del PAc evocado a 2xU, se registró el PAc evocado a las siguientes intensidades: U, 1.5xU, una intensidad necesaria para generar el 50% (~30xU) y el 100% (~50xU) de la amplitud total del componente C. Para cada intensidad se registraron 30 trazos. Posteriormente, se empleó un protocolo de estimulación de un tren de pulsos rectangulares (20 choques, 200 Hz, 1.5xU) para observar la falla en la propagación de los PA. Los registros se digitalizaron a 50x10³ Hz para visualizarlos con el programa AxoScope y analizarlos con el programa Clampfit.

4. Drogas

GABA (5 µM), PTX (100 µM), antagonista de los rGABA_A, L-655,708 (20 µM), agonista inverso de los α₅GABA_A y CGP-55845 (5µM), antagonista de los rGABA_B. Los fármacos fueron diluidos en un matraz que contiene 30 mL de ACSF para alimentar la cámara de registro mediante una bomba.

5. Análisis de datos

El efecto de las drogas en el PAc se determinó calculando el área bajo la curva de 30 registros para cada intensidad de estimulación. Las áreas obtenidas en diferentes experimentos se normalizaron respecto a los registros sin presencia de algún fármaco. Se graficó el promedio del PAc para cada condición empleando el programa OriginPro 8. Para determinar diferencias significativas se empleó la estadística paramétrica ANOVA de una vía.

Resultados

1. La neuropatía por LNE y por diabetes modifica el tamaño del PAc evocado por las aferentes primarias A α / β y C.

El dolor neuropático se puede originar por daño a las FAP, es decir, LNE que produce liberación de sustancias proinflamatorias que modifican la actividad de las neuronas de la médula espinal. También se ha observado que se puede originar, en algunos casos, por diabetes debido a la desmielinización de los axones de las neuronas sensoriales de las FAP produciendo cambios en la velocidad de conducción en estas neuronas. En este trabajo se decidió determinar los cambios que se presentaron en los PAc evocados en las FAP A α / β y C de las ratas con dolor neuropático por LNE y diabetes. Los PAc se evocaron por la estimulación eléctrica en el NE y se registraron extracelularmente en la RD (*Véase Registro y estimulación*) del NE-GRD-RD L4 y L5 (**Fig. 6A**).

1.1 Comparación de los PAc de las FAP A α / β evocados en NE-GRD-RD L4 y L5 de ratas *naïve*, neuropáticas por LNE y diabéticas.

NE-GRD-RD L4

En el PAc de las ratas *naïve*, el área bajo la curva de los PAc a una intensidad de 1.5xU es de aproximadamente $11.4 \pm 0.57 \mu\text{V}\cdot\text{ms}$. Tomando como 100% el área bajo la curva de los PAc de las ratas *naïve*, se encontró que en el PAc de las ratas neuropáticas por LNE disminuye el área bajo la curva pero no de manera significativa ($72.5 \pm 7.95\%$, $n=5$), mientras que el PAc de las ratas neuropáticas por diabetes, el área disminuyó hasta un $26.53 \pm 2.15\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) del respecto al área bajo la curva de los PAc de las ratas *naïve* (**Fig. 6B y 6D**).

NE-GRD-RD L5

En el PAc de las ratas naïve, el área bajo la curva es de aproximadamente $12.9 \pm 0.64 \mu\text{V}\cdot\text{ms}$. Tomando como 100% el área bajo la curva de los PAc de las ratas naïve, se observó que el área bajo la curva de los PAc de las aferentes primarias A α / β de las ratas neuropáticas por LNE disminuyó a $58.41 \pm 3.4\%$ ($p < 0.05$, $n=5$), mientras que el área bajo la curva de los PAc evocados a una intensidad de $1.5xU$ de las ratas diabéticas decreció a $17.41 \pm 1.53\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) (**Fig. 6C y 6E**).

1.2 Comparación de los PAc de las FAP C evocados en NE-GRD-RD L4 y L5 de ratas naïve, neuropáticas por LNE y diabéticas.

NE-GRD-RD L4

En el PAc de las ratas naïve, el área bajo la curva del componente C evocado a una intensidad de $\sim 30xU$ es de aproximadamente $5.68 \pm 0.14 \mu\text{V}\cdot\text{ms}$. Tomando como 100% este valor, se observó que el componente C de las ratas neuropáticas por LNE incrementa de manera significativa hasta alcanzar un valor de $122.05 \pm 6.60\%$ ($p < 0.05$, $n=5$). Sin embargo el área bajo la curva del componente C de las ratas neuropáticas por diabetes disminuye de gran manera alcanzando el $37.43 \pm 4.57\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) respecto al componente C de las ratas naïve (**Fig. 7A y 7C**).

NE-GRD-RD L5

En el caso del PAc de las ratas naïve el área bajo la curva del componente C a $\sim 30xU$ es de aproximadamente $6.01 \pm 0.23 \mu\text{V}\cdot\text{ms}$. Tomando como 100% este valor, se encontró que el área bajo la curva del componente C de las ratas neuropáticas por LNE aumenta de manera significativa en $142.91 \pm 7.6\%$ ($p < 0.05$, $n=5$), valor mayor que el registrado en el NE-GRD-RD L4. Sin embargo, el área bajo la curva del componente C de las ratas neuropáticas por diabetes disminuye a $38.04 \pm 6.63\%$ ($p < 0.05$, $n=6$), valor semejante al encontrado en el NE-GRD-RD L4 (**Fig. 7B y 7D**).

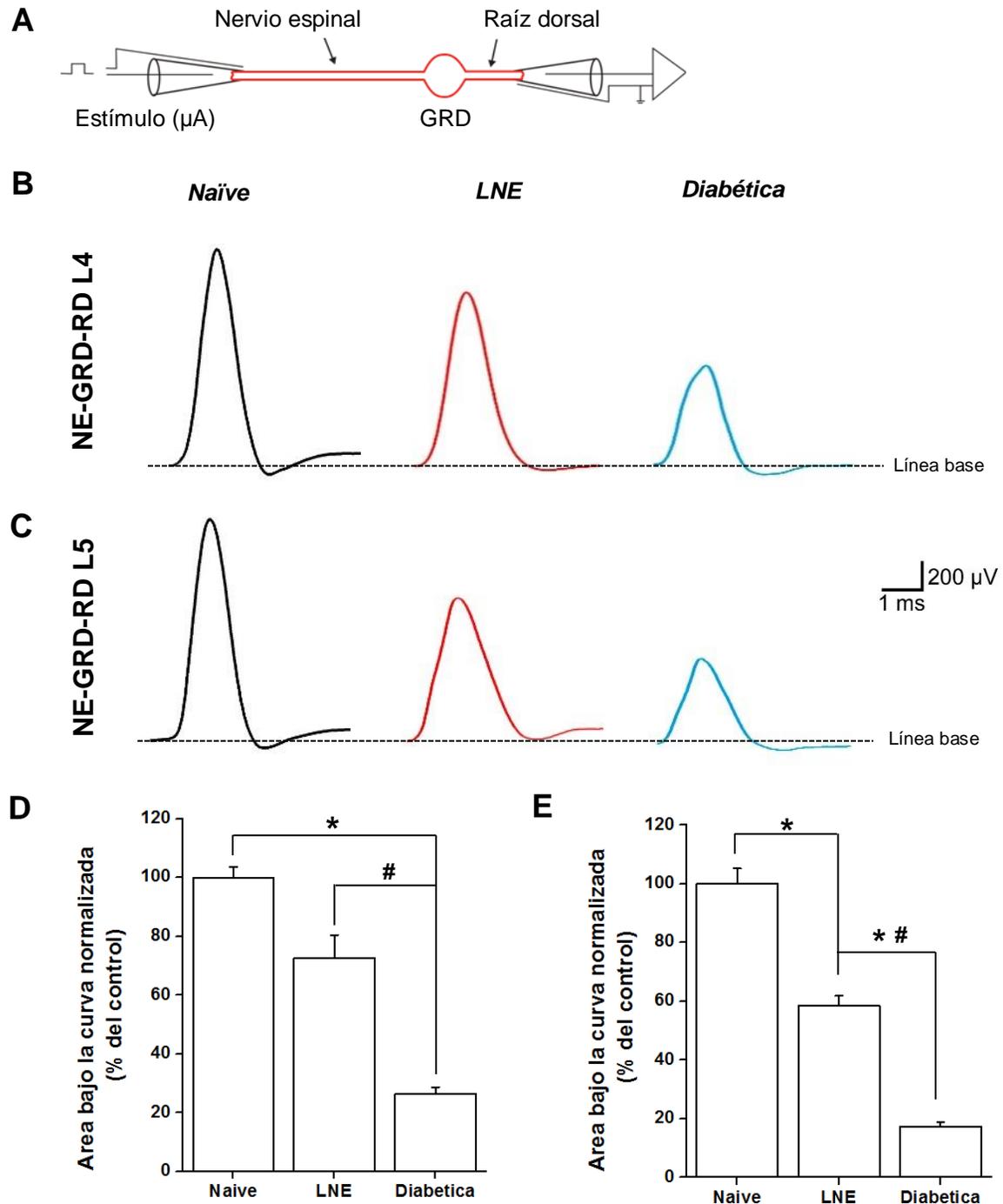


Figura 6. PAC de las FAP A α / β registrados en ratas naïve y con neuropatía por LNE y diabetes. **A.** Esquema que muestra el NE-GRD-RD (L4 o L5) conectados a electrodos de succión para estimular eléctricamente (μ A) las FAP y registrar extracelularmente los PAC en la RD. PAC representativos evocados por estimulación a 1.5xU del **B**. NE-GRD-RD L4 y del **C**. NE-GRD-RD L5 de ratas naïve (negro), neuropáticas por LNE (rojo) y neuropáticas por diabetes (azul). Área bajo la curva de los PAC normalizados respecto al control del **D**. NE-GRD-RD L4 y del **E**. NE-GRD-RD L5. *p < 0.05 vs ratas naïve, #p < 0.05 vs ratas neuropáticas por LNE, ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

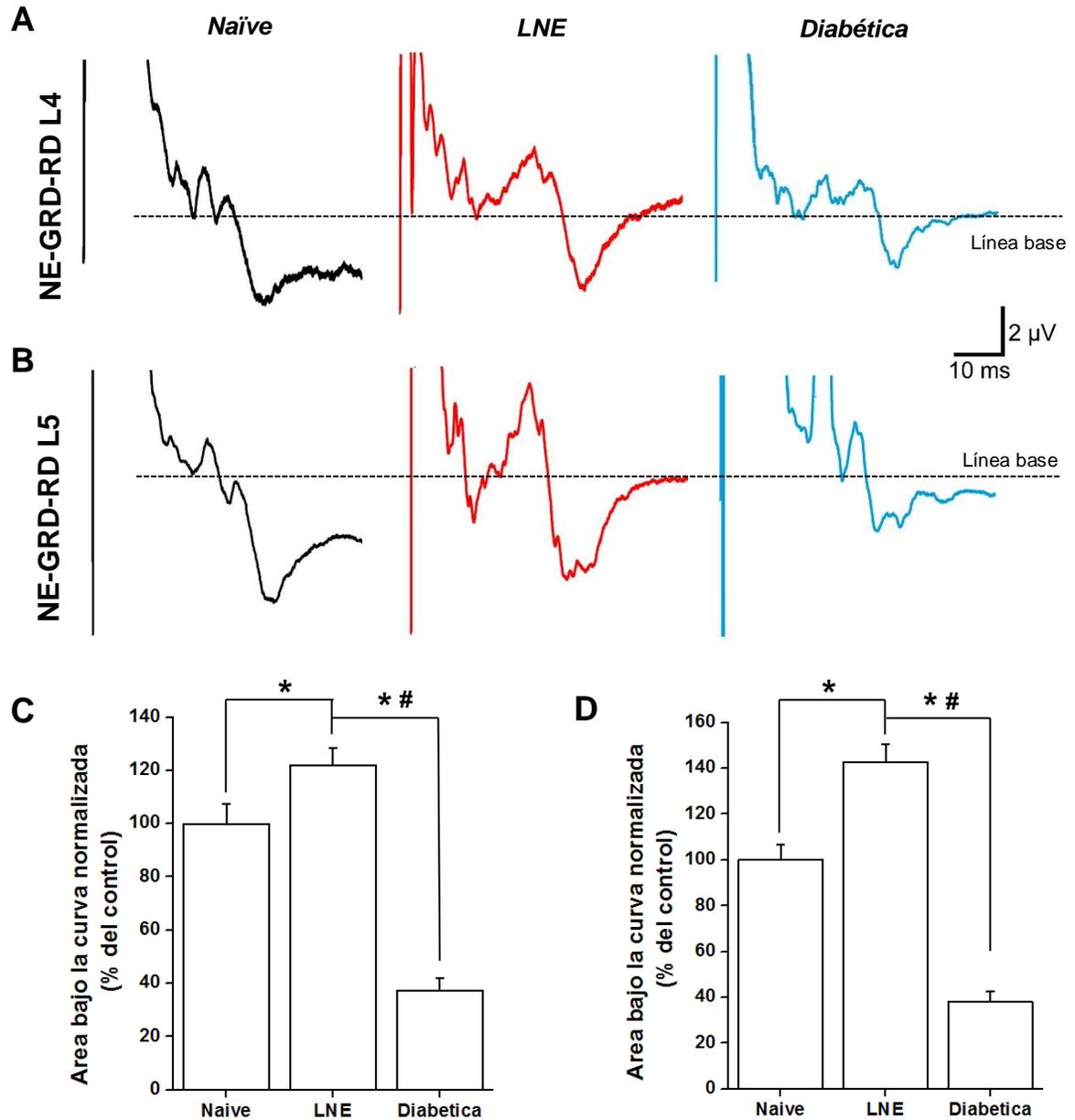


Figura 7. PAC de las FAP C registrados en ratas naïve y con neuropatía por LNE y diabetes. PAC representativos evocados por estimulación a 1.5xU del **A.** NE-GRD-RD L4 y del **B.** NE-GRD-RD L5 de ratas naïve (negro), neuropáticas por LNE (rojo) y neuropáticas por diabetes (azul). Área bajo la curva de los PAC normalizados respecto al control del **C.** NE-GRD-RD L4 y del **D.** NE-GRD-RD L5. * $p < 0.05$ vs ratas naïve, # $p < 0.05$ vs ratas neuropáticas por LNE, ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

2. Función de los rGABA_A y rGABA_B en las FAP A α / β .

En las FAP, los rGABA_A sinápticos regulan la excitabilidad fásica y los rGABA_A extrasinápticos la excitabilidad tónica, como se ha observado en la médula espinal de gato (Levy y Anderson, 1972) y de tortuga (Loeza-Alcocer *et al.*, 2013). Para determinar el papel de los rGABA_A y rGABA_B en la excitabilidad de las FAP A α / β se emplearon diferentes bloqueadores de manera consecutiva: primero se aplica L-655, 708, posteriormente PTX y por último CGP-55845 (véase *Materiales y métodos*).

NE-GRD-RD L4

En el PAc de las ratas *naïve*, el área bajo la curva del PAc evocados por la estimulación de las aferentes primarias A α / β disminuye de manera considerable con la aplicación de L-655, 708 a $63.96 \pm 7.16\%$ ($p < 0.05$, $n=5$). Con la adición de PTX, no se produjeron cambios significativos ($43.97 \pm 6.3\%$, $n=5$), lo mismo sucede en presencia de CGP- 55845 ($44.64 \pm 8.94\%$, $n=5$) (**Fig. 8A**).

En el caso de los PAc de las ratas con neuropatía por LNE, el área bajo la curva del PAc se reduce de manera significativa con L-655, 708 a $50.35 \pm 7.24\%$ del valor control ($p < 0.05$, $n=5$), sin embargo la aplicación de PTX no produce cambios significativos ($32.6 \pm 6.49\%$, $n=5$) y tampoco CGP – 55845 ($33.34 \pm 10.5\%$, $n=5$) (**Fig. 8B**).

En el PAc de las ratas neuropáticas por diabetes, la aplicación de L-655, 708 disminuye el área bajo la curva significativamente a $76.47 \pm 5.5\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) respecto al valor control. La aplicación de PTX no disminuye el área bajo la curva del PAc significativamente ($58.19 \pm 5.29\%$, $n=6$), aunque en presencia de L-655, 708 + PTX + CGP-55845 el área bajo la curva del PAc disminuye significativamente a $44.79 \pm 6.08\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) con respecto al valor obtenido con L-655, 708 (**Fig. 8C**).

NE-GRD-RD L5

En el PAc de las ratas *naïve*, la aplicación de L-655, 708 no afecta significativamente el área bajo la curva ($84.37 \pm 4.96\%$, $n=5$), sin embargo, en presencia de L-655, 708 + PTX disminuye significativamente a $63.76 \pm 4.9\%$ ($p < 0.05$, $n=5$), aunque tampoco disminuye con CGP-55845 ($52.44 \pm 7.63\%$, $n=5$) (**Fig. 8D**). Lo mismo ocurre con en el área bajo la curva del PAc de las ratas neuropáticas por LNE, en presencia de L-655, 708 + PTX disminuye de manera significativa a $55.05 \pm 8.08\%$ ($p < 0.05$, $n=5$), cabe mencionar que la aplicación de L-655, 708 y CGP-55845 no modificaron al área bajo la curva de manera significativa ($72.10 \pm 7.74\%$, $53.26 \pm 9.22\%$, $n=5$; respectivamente) (**Fig. 8E**). Respecto al PAc de las ratas neuropáticas por diabetes, su área disminuye de igual manera en presencia de L-655, 708 + PTX hasta alcanzar un valor de $68.03\% \pm 6.78\%$ ($p < 0.05$, $n=6$), no es así en presencia de L-655, 708 ($90.81 \pm 6.58\%$, $n=6$) o de CGP-55845 ($43.46 \pm 7.47\%$, $n=6$) (**Fig. 8F**).

Estos resultados muestran la participación de los rGABA_A sinápticos y extrasinápticos en la modulación de la información no nociceptiva. Su bloqueo disminuye el PAc, lo que sugiere que estos receptores se encuentran tónicamente activos y cuando estos son bloqueados, se reclutan menos axones por una disminución de su excitabilidad debido a la eliminación de la despolarización tónica mediada por los receptores extrasinápticos, que en este caso son los α_5 GABA_A. Por otro lado, los rGABA_B no parecen estar regulando la excitabilidad de las FAP no nociceptivas tipo A α / β tanto en las ratas *naïve* como en las ratas con neuropatía por LNE y por diabetes, ya que el bloqueo de estos receptores no modifica el PAc de manera significativa.

3. Función de los rGABA_A y rGABA_B en las FAP C.

Para determinar el papel de los receptores a GABA en las fibras aferentes primarias C se investigó la acción de los antagonistas de los receptores GABA_A y GABA_B en el PAc evocando al 50% de la amplitud máxima del componente C y al 100% de la amplitud.

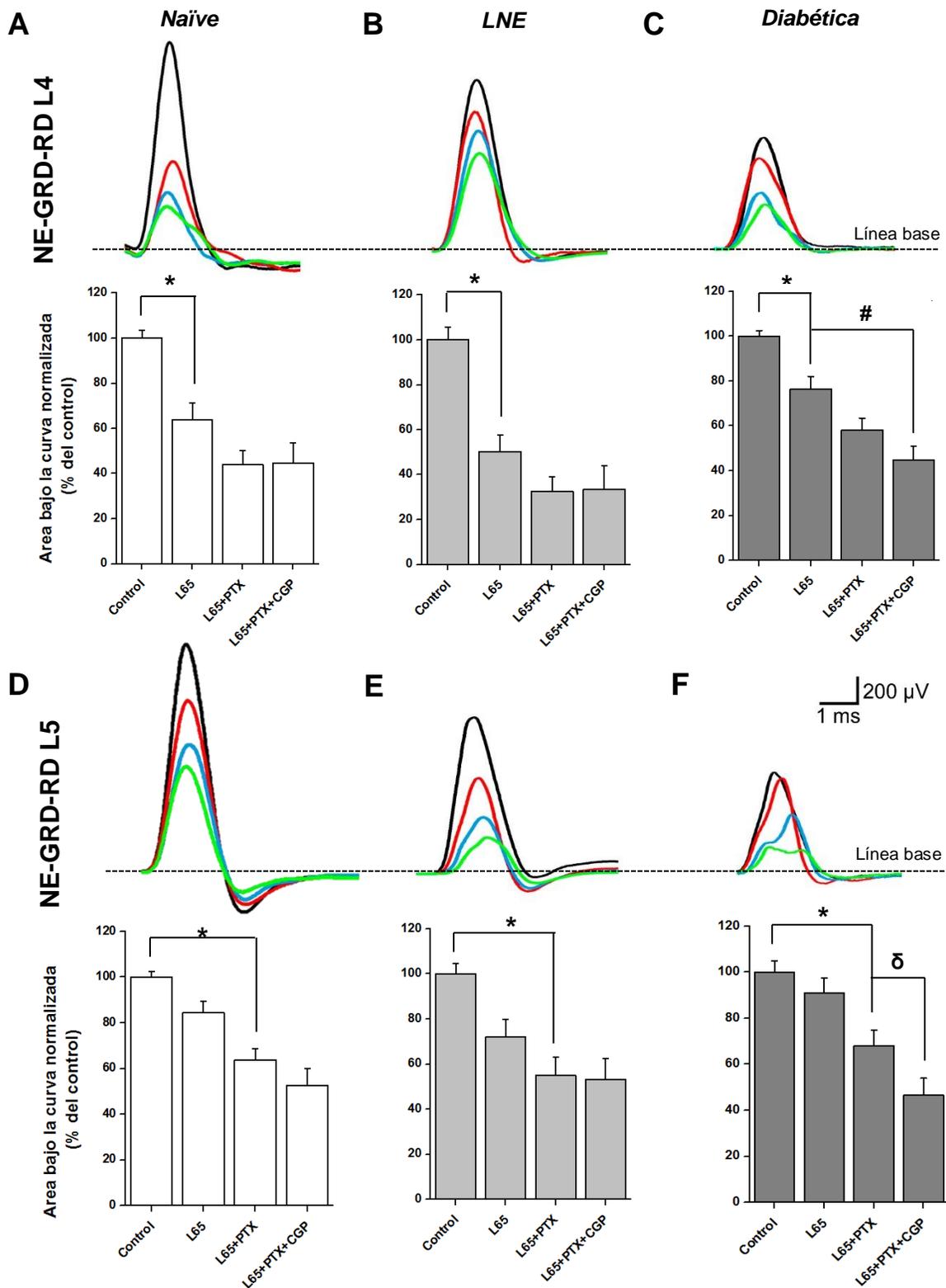


Figura 7. Participación de los receptores GABA_A y GABA_B en el PAC evocado en las fibras aferentes primarias A α / β . (Arriba) PAC representativo obtenido por estimulación a 1.5xU del NE-GRD-RD L4 (trazos superiores) y L5 (trazos inferiores) sin fármacos (negro) y en presencia de L-655,708 (20 μ M - Rojo) + PTX (100 μ M; Azul) + CGP-55845 (5 μ M; Verde). **A y D.** En ratas naïve. **B y E.** ratas neuropáticas por LNE. **C y F.** neuropáticas por diabetes. (Abajo) Gráficas de barras muestran el área bajo la curva de los PAC normalizados con respecto al control para cada condición. * $p < 0.05$ vs control, # $p < 0.05$ vs L-655,708, $\delta p < 0.05$ vs L-655,708 + PTX, ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

3.1 Estimulación a ~30xU

NE-GRD-RD L4

En las ratas *naïve*, el área bajo la curva del componente C incrementa en presencia de L-655, 708 ($109.12 \pm 11.16\%$, n=5), + PTX ($115.95 \pm 12.68\%$, n=5), + CGP – 55845 ($116.42 \pm 12.38\%$, n=5), cabe mencionar que en las tres condiciones no hubo cambios significativos ($p > 0.05$) (**Fig. 9A**). En el área bajo la curva del componente C de las ratas neuropáticas por LNE, disminuye con L-655, 708 ($77.07 \pm 12.27\%$ n=5),+ PTX ($87.23 \pm 15.84\%$, n=5) y + CGP-55845 ($61.27 \pm 8.69\%$, n=5) de manera no significativa (**Fig. 9B**). En cambio, el área bajo la curva del componente C de las ratas con neuropatía diabética disminuye significativamente con la aplicación de L-655, 708 + PTX ($71.25 \pm 6.75\%$, $P < 0.05$, n=6) (**Fig. 9C**).

NE-GRD-RD L5

En el área bajo la curva del componente C de las ratas *naïve* no presenta cambios significativos con ninguno de los tres antagonistas: L-655, 708 ($94.69 \pm 3.07\%$, n=5), + PTX ($90.18 \pm 6.92\%$, n=5), + CGP-55845 ($82.77 \pm 6.93\%$, n=5) (**Fig. 9D**). En el área bajo la curva del componente C de las ratas neuropáticas por LNE, se produce una caída significativa con la aplicación de L-655, 708 a $75.37 \pm 4.51\%$ ($p < 0.05$, n=5), en presencia de PTX disminuye a $68.04 \pm 6.98\%$ (n=5) y con CGP-55845 a $90.93 \pm 7.15\%$ (n=6) sin ser significativos los cambios (**Fig. 9E**). Y por último no se observó ningún cambio significativo en el PAc en las ratas con neuropatía diabética en presencia de L-655, 708 ($74.83 \pm 9.07\%$, n=6),+ PTX ($87.17 \pm 3.81\%$, n=6),+ CGP-55845 ($70.49 \pm 12.08\%$, n=6) (**Fig. 9F**).

3.2 Estimulación a ~50xU

NE-GRD-RD L4

En el área bajo la curva del componente C de las ratas *naïve*, se observa algo semejante a lo ocurrido con el componente C evocado al 50% de su amplitud máxima, el área tiende a aumentar con los antagonistas: L-655, 708 ($108.68 \pm 4.69\%$, n=5),+ PTX ($108.33 \pm 6.64\%$, n=5),+ CGP-55845 ($112.19 \pm 12.87\%$, n=5),

aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto al control (**Fig. 10A**). En el componente C de las ratas con neuropatía por LNE no hubo cambios significativos cuando se bloquean a los α_5 GABA_A (L-655, 708: $94.09 \pm 11.9\%$, n=5), cuando se bloquean a los rGABA_A (+PTX: $92.86 \pm 12.64\%$, n=5) y tampoco cuando se bloquean a los rGABA_B (+CGP-55845: $94.23 \pm 11.14\%$, n=5) (**Fig 10B**). En el caso del área bajo la curva del componente C de las ratas neuropáticas por diabetes tampoco muestran cambios significativos por el bloqueo de los rGABA_A (L-655, 708: $90.08 \pm 2.09\%$, n=6; +PTX: $87.02 \pm 5.2\%$, n=6) y rGABA_B (+GCP-55845: $86.27 \pm 5.33\%$, n=6) (**Fig 10C**).

NE-GRD-RD L5

En el componente C de las ratas *naïve*, tiende a disminuir cuando se aplica L-655, 708 ($89.91 \pm 5.29\%$, n=5), + PTX ($81.57 \pm 9.02\%$, n=5), + CGP-55845 ($66.1 \pm 8.8\%$, n=5) de manera no significativa (**Fig. 10D**).

En el caso del componente C de las ratas que presentaban neuropatía por LNE, los antagonistas no modificaron significativamente el área bajo la curva con L-655, 708 ($100.31 \pm 1.6\%$, n=5), + PTX ($93.43 \pm 4.36\%$, n=5), + CGP-55845 ($89.11 \pm 5.49\%$, n=5) (**Fig. 10E**).

Por otro lado, el componente C de las ratas con neuropatía diabética disminuye el componente C de manera significativa con la aplicación de L-655, 708 + PTX a $73.02 \pm 5.46\%$ ($p < 0.05$, n=6). (**Fig. 10F**).

Estos resultados hasta el momento, muestran que los rGABA_A y rGABA_B no contribuyen de la misma manera en las FAP no nociceptivas A α / β y en las nociceptivas C. Como se observa, el bloqueo de los receptores no produce cambios significativos en el componente C, lo que podría decir que estos receptores, al menos a nivel periférico, no contribuyen en la transmisión de la información nociceptiva tanto en las ratas *naïve* como en las ratas con neuropatía por LNE y por diabetes.

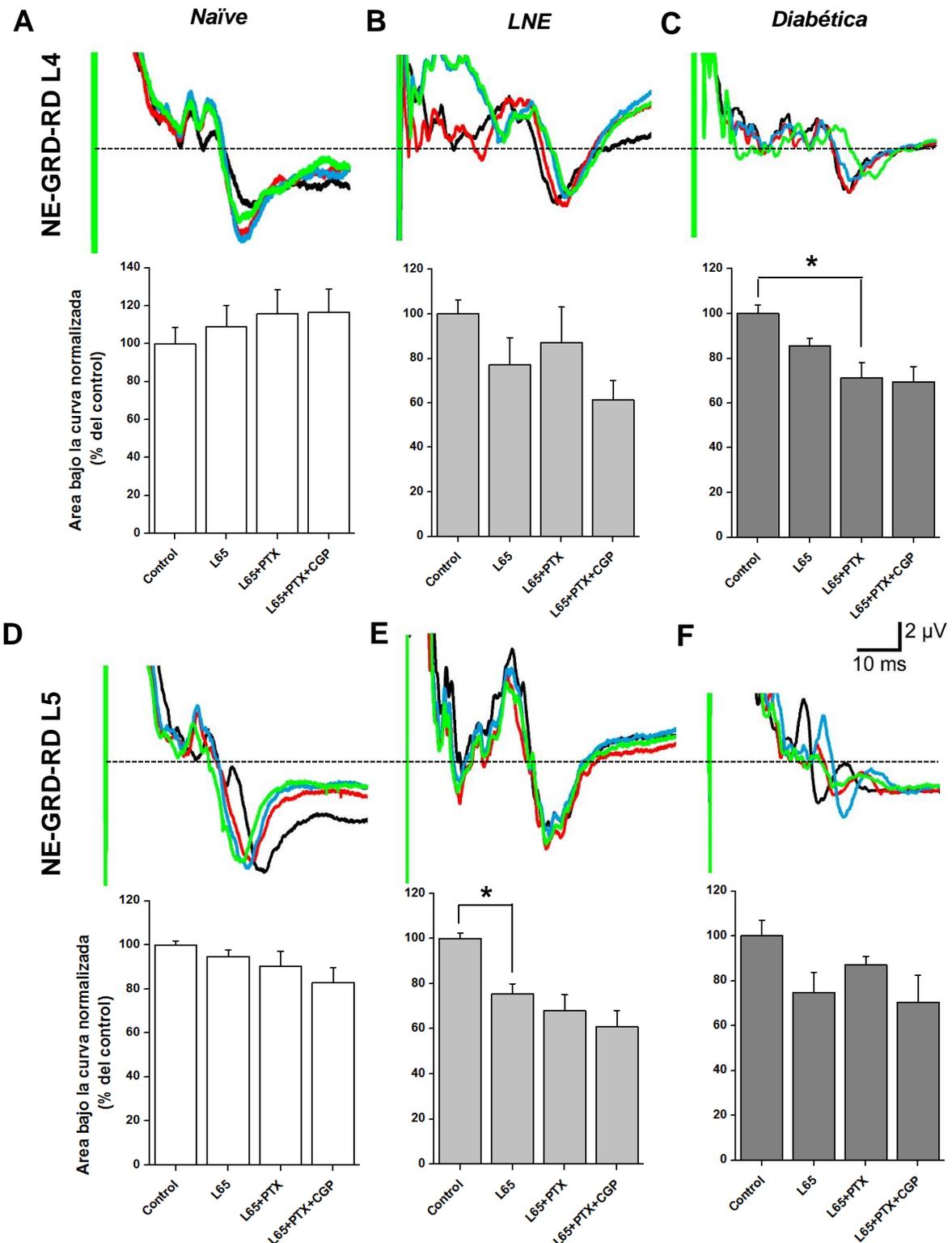


Figura 8. Participación de los receptores GABA_A y GABA_B en el PAC evocado en las fibras aferentes primarias C. (Arriba) PAC representativo obtenido por estimulación a 30xU del NE-GRD-RD L4 (trazos superiores) y L5 (trazos inferiores) sin fármacos (negro) y en presencia de L-655,708 (20 μ M; Rojo) + PTX (100 μ M; Azul) + CGP-55845 (5 μ M; Verde). **A y D.** En ratas naïve. **B y E.** ratas neuropáticas por LNE. **C y F.** neuropáticas por diabetes. (Abajo) Gráficas de barras muestran el área bajo la curva de los PAC normalizados con respecto al control para cada condición. * $p < 0.05$, ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

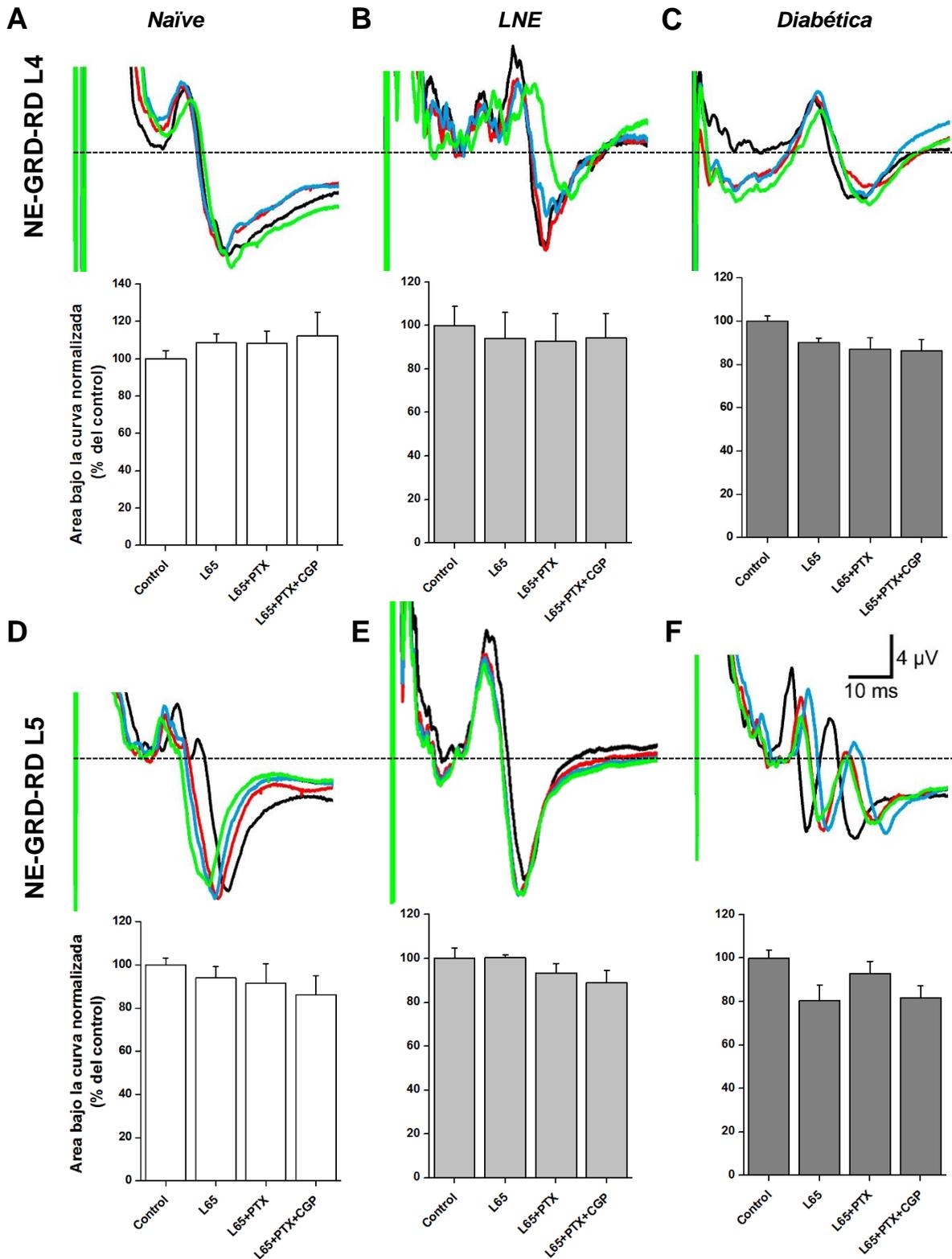


Figura 9. Participación de los receptores GABA_A y GABA_B en el PAC evocado en las fibras aferentes primarias C. (Arriba) PAC representativo obtenido por estimulación a 50xU del NE-GRD-RD L4 (trazos superiores) y L5 (trazos inferiores) sin fármacos (negro) y en presencia de L-655,708 (20 μ M; Rojo) + PTX (100 μ M; Azul) + CGP-55845 (5 μ M; Verde). **A y D.** en ratas naïve, **B y E.** ratas neuropáticas por LNE, **C y F.** neuropáticas por diabetes. (Abajo) Gráficas de barras muestran el área bajo la curva de los PAC normalizados con respecto al control para cada condición. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey

4. Función de los rGABA_A y rGABA_B en propagación de PA de la unión T de las FAP A α / β .

En ratas *naïve* se ha observado la presencia de un filtro pasa bajas, que filtra los PA periféricos que llegan al soma en el GRD, y éste se pierde cuando las ratas presentan neuropatía por LNE o por inflamación. Para determinar el papel de los rGABA_A y rGABA_B se estimuló el NE con un tren de 20 pulsos eléctricos a 200 Hz, de 0.3 ms de duración a una intensidad de 1.5xU para activar únicamente las fibras A α / β .

NE-GRD-RD L4

En los registros de las ratas *naïve*, se observaron cambios en la amplitud de los PAc respecto al primer PAc, donde decaen aproximadamente 50% (**Fig. 11A**), lo que indica que a la frecuencia de 200 Hz los PAc se filtraron en la unión T de las neuronas sensoriales. En presencia de los antagonistas a rGABA_A y rGABA_B, los PAc disminuyeron de amplitud sin que se modificara el patrón observado en el control (**Fig. 11A – D**). Lo mismo que sucede en la estimulación a 1.5xU (**Fig. 8**)

En los registros de las ratas neuropáticas por LNE, no se observan variabilidades en la amplitud de los PAc, únicamente un decaimiento progresivo debido a la frecuencia de estimulación (**Fig. 11E**). Cuando se bloquean los rGABA_A y rGABA_B, disminuyeron la amplitud de los PAc (**Fig. 11F – H**).

Interesantemente, en los registros de las ratas diabéticas se observa una pérdida del filtro como en las ratas neuropáticas por LNE (**Fig. 11I**). Además, la acción de los antagonistas de los receptores a GABA solo producen una caída en la amplitud de los PAc sin observar cambios en el patrón de la pérdida del filtro (**Fig. 11J – L**).

NE-GRD-RD L5

En el NE-GRD-RD L5, ocurre lo mismo que se observa en el NE-GRD-RD L4, tanto en las ratas *naïve* (**Fig. 12A – D**), como en las ratas neuropáticas por LNE (**Fig. 12E – H**). En el caso de los registros de las ratas neuropáticas por diabetes, el patrón de los PAc sin presencia de fármacos es parecido al observado en las ratas

neuropática por LNE, (**Fig. 12I**) y en presencia de los antagonistas de los receptores a GABA, disminuye la amplitud de los PAc (**Fig. 12J – L**).

Estos resultados demuestran que la falla en la propagación de los PAc por estimulación de las fibras A α / β está presente en ratas naïve, como lo han comprobado diversos grupos de trabajo (Stoney 1990; Luscher *et al.*, 1994b; Gemes *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2017) y que la neuropatía por LNE hay pérdida de la falla en la propagación de dichos PAc. Interesantemente, se observó que también hay pérdida del filtro en las ratas neuropáticas por diabetes, fenómeno que no se ha documentado. En cuanto a la función de los rGABA, el bloqueo de estos receptores parece no modificar el patrón del filtro de la unión T de las neuronas sensoriales de las FAP A α / β , tanto en condiciones normales como en el dolor neuropático, sólo la reducción de la amplitud de los PAc como se había observado con la estimulación de un solo pulso.

4.1 Efecto de la EAF en los PAc de las FAP A α / β .

Para determinar los efectos producidos por la EAF, se estimuló con un pulso unitario rectangular a una intensidad 1.5xU. De igual manera, en presencia de los agonistas de los rGABA.

NE-GRD-RD L4

En el área bajo la curva del PAc de ratas naïve, se incrementa en $121.57 \pm 5.25\%$ (n=5) con respecto al área bajo la curva del PAc previo a la EAF. En presencia de L-655, 708 disminuye el área bajo la curva significativamente a $79.87 \pm 8.7\%$ ($p < 0.05$, n=5), en presencia de PTX y CGP-55845 disminuyen su área de manera no significativa a $47.38 \pm 5.58\%$ (n=5) y a $54.22 \pm 9.55\%$ (n=5), respectivamente (**Fig. 13A**). En el caso del PAc de las ratas neuropáticas por LNE, hay un aumento del área bajo la curva de la EAF a $106.58 \pm 8.28\%$ (n=5) respecto al valor previo a la EAF, en presencia de L-655, 708 disminuye significativamente a $80.51 \pm 7.38\%$ ($p < 0.05$, n=5), sin embargo, en presencia de PTX no hay cambios significativos ($77.2 \pm 8.7\%$, n=5) ni con CGP-55845 ($62.53 \pm 8.42\%$, n=5) (**Fig. 13B**). En el caso del área bajo la curva del PAc de las ratas con neuropatía diabética, este

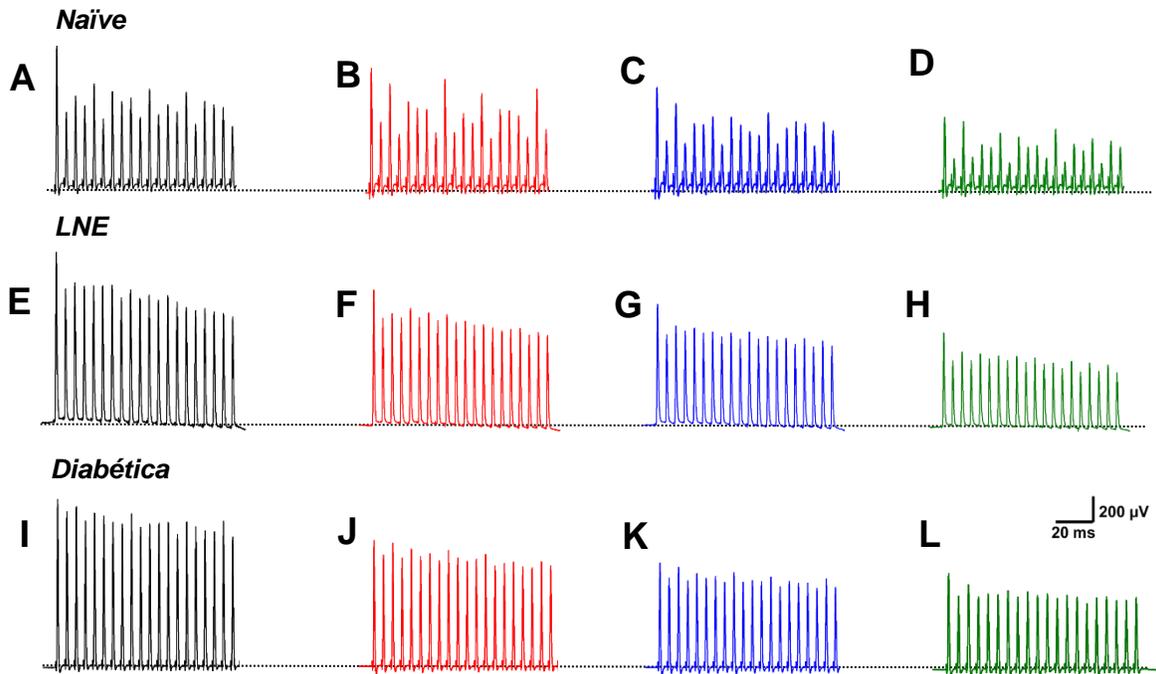


Figura 10. Los receptores GABA_A y GABA_B no participan en el filtro de los PAC de las FAP α/B. Tren de PAC obtenidos por estimulación de un tren de 20 choques, 1.5xU a 200 Hz en el NE-GRD-RD L4 en ratas naïve (trazos superiores), ratas neuropáticas por LNE (trazos centrales) y por diabetes (trazos inferiores), A, E e I. sin fármacos (negro) y en presencia de B, F y J. L-655,708 (20 μM; Rojo), C, G y K. + PTX (100 μM; Azul), D, H y L. + CGP-55845 (5 μM; Verde)

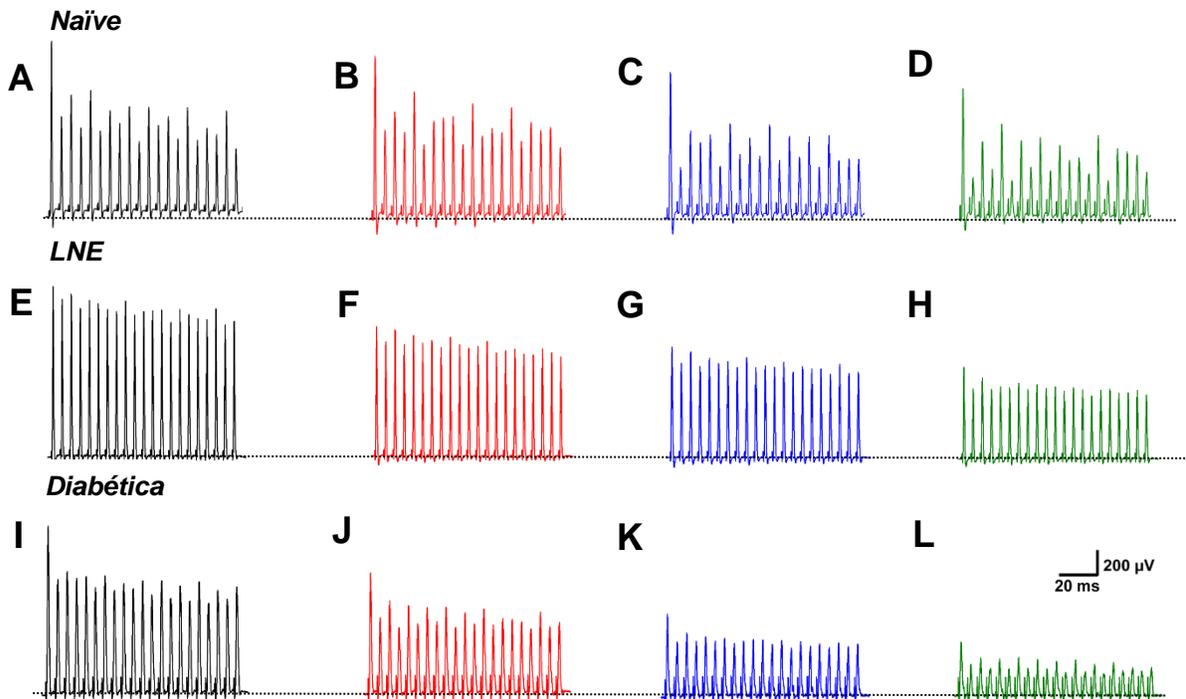


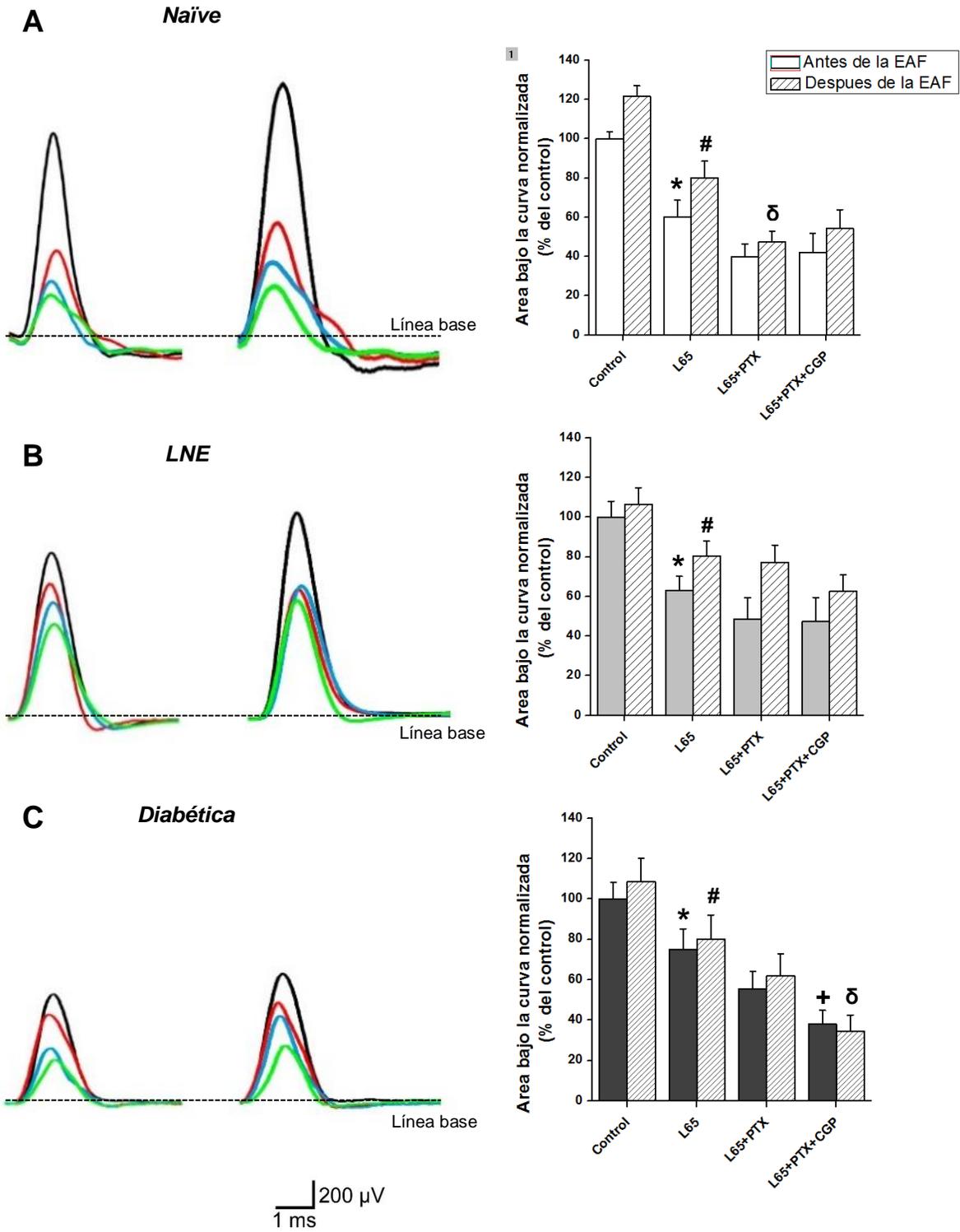
Figura 11. Los receptores GABA_A y GABA_B no participan en el filtro de los PAC de las FAP α/B. Tren de PAC obtenidos por estimulación de un tren de 20 choques, 1.5xU a 200 Hz en el NE-GRD-RD L5 en ratas naïve (trazos superiores), ratas neuropáticas por LNE (trazos centrales) y por diabetes (trazos inferiores), A, E e I. sin fármacos (negro) y en presencia de B, F y J. L-655,708 (20 μM; Rojo), C, G y K. + PTX (100 μM; Azul), D, H y L. + CGP-55845 (5 μM; Verde)

aumenta a $108.6 \pm 11.68\%$ (n=6) sin presencia de fármacos con respecto al área bajo la curva previo a la EAF, aplicando L-655, 708 disminuye de manera significativa a $79.95 \pm 12.21\%$ ($p < 0.05$, n=6), además disminuye en presencia de PTX ($61.78 \pm 10.94\%$, n=6) y CGP-55845 ($34.4 \pm 8.15\%$, n=6) (**Fig. 13C**).

NE-GRD-RD L5

Los efectos en el cambio de la excitabilidad de las aferentes primarias A α / β no son tan notorios como los observados en el NE-GRD-RD L4. En el caso del PAc de las ratas naïve, el área bajo la curva aumenta después de la EAF a $119.7 \pm 5.82\%$, (n=5) sin añadir fármacos. En presencia de los tres bloqueadores disminuye, con L-655, 708 de manera significativa a $92.08 \pm 7.1\%$ ($p < 0.05$, n=5), + PTX ($73.64 \pm 4.96\%$, n=5) y con CGP-55845 ($62.98 \pm 2.89\%$, $p < 0.05$, n=5) (**Fig. 13D**). De manera interesante, el área bajo la curva del PAc de las ratas neuropáticas por LNE no disminuye después de la EAF en condiciones control ($96.92 \pm 6.48\%$, n=5), ni con L-655, 708 ($76.92 \pm 11.75\%$, n=5), PTX ($53.42 \pm 4.55\%$, n=5) o CGP-55845 ($44.83 \pm 3.8\%$, n=5) comparando con el área bajo la curva de los PAc previo a la EAF de cada caso (**Fig. 13E**). En el caso del PAc de las ratas diabéticas, el área bajo la curva no cambia de manera significativa en condiciones control después de la EAF ($109.33 \pm 7.82\%$, n=6), tampoco con L-655, 708 ($88.22 \pm 5.77\%$, n=6), PTX ($61.08 \pm 5.74\%$, n=6) o CGP-55845 ($46.39 \pm 4.16\%$, n=6) comparando con el área de los PAc previos a la EAF (**Fig. 13F**).

Estos resultados muestran los cambios en la excitabilidad de las aferentes primarias A α / β después de la EAF, se observa como aumenta el área bajo la curva de los PAc tanto en el NE-GRD-RD L4 y L5 de las ratas naïve, como en las ratas neuropáticas por LNE y diabetes, lo cual se podría explicar con la liberación del neurotransmisor GABA, el cual activo a más rGABA_A y rGABA_B. En cuanto al bloqueo de los receptores, se observa la misma disminución del área bajo la curva del PAc como sucede con el área de los PAc previo a la EAF, lo cual reafirma que la liberación de GABA provoca el aumento del área bajo la curva y el bloqueo de los receptores lo reduce.



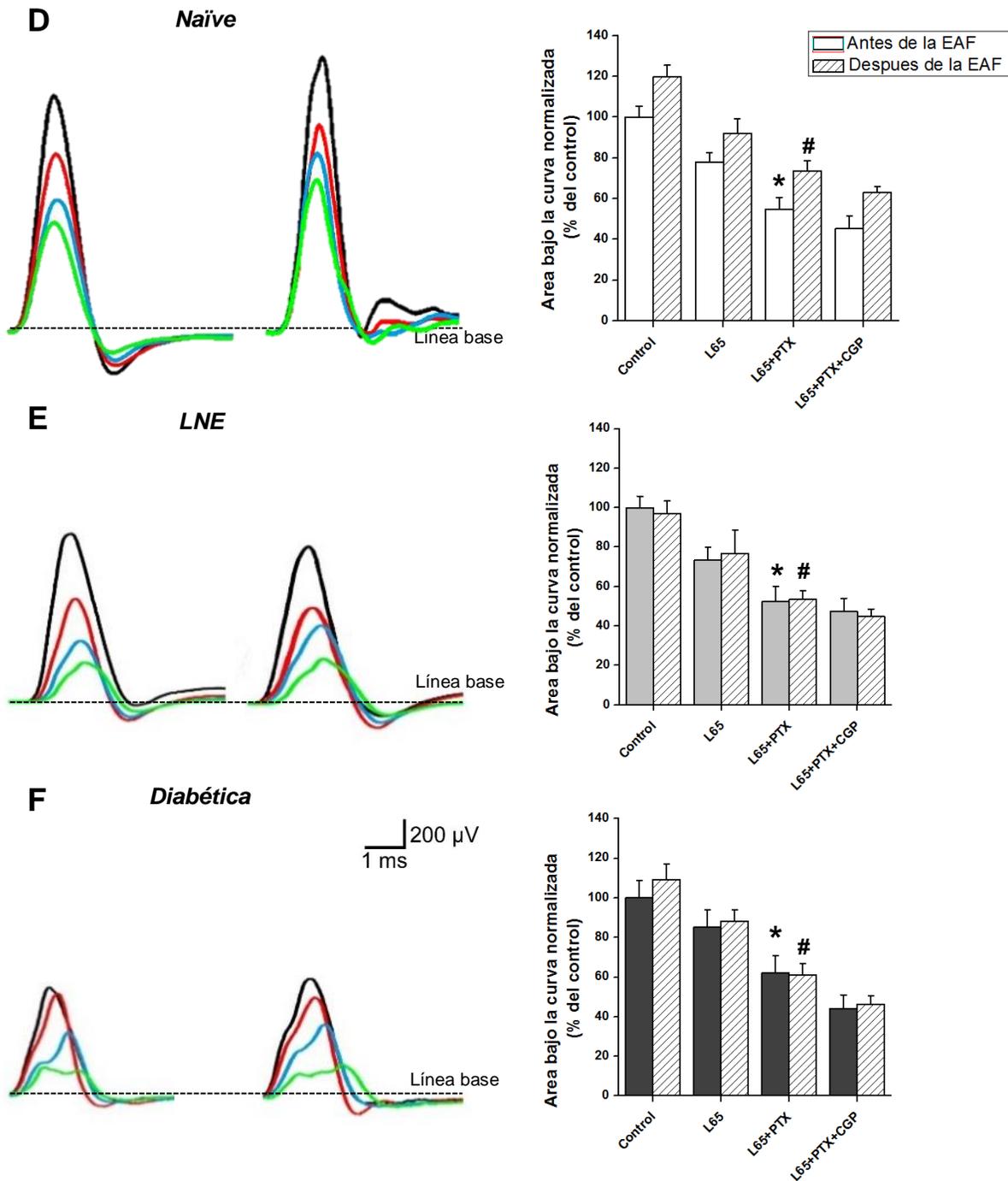


Fig. 12. La EAF aumenta el área bajo la curva del PAC y el bloqueo de los rGABA_A y rGABA_B después de la EAF reduce de igual manera el PAC evocado por estimulación de las aferentes primarias A α / β previo a la EAF. PAC representativos obtenidos por estimulación a 1.5xU del NE-GRD-RD L4 previo a la EAF (izquierda) y después de la EAF (derecha) sin fármacos (negro) y en presencia de L-655,708 (20 μ M; Rojo) + PTX (100 μ M; Azul) + CGP-55845 (5 μ M; Verde) **A.** en ratas naïve, en ratas neuropáticas por **B.** LNE y **C.** por diabetes. PAC representativos del NE-GRD-RD L5 en las mismas condiciones **D.** en ratas naïve, en ratas neuropáticas por **E.** LNE y **F.** por diabetes. Gráficas de barras muestran el área bajo la curva de los PAC normalizados con respecto al control para cada condición. * $p < 0.05$ vs control antes de EAF, # $p < 0.05$ vs control después de EAF, * $p < 0.05$ vs L-655,708 antes de EAF, # $p < 0.05$ vs L-655,708 después de EAF. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

5. El GABA exógeno cortocircuita las membranas de las FAP A α / β y C.

Hasta el momento se ha demostrado que el bloqueo de los rGABA deprime el área de los PAc de las FAP A α / β y C (nociceptivas), lo que sugiere que estos receptores estarían incrementando la excitabilidad de las FAP por la despolarización tónica que producen. Sin embargo, la acción de los antagonistas en algunas condiciones fue marginal, lo que podría haber sido consecuencia de un bajo número de receptores activados. O que no se están expresando los receptores GABA_A extrasinápticos que despolaricen o cortocircuiten las FAP. Por esta razón, se decidió probar si los receptores a GABA se expresan en las FAP mediante la aplicación de GABA exógeno. Si son del tipo extrasináptico en presencia de GABA deberán mantenerse activados ejerciendo una acción tónica despolarizante o un corto circuito (Farrant y Nusser, 2005).

5.1 Acción del GABA exógeno en las FAP A α / β y C.

Para demostrarlo, se aplicó GABA exógeno (véase *Drogas*) para activar la mayoría los receptores a GABA del NE-GRD-RD y cortocircuitar a las neuronas. Estos experimentos se realizaron en el NE-GRD-RD L4 y L5 de ratas *naïve*.

Fibras A α / β del NE-GRD-RD L4 y L5

En el NE-GRD-RD L4 de ratas *naïve*, el área bajo la curva disminuye de manera significativa, casi a la mitad del área del PAc control ($49.28 \pm 5.47\%$, $p < 0.05$, $n=5$) (**Fig. 14A**). Lo mismo sucede en el NE-GRD-RD L5, donde la aplicación de GABA exógeno disminuye de manera significativa el área bajo la curva del PAc ($63.46 \pm 7.59\%$, $P < 0.05$, $n=5$), (**Fig. 14B**).

Fibras C del NE-GRD-RD L4 y L5

En el caso de las aferentes primarias C, en el NE-GRD-RD L4 de las ratas *naïve*, la aplicación de GABA exógeno produce el mismo efecto que en las aferentes primarias A β . El componente C registrado al 50% de su amplitud total, disminuye significativamente ($69 \pm 6.9\%$, $P < 0.05$) (**Fig. 14C**) y sucede lo mismo en el NE-GRD-L5, el GABA exógeno disminuye el PAc significativamente, reduciéndolo casi

un 75% respecto al control ($24.78 \pm 1.94\%$, $P < 0.05$, $n=5$) (**Fig. 14D**). Esto también se observó en el componente C con el 100% de su amplitud total, el GABA exógeno disminuyó de manera significativa el área bajo la curva del PAc tanto en el NE-GRD-RD L4 ($58.82 \pm 6.86\%$, $P < 0.05$, $n=5$) (**Fig. 14E**) como en el NE-GRD-RD L5 ($33.65 \pm 8.54\%$, $P < 0.05$, $n=5$) (**Fig. 14F**).

Estos datos muestran que el cortocircuito generado por la activación tónica y fásica de los rGABA disminuyen de manera considerable la excitabilidad tanto de las aferentes primarias A α / β como las C, lo cual podría explicar que el cortocircuito de las neuronas nociceptivas disminuye la nocicepción, como se refleja en la disminución del área bajo la curva del componente C hasta un 75%.

6. El cortocircuito de las neuronas sensoriales no modifica la falla en la propagación de PA en las aferentes primarias A β

En ratas *naïve*, se encontró que la aplicación de GABA exógeno es capaz de producir un cortocircuito membranal tal que reduce en al menos 40% el área bajo la curva del PAc de las fibras A α / β , por lo tanto se investigará si la activación de los rGABA modifica la propagación de los PAc evocados por estimulación de las aferentes primarias A α / β en presencia de GABA exógeno.

Para ello se probó el efecto que produce la EAF antes y después de la aplicación de GABA exógeno. Como se demostró anteriormente, el NE-GRD-RD L4 de las ratas *naïve* filtran los PAc evocados por estimulación de las aferentes primarias A α / β (**Fig. 15A**) y la aplicación de GABA exógeno redujo la amplitud de los PAc (**Fig. 15B**). Lo mismo sucede en el NE-GRD-RD L5 de las ratas *naïve*, donde hay presencia de un filtro pasa bajas (**Fig. 15C**) y la amplitud de estos PAc disminuyen de manera significativa por la activación de los receptores GABA (**Fig. 15D**).

Del mismo modo, se comprobó si la EAF modifica la excitabilidad de las aferentes primarias A α / β con la activación de los receptores GABA. Lo que se observó fue que hubo cambios significativos por el cortocircuito de las neuronas sensoriales tanto en el NE-GRD-RD L4 (**Fig. 15E**) como en el NE-GRD-RD L5 (**Fig. 15F**).

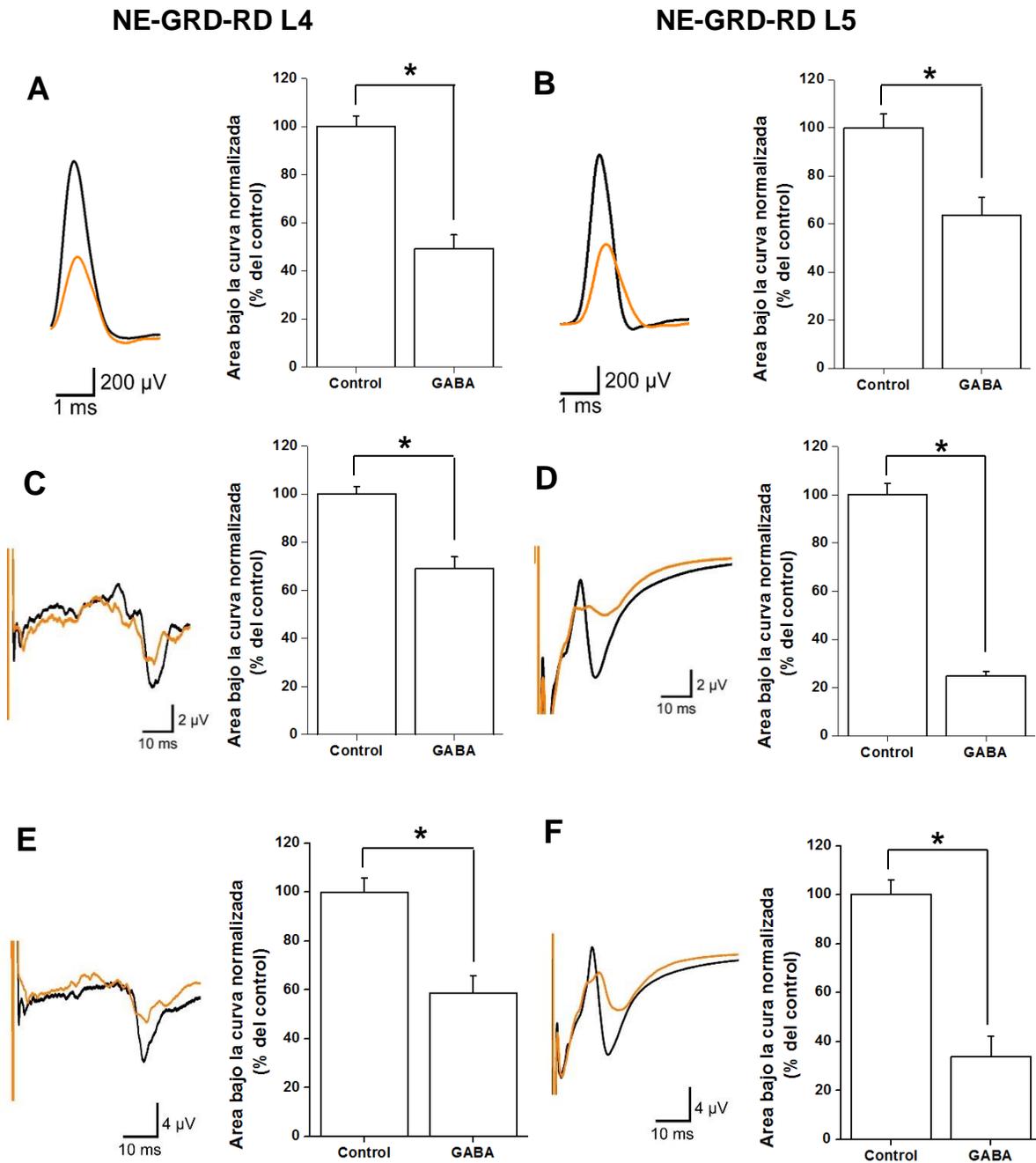


Fig. 13. El GABA exógeno cortocircuita a las neuronas de las aferentes primarias A α / β y C. (Izquierda) PAc representativo obtenido por estimulación a 1.5xU de ratas naïve sin fármacos (negro) y en presencia de GABA (5 μ M - Naranja) **A.** en el NE-GRD-RD L4 y **B.** en el NE-GRD-RD L5. Componentes C obtenidos por estimulación a ~20xU de ratas naïve en presencia de GABA (5 μ M) **C.** en el NE-GRD-RD L4 y **D.** en el NE-GRD-RD L5. Componentes C obtenidos por estimulación a ~50xU de ratas naïve en presencia de GABA (5 μ M) **E.** en el NE-GRD-RD L4 y **F.** en el NE-GRD-RD L5. (Derecha **A - F**) Área bajo la curva de los PAc normalizados respecto al control. * $P < 0.05$ vs control. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

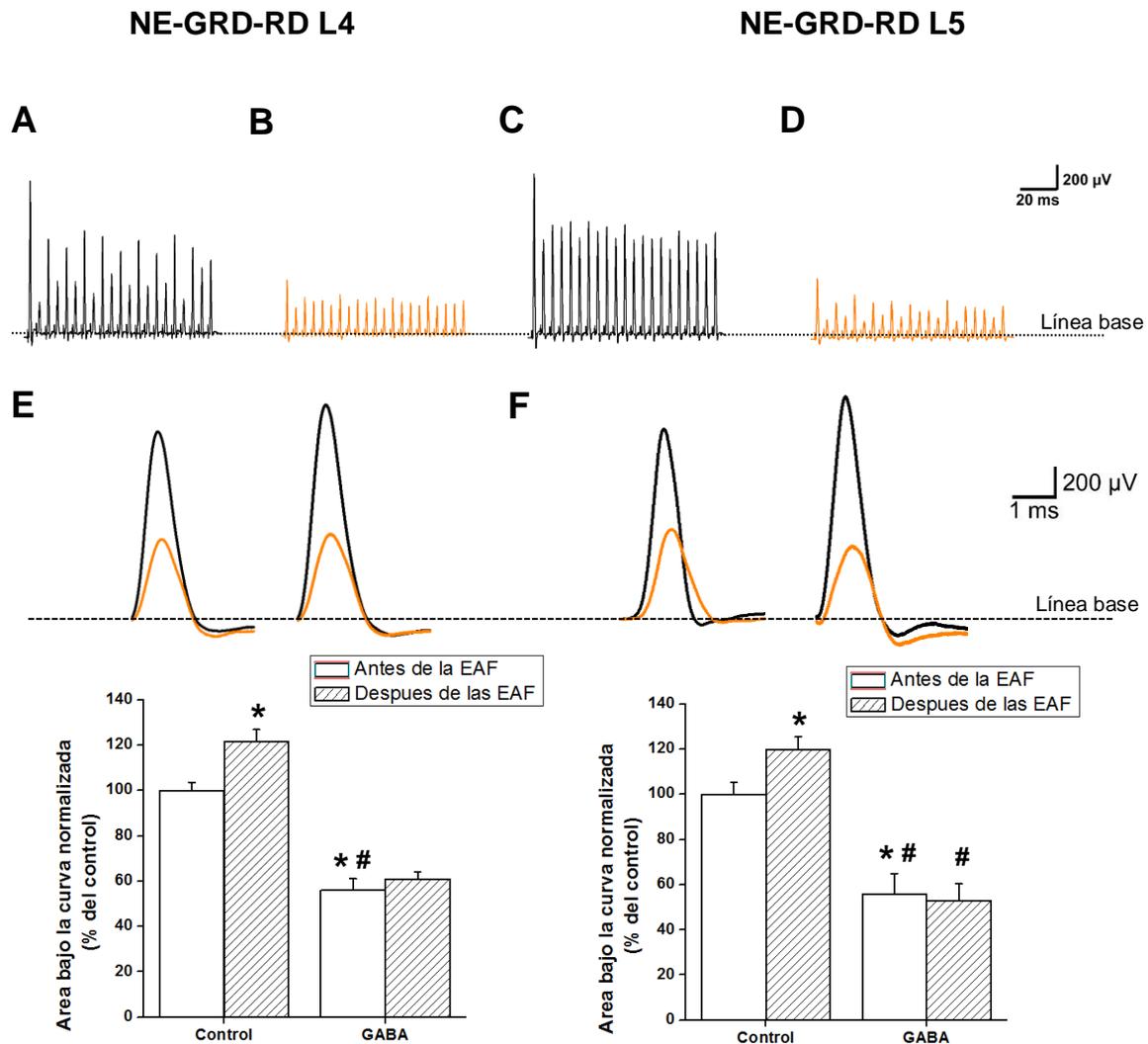


Fig. 14. El GABA exógeno no altera el filtro de las neuronas sensoriales de las aferentes primarias A α / β y tampoco su excitabilidad. Tren de PA evocados por estimulación de un tren de 20 choques, 1.5xU a 200 Hz en el NE-GRD-RD L4 de ratas naïve sin GABA exógeno (negro) y con GABA exógeno (5 μ M - Naranja), **A.** control, **B.** con GABA, y en el NE-GRD-RD L5 **C.** control, **D.** con GABA. **E.** (Arriba) PAc representativos obtenidos por estimulación a 1.5xU del NE-GRD-RD L4 previo a la EAF (izquierda) y después de la EAF (derecha) sin fármacos (negro) y en presencia de GABA (5 μ M) en ratas naïve. **F.** PAc representativos del NE-GRD-RD L5 en las mismas condiciones en ratas naïve. (Abajo **E** - **F**) Área bajo la curva de los PAc normalizados respecto al control. * $P < 0.05$ vs control antes de EAF, # $P < 0.05$ vs control después de EAF. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

Esto comprueba nuevamente que tanto los rGABA_A y rGABA_B, al menos en ratas naïve, no desempeñan una función importante en la propagación de los PA a través de los axones de las neuronas sensoriales del GRD de las FAP.

Discusión

La neuropatía por LNE y por diabetes producen cambios electrofisiológicos en los PAc generados por estimulación de las fibras A α / β y C

En este trabajo se observaron cambios en los PAc en ratas con neuropatía por LNE como son la amplitud, latencia y forma, tal y como se había reportado previamente en otros estudios por LNE (Liu *et al.*, 2000; Sapunar *et al.*, 2005) y por axotomía (Kim *et al.*, 1998), donde observaron, mediante registros intracelulares la despolarización del potencial de membrana en reposo, el incremento en la excitabilidad de las fibras y cambios en la velocidad de conducción. Esto se debe a que en la neuropatía se producen diversos cambios en las aferentes primarias y en médula espinal, como la alta expresión de inmunoreceptores en los nociceptores como son: interleucinas (IL-1 β e IL-6), TNF- α , bradiquinina, prostanoïdes entre otros (Oprée y Kress, 2000). En el caso del daño a los nervios espinales ocurre toda una cascada de respuesta inmune, como la producción de macrófagos, activación de células T y un incremento en la expresión de citosinas proinflamatorias (Campbell y Meyer, 2006). Estos factores producen cambios en la expresión de canales y de receptores a neurotransmisores lo cual incrementa la excitabilidad de las fibras (Millan, 1999).

Se ha observado que el PAc evocado por la estimulación de las fibras A α / β en las ratas con neuropatía por LNE, la amplitud es menor comparada con una rata *naïve* estimulando a la misma intensidad (1.5xU), aunque el U puede diferir entre las *naïve* y las neuropáticas, se observó que el U era mayor en las ratas con alguna neuropatía (datos no mostrados) comparado con una rata sana. Los cambios en la amplitud y forma de los PAc se deben a cambios en la expresión de canales de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺. En la neuropatía se ha observado un decremento de canales de Na⁺ resistentes a TTX como los son el Na_v 1.8 (Lai *et al.*, 2002) y Na_v 1.9 (Boucher *et al.*, 2000), por consecuencia un decremento en la corriente neta de Na⁺ la cual podría explicar la disminución en la amplitud y en la VC (Liu *et al.*, 2000; Sapunar *et al.*, 2005) de los PAc en el NE-GRD-RD L5. Estos cambios en la expresión de canales de Na⁺ van acompañados de una baja expresión de rGABA_A después de

un daño de NE (Horch y Lisney, 1981) que también podrían contribuir en los cambios en forma y en VC de las ratas neuropáticas por LNE (Oyelese y Kocsis, 1996).

Además de un déficit de canales de Na⁺ resistentes a TTX, la lesión de nervios espinales modifica la expresión de canales de K⁺ ya que se ha reportado que existe una disminución de la corriente de K⁺ después del daño axonal (Everill y Kocsis, 1999; Krames, 2015) lo cual podría explicar el incremento en la activación neuronal (Liu *et al.*, 2000; Sapunar *et al.*, 2005) e incluso convertir a la neurona hiperexcitable (Everill y Kocsis, 1999), esto se debe a la reducción del efecto hiperpolarizante de la corriente de K⁺ y que podría contribuir al aumento en el umbral de disparo de los PAc (Everill y Kocsis, 1999).

En el caso de la corriente de Ca²⁺ existe controversia en cuanto a la expresión de dichos canales. Algunos trabajos proponen que existe una disminución en la corriente de Ca²⁺ dependiente de K⁺ (Scholz *et al.*, 1998; Sapunar *et al.*, 2005), canales de Ca²⁺ de alto umbral de activación (Blair y Bean, 2002). Otros grupos de investigación proponen que existe un aumento en la corriente de Ca²⁺ (Kim *et al.*, 1998) como son los canales de Ca²⁺ tipo N (Abdulla y Smith, 1997), en el trabajo de Ojeda (Tesis, 2008) apoya que existe un aumento de los canales de Ca²⁺ y que son responsables de la excitabilidad de las aferentes primarias A α / β e incluso participan en la generación de PA. Estas diferencias podría deberse al modelo para estudiar el dolor ya sea por inflamación, constricción de NE o LNE (Krames, 2015).

Estas alteraciones en la expresión de los canales después de la LNE producen cambios en las propiedades eléctricas de la membrana, ocasionando que incremente la excitabilidad de las fibras A α / β . Además se ha demostrado que estos cambios provocan el disparo de actividad ectópica en estas fibras, que como se sabe se encargan de la sensación de tacto, presión y vibración (incluso la propiocepción) (Liu *et al.*, 2000), esta actividad espontanea se ha demostrado que favorece la sensibilización central, por lo tanto la entrada aferente por la fibras de bajo umbral podrían favorecer la sensación de dolor (Campbell *et al.*, 1988; Torebjörk *et al.*, 1992; Koltzenburg *et al.*, 1994) lo que podría explicar el aumento

del componente C en las ratas neuropáticas por LNE en el NE-GRD-RD L5. Otra explicación del aumento del componente C en el NE-GRD-RD L5 podría ser por el incremento en la duración de los PA de estas FAP registradas en el soma del GRD, atribuido a un aumento de la expresión de canales de Ca²⁺. Este efecto se demostró en el trabajo de Ojeda, mediante el bloqueo de los canales de Ca²⁺ tipo T y N revierte el incremento del área de los PAc en ratas neuropáticas por LNE (Tesis, 2008).

Otra posibilidad que explicaría la reducción de la amplitud y latencia de los PAc durante la neuropatía por LNE es la desmielinización de los axones. Este proceso se debe a la acción de los macrófagos liberados por la lesión de nervios mielinizados, ya que se les atribuye como las principales células involucradas en el proceso de degeneración “Walleriana” (Fu y Gordon, 1997; Milan 1999), debido a que los macrófagos secretan sustancias proinflamatorias y citosinas pronociceptivas como el TNF- α , que está involucrado en el proceso de desmielinización (Milan 1999). Por lo tanto, la VC de las fibras mielinizadas disminuiría debido a la desmielinización y a su vez disminuiría la amplitud de los PA generados por estas fibras, contribuyendo a la información nociceptiva que se transmite a través de las fibras primarias C, lo que explicaría la presencia de alodinia e hiperalgesia durante el dolor neuropático por LNE.

En resumen, los mecanismos antes mencionados producen cambios en la generación de PA o incluso cambios en la propagación de dichos potenciales a través de los axones lesionados por la LNE, que se reflejan como cambios en la forma y latencia de los PA.

Interesantemente, también se observó aumento del componente C en el NE-GRD-RD L4, sitio donde no hubo lesión. Esto podría explicarse a que las terminaciones de las aferentes primarias desmielinizadas de L4 y L5, en ratas, no corresponden estrictamente a los segmentos espinales donde los nervios los inervan (L4 y L5 respectivamente), sino que se extienden dos segmentos rostralmente y un segmento caudalmente (Shehab et al., 2008). Dicho esto, los cambios neuroquímicos ya descritos previamente ocurridos después de la LNE L5 no toman lugar únicamente en el segmento espinal L5 sino que se extiende también

en los segmentos espinales rostrales (L3 y L4) y caudal (L6), los cuales reciben entradas de las aferentes primarias de nervios no lesionados (Shehab, 2015), lo cual podría producir actividad espontánea y contribuir en el incremento de la excitabilidad de las FAP C

En el caso de la neuropatía diabética se ha reportado una disminución en la VC de las aferentes primarias mielinizadas largas (Moore et al., 1980) al igual que en el número de cuerpos celulares en el GRD (Sidenius y Jakobsen, 1980) y un decremento en el diámetro de los axones tanto de la aferente periférica como los axones hacia la médula espinal (Mizisin et al., 1999a). Todas esas alteraciones podrían manifestarse como alodinia táctil, pero se conocen pobremente los mecanismos moleculares que ocasionan el deterioro de las fibras sensoriales (Kou et al., 2014). Aunque los registros electrofisiológicos muestren cambios en los PA evocados por estimulación de las aferentes primarias A α / β como son la amplitud, forma y VC no hay duda que existe una modificación en los canales de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ al tratarse de una neuropatía y que podrían cambiar al igual que en la neuropatía por LNE.

Otros trabajos han demostrado que durante la neuropatía diabética ocurre un proceso de degeneración neuronal. Esta degeneración promueve cambios estructurales como son desmielinización segmental, degeneración “Walleriana” y microangiopatía, la cual induce apoptosis neuronal en el soma del GRD (Albers y Pop-Busui, 2014). Aunque los mecanismos que producen la desmielinización de las fibras aferentes A α / β no han sido establecidos, resulta ser una propuesta para explicar la disminución de la amplitud de los PA evocados por la estimulación de las aferentes mielinizadas. Debido a la pérdida de la mielina, estas fibras no son capaces de conducir los PA como lo deberían hacer normalmente, por lo que la VC disminuye y se refleja como un decremento en el área bajo la curva de dichos PA como se presentó en los resultados. Además, se ha propuesto que la degeneración neuronal podría contribuir a la neuropatía en ratas diabéticas (Kubli y Calcutt, 2014).

Tanto las aferentes primarias mielinizadas como las desmielinizadas están implicadas en el mantenimiento del dolor neuropático diabético. Aún no está claro

que tipo de fibra es la más importante para el desarrollo de la neuropatía diabética (Khan *et al.*, 2002), se ha sugerido que las fibras de menor diámetro o nociceptivas son las que participan (Chen y Levine, 2001) ya que se ha demostrado que hay actividad ectópica casi exclusivamente en estas fibras (Chen y Levine, 2001). Además, se podría pensar que las alteraciones en las aferentes primarias de bajo umbral podrían contribuir en la sensación de dolor al igual que en el dolor neuropático por LNE pero no hay evidencia electrofisiológica que lo soporte (Calcutt, 2002). Los resultados obtenidos muestran que no hay incremento en el componente C evocado por estimulación de las aferentes primarias desmielinizadas comparado con el componente C de las ratas neuropáticas por LNE, aunque las ratas empleadas en los experimentos presentaron alodinia táctil. Esto podría deberse al daño en las aferentes primarias de bajo umbral que ocasionan los diferentes modelos de dolor neuropático, como en el caso de LNE producen liberación de compuestos proinflamatorios y cambios en la expresión de canales que conllevan a una actividad ectópica que produce un aumento en la sensación del dolor, por otro lado la neuropatía diabética hay pérdida de la mielina, pérdida de cuerpos celulares en el GRD y disminución del diámetro de los axones de las fibras A α / β y por lo tanto cambios en la VC pero esto no atribuye a un aumento en la sensación del dolor tan grande comparado con la neuropatía por LNE.

Los rGABA_A y rGABA_B modulan la excitabilidad de las aferentes primarias A α / β

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los GRD de L4 y L5 expresan rGABA_A sinápticos y extrasinápticos como lo han observado diferentes grupos de investigación (Persohn *et al.*, 1991; Bohlhalter *et al.*, 1996; Paul *et al.*, 2012; Zeilhofer *et al.*, 2012; Loeza-Alcocer *et al.*, 2013; Bravo-Hernández *et al.*, 2016; Pérez-Sánchez *et al.*, 2016) al igual que los rGABA_B (Towers *et al.*, 2000; Charles *et al.*, 2001). Además de que los rGABA_A modulan la excitabilidad de las aferentes primarias A α / β como se ha observado en tortuga (Loeza-Alcocer *et al.*, 2013; Vargas-Parada *et al.*, (datos no publicados)). Tanto en el NE-GRD-RD L4 como en L5 se observa una reducción en el PAc evocado por la estimulación de las

aferentes primarias de bajo umbral, interesadamente se observa más notablemente una reducción en el PAc del NE-GRD-RD L4 de las ratas *naïve* y neuropáticas cuando se bloquean los α_5 GABA_A con L-655, 708 (20 μ M) comparado en el NE-GRD-RD L5, donde se observa una reducción del área bajo la curva del PAc cuando se bloquean los rGABA_A sinápticos y extrasinápticos con L-655, 708 + PTX (100 μ M). La disminución del área bajo la curva del PAc por la aplicación de L-655, 708 se debe a la remoción de la despolarización tónica por los α_5 GABA_A, pocas neuronas alcanzan el umbral de activación de PA y se refleja en una disminución de la amplitud del PAc (Loeza-Alcocer *et al.*, 2013).

Además, la razón por la que no se observa el mismo efecto en la reducción del PAc tanto en el NE-GRD-RD L4 y en el NE-GRD-RD L5 en presencia de L-655,708 podría deberse a la gran variabilidad en el PAc que se encontró en cada preparación, muy probablemente la significancia estadística podría obtenerse si se incrementa el número de experimentos. Si el PAc se genera en la porción periférica del nervio espinal entonces los rGABA son del tipo extrasináptico y estarían activados por el GABA del medio extracelular. Por lo tanto, la baja efectividad de los antagonistas de los receptores a GABA indicaría que solo unos pocos receptores estaban activados, muy probablemente por la baja concentración de GABA en la preparación *in vitro*. Este problema se ha encontrado en los estudios farmacológicos de la corriente tónica GABAérgica en rebanadas de núcleos supraespinales. En estos casos se ha empleado la estrategia de aplicar GABA exógeno debido a que la concentración de GABA es tan baja que no alcanza a generar una intensidad de corriente que permita discriminar fácilmente los cambios en la corriente de mantenimiento. A reserva de probar si la aplicación de GABA exógeno activa los receptores de tal modo que sea posible observar cambios estadísticamente significativos, los resultados obtenidos indican que las FAP α/β , al menos expresan probablemente α_5 GABA_A, que estarían despolarizando tónicamente las FAP incrementando su excitabilidad.

Otro hecho interesante es que el bloqueo de los rGABA_A en ratas *naïve*, la disminución del área bajo la curva de los PAc evocados por estimulación de las

aferentes primarias de bajo umbral es mucho mayor que en las ratas con neuropatía por LNE o diabetes, lo cual podría explicarse a que la expresión de los rGABA_A disminuye en los GRD en la neuropatía tanto por constricción de NE o axotomía (Horch y Lisney, 1981), por LNE (Kingery *et al.*, 1988; Bhisitkul *et al.*, 1990) y en diabetes (Jolivald *et al.*, 2008; Afrazi y Esmaeili-Mahani, 2014). Lo mismo sucede con la expresión de los rGABA_B que se ha demostrado que disminuye en la neuropatía por daño de NE (Engle *et al.*, 2012) y por diabetes (Chen y Pan, 2003; Wang *et al.*, 2011; Bai *et al.*, 2014) en el asta dorsal de la médula espinal.

Por otro lado, los rGABA_B parecieran no desempeñar un papel en la regulación de la información no nociceptiva, ya que los resultados arrojan que no existe un cambio significativo cuando son bloqueados por CGP-55845, lo cual esta observación es respaldada por varios grupos de investigación (Sivilotti y Woolf, 1994; Zemoura *et al.*, 2016; Malcangio, 2017) ya que la participación de estos receptores es más funcional en las terminales de las FAP y en la médula espinal comparada con su función en los axones y en el GRD de las aferentes primarias A β . Aunque se haya observado un cambio en el NE-GRD-RD L4 en ratas diabéticas con el bloqueo de los rGABA_B, no es suficiente evidencia para postular a estos receptores como moduladores de la información de las fibras de bajo umbral.

Los rGABA_A y rGABA_B no modulan la excitabilidad de las fibras aferentes C

Los datos que se presentaron anteriormente demostraron que los rGABA_A participan de manera diferente en la aferentes primarias nociceptivas comparado con las aferentes primarias no nociceptivas. Ya que tanto en el NE-GRD-RD L4 y L5 de las ratas *naïve*, neuropáticas por LNE y por diabetes (excepto en algunos experimentos donde se observaron cambios significativos) no se observaron cambios significativos en el componente C evocado por la estimulación de las aferente primarias desmielinizadas con el bloqueo de los rGABA_A.

Esto podría indicar que si estos receptores se expresan a lo largo de las FAP tipo C (Persohn *et al.*, 1991; Bohlhalter *et al.*, 1996; Paul *et al.*, 2012; Zeilhofer *et al.*, 2012; Loeza-Alcocer *et al.*, 2013; Bravo-Hernández *et al.*, 2016; Pérez-Sánchez *et al.*, 2016) probablemente no habrían estado activados debido a la baja

concentración de GABA en el medio extracelular. Además podrían estar desempeñando otra función, ya que otros grupos de trabajo han demostrado que los rGABA_A se encuentran en las terminales de las aferentes primarias y su activación produce la inhibición presináptica mediante la PAD (Eccles *et al.*, 1961a; Rudomin y Schmidt, 1999; Kullmann *et al.*, 2005). Con excepción de los receptores GABA_A sinápticos que se localizan en la sinapsis axo – axónicas entre las neuronas GABAérgicas y las terminales de las FAP (Rudomin y Schmidt, 1999), los rGABA_A resultantes serían del tipo extrasináptico. Por los resultados obtenidos se puede concluir que estos receptores podrían estar expresados en las FAP pero no tienen un papel relevante en la excitabilidad a lo largo de los axones donde se está activando el PA, como ocurre en las terminales periféricas y centrales. Por lo tanto se ha propuesto que estos receptores media una PAD periférica (Carton *et al.* 1995; Bravo-Hernández *et al.*, 2016) y por lo tanto la inhibición presináptica (Rudomin y Schmidt, 1999).

La participación de los rGABA_B en la modulación de la información nociceptiva parece ser no significativa en las aferentes primarias desmielinizadas al igual que en la aferentes primarias mielinizadas. Aunque se observa una disminución del PAc evocado por la estimulación de las aferentes primarias C, esto indica que hay expresión de rGABA_B en los axones y GRD de estas fibras, tal y como se había reportado previamente (Jones *et al.*, 2005).

La falla en la propagación de PAc podría explicar el dolor neuropático.

Las neuronas pseudounipolares de las FAP poseen la propiedad de filtrar PA provenientes de la periferia, para evitar una sobrecarga eléctrica y a su vez una sobre estimulación de las neuronas del SNC (Gemes *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos de estimular las aferentes primarias A α / β con un protocolo de EAF a 200 Hz (véase Métodos) permitieron observar la presencia de un filtro pasa bajas, filtro que se había reportado previamente (Stoney 1990; Luscher *et al.*, 1994b; Djouhri *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2005; Gemes *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2017). También se ha observado que esta falla en la propagación de PAc se pierde

por LNE (Gemes et al., 2013) o por inflamación (Djoughri *et al.*, 2001), fenómeno que se observó en el NE-GRD-RD L4 y L5 en ratas neuropáticas y en ratas diabéticas.

Parece interesante que algunos NE-GRD-RD L4 de las ratas neuropáticas no presenten fallas en la propagación de PAc evocados por estimulación de fibras aferentes A β , ya que se ligaron los NE L5 y L6 de acuerdo al modelo propuesto por Kim y Chung (1992). Esto podría explicarse de igual manera, debido a que las terminaciones de aferentes primarias desmielinizadas de L4 y L5 de las ratas, se extienden dos segmentos rostralmente y un segmento caudalmente (Shehab et al., 2008), los cambios neuroquímicos producidos en el LNE L5 se extienden también en los segmentos espinales rostrales (L3 y L4) y caudal (L6), los cuales afectan aferentes primarias de nervios no lesionados (Shehab, 2015). Estos cambios neuroplásticos en el asta dorsal de la médula espinal en el segmento espinal L4, podrían alterar también a las neuronas del NE L4, ya que se ha propuesto que por medio de este mecanismo la entrada al asta dorsal de las terminales nerviosas dañadas (L5) y no dañadas (L4) podrían explicar la hiperalgesia en el dolor neuropático por LNE (Shehab, 2015).

Estos cambios neuroquímicos en el NE L4 producidos por el daño del NE L5 podrían explicar la ausencia en la falla de los PAc por estimulación de las fibras A β , también se observó que la alteración del NE L4 está presente en la neuropatía por LNE. Esto se observa en los registros obtenidos del componente C evocado por estimulación de las fibras aferentes C de ratas neuropáticas por LNE, donde ocurren alteraciones en el componente C como son forma, amplitud e incluso en la latencia (datos no mostrados) comparados con el componente C de ratas sin LNE (**Fig. 7A y 7C**).

La pérdida de la falla en la propagación de PAc evocados por estimulación de fibras aferentes desmielinizadas en ratas diabéticas registradas en el presente trabajo concuerda con lo descrito por Sun y colaboradores (2012), donde estimulan y registran las descargas producidas en el nervio coccígeo en ratas *naïve* y diabéticas, en los experimentos observan descargas en baja frecuencia en ratas *naïve* cuando se estimula mecánicamente con filamentos de von Frey, mientras que

en las ratas diabéticas las descargas producidas por la estimulación son de alta frecuencia. Esto habla de una pérdida en la conducción de PA de las aferentes primarias nociceptivas en el modelo de rata diabética.

Los mecanismos que producen pérdida del filtro de los PA en ratas con neuropatía aún se desconoce. Aunque existen diversas propuestas, los autores anteriores y otros trabajos (Djoughri *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2012) proponen que existe una sobre expresión de canales de Na⁺ resistentes a TTX del tipo Na_v 1.8 en las neuronas del GRD, ya que estos canales se les ha asociado con la excitabilidad y fallas en la conducción. Esto se ha observado tanto en la neuropatía por diabetes (Sun *et al.*, 2012) como en dolor inflamatorio (Djoughri *et al.*, 2001).

Es importante destacar que todos los trabajos previamente citados relacionados con la pérdida del filtro de los PA fueron realizados en fibras aferentes nociceptivas (A δ y C) y los resultados mostrados en este trabajo, se estimularon las fibras aferentes no nociceptivas (A α/β), demostrando que la pérdida en la conducción de PA no es exclusiva de las aferentes nociceptivas, sino también de las propioceptivas como se había reportado previamente (Gemes *et al.*, 2013). Este resultado podría explicar que la pérdida del filtro pasa bajas en las fibras no nociceptivas en ratas neuropáticas, aumente la sensación de dolor y a su vez produzca alodinia mecánica, debido a que no hay regulación de la excitabilidad de las neuronas sensoriales y se genere una sobre estimulación de las neuronas de la médula espinal involucradas en el circuito que procesa la información nociceptiva. En general, el filtro generado en la unión T de las neuronas sensoriales contribuye en el tráfico de la información nociceptiva y no nociceptiva y desempeña un papel crítico en la percepción sensorial.

Por otro lado, el bloqueo de los rGABA_A y rGABA_B no parecen desempeñar una función en el mantenimiento o pérdida en la falla de la propagación de PA, ya que no se mostraron cambios significativos en los registros obtenidos en ratas *naïve* y en ratas neuropáticas. Sin embargo, la activación de los rGABA_A con GABA exógeno a 5 μ M, redujo de manera significativa el área de los PAc evocados por estimulación de las aferentes primarias A β . Una posible explicación se podría deber

a que el efecto del GABA activa masivamente a los rGABA, lo que disminuye la resistencia de la membrana y por lo tanto la corriente que fluye a través de ella. A este fenómeno se le conoce como ‘cortocircuito’ de la membrana, (Curtis *et al.*, 1958; Paulus *et al.*, 2016). Además, Du y colaboradores (2017) proponen que la activación de los rGABA_A en combinación de la inactivación de canales de Na⁺ podría revertir el filtro de la unión T de las FAP en ratas que no lo presentaran. Estos resultados sugieren, al menos en ratas *naïve*, que la activación o el bloqueo de los rGABA_A y rGABA_B no modifican la conductancia de los PA a través de los axones de las aferentes primarias mielinizadas.

También se observaron cambios en los PAc evocados por estimulación de aferentes primarias de alto y bajo umbral después de la EAF. Se incrementó el área bajo la curva del PAc, es decir se reclutaron más axones con el mismo estímulo, lo que significa que se incrementó su excitabilidad. Además, la reducción en presencia del antagonista a los α_5 GABA_A, L-655, 708, fue aproximadamente de la misma magnitud antes y después de la EAF. Esto sugiere que los α_5 GABA_A podrían ser los responsables del incremento en la excitabilidad de las FAP por la despolarización sostenida que producen, los cuales probablemente se activaron por el GABA liberado por el tren de pulsos. Una posibilidad de dónde proviene el GABA liberado para activar dichos receptores son las células gliales satelitales y de Schwann, las cuales se ha demostrado que son capaces de almacenar GABA (Iversen *et al.*, 1973; Schon y Kelly, 1974b) y liberar GABA (Minchin, 1975; Neal y Bowery, 1974). El GABA liberado por la despolarización producida por los PA, activaron los rGABA_A, por lo que despolarizarán las FAP haciéndolas más excitables (Loeza-Alcocer *et al.*, 2013) y esto se reflejaría como un incremento en el área bajo la curva del PAc.

Conclusiones

Los resultados mostrados en el presente trabajo muestran la función que desempeñan los rGABA en la transmisión de la información no nociceptiva y nociceptiva. En las fibras aferentes mielinizadas ($A\alpha/\beta$), los rGABA_A sobre todo aquellos que poseen la subunidad α_5 podrían estar modulando la excitabilidad de estas fibras mediante la despolarización tónica, ya que su bloqueo reduce la amplitud de los PAC debido a la remoción de dicha despolarización. En las fibras aferentes desmielinizadas (C), los rGABA_A parecen no desempeñar un papel fundamental en la regulación de la excitabilidad de estas fibras, posiblemente debido a que su función está relacionada en la liberación de neurotransmisor en las terminaciones de las FAP. Además, los rGABA_B podrían no tener un papel relevante en la modulación de las fibras primarias $A\alpha/\beta$ y C, debido a su localización en las terminales de las FAP o incluso en el asta dorsal de la médula espinal.

Otro punto importante a mencionar es la importancia en la falla de propagación de PA a través de las fibras aferentes $A\alpha/\beta$ y C, pues como se mencionó en este trabajo, es de suma importancia este filtro pasa bajas generado en la unión T de las neuronas sensoriales para proteger al SNC de sobrecargas eléctricas o de sobreestimulación. El cual se pierde durante o después de la neuropatía el cual podría explicar los síntomas del dolor neuropático. También que este filtro no es dependiente de receptores a GABA, al menos en ratas *naïve*.

Bibliografía

- Abdulla, F., y P. Smith. 1997. "Ectopic alpha2-Adrenoceptors Couple to N-Type Ca²⁺ Channels in Axotomized Rat Sensory Neurons." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17 (5): 1633–41.
- Afrazi, S, y S. Esmaeili-Mahani. 2014. "Allopregnanolone Suppresses Diabetes-Induced Neuropathic Pain and Motor Deficit through Inhibition of GABAA Receptor down-Regulation in the Spinal Cord of Diabetic Rats." *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 17 (5): 312–17.
- Albers, J. W. y R. Pop-Busui. 2014. "Diabetic Nueropathy: Mechanisms, Emerging Treatments, And Subtypes" *Curr Neurol Neurosci Rep* 14: 473. doi: 10.1007/S11910-014-0473-5.
- Alvarez-Leefmans, F. J., M. León-Olea, J. Mendoza-Sotelo, F. J. Alvarez, B. Antón, y R. Garduo. 2001. "Immunolocalization of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter in Peripheral Nervous Tissue of Vertebrates." *Neuroscience* 104 (2): 569–82. doi:10.1016/S0306-4522(01)00091-4.
- Asato, F., M. Butler, H. Blomberg, y T. Gordh. 2000. "Variation in Rat Sciatic Nerve Anatomy: Implications for a Rat Model of Neuropathic Pain." *Journal of the Peripheral Nervous System : JPNS* 5 (1): 19–21. doi:10.1046/j.1529-8027.2000.00155.x.
- Baba, H., R. R. Ji, T. Kohno, K. A. Moore, T. Ataka, A. Wakai, M. Okamoto, y C. J. Woolf. 2003. "Removal of GABAergic Inhibition Facilitates Polysynaptic A Fiber-Mediated Excitatory Transmission to the Superficial Spinal Dorsal Horn." *Molecular and Cellular Neuroscience* 24 (3): 818–30. doi:10.1016/S1044-7431(03)00236-7.
- Bai, H. P., P. Liu, Y. M. Wu, W. Y. Guo, Y. X. Guo, y X. L. Wang. 2014. "Activation of Spinal GABAB Receptors Normalizes N-Methyl-D-Aspartate Receptor in Diabetic Neuropathy." *Journal of the Neurological Sciences* 341 (1–2). Elsevier B.V.: 68–72. doi:10.1016/j.jns.2014.04.002.
- Barnard, E A, P Skolnick, R W Olsen, H Mohler, W Sieghart, G Biggio, C Braestrup, A N Bateson, y S Z Langer. 1998. "International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of Gamma-Aminobutyric acidA Receptors: Classification on the Basis of Subunit Structure and Receptor Function." *Pharmacological Reviews* 50 (2): 291–313. doi:10.1124/pr.108.00505.receptors.
- Basbaum, A. I., D. M. Bautista, G. Scherrer, y D. Julius. 2009. "Cellular and Molecular Mechanisms of Pain." *Cell* 139 (2): 267–84. doi:10.1016/j.cell.2009.09.028.
- Benarroch E. E. 2012. "GABAB receptors: Structure, functions, and clinical implications" *Neurology*. 78(8):578-84. doi: 10.1212/WNL.0b013e318247cd03.
- Bennett, G J, y Y K Xie. 1988. "A Peripheral Mononeuropathy in Rat That Produces Disorders Of Pain Sensation Like Those See In Man." *Pain* 33: 87–107. doi:10.1016/0304-3959(88)90209-6.
- Bettler, B., K. Kaupmann, J. Mosbacher, y M. Gassmann. 2004. "Molecular Structure and Physiological Functions of GABAB Receptors." *Fisiol Rev* 84: 835–67. doi:10.1152/physrev.00036.2003.
- Bhisitkul, R. B., J. D. Kocsis, T. R. Gordon, y S. G. Waxman. 1990. "Trophic Influence of the Distal Nerve Segment on GABAA Receptor Expression in Axotomized Adult Sensory Neurons." *Experimental Neurology* 109 (3): 273–78. doi:10.1016/S0014-4886(05)80017-2.
- Bittiger, H., W. Froestl, S. J. Mickel, y H. R. Olpe. 1993. "GABAB Receptor Antagonists: From Synthesis to Therapeutic Applications." *Trends Pharmacol. Sci.* 14 (November): 391–94.halter
- Blair, N. T, y B. P. Bean. 2002. "Roles of Tetrodotoxin (TTX)-Sensitive Na⁺ Current, TTX-Resistant

- Na⁺ Current, and Ca²⁺ Current in the Action Potentials of Nociceptive Sensory Neurons." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (23): 10277–90. doi:22/23/10277 [pii].
- Bohlhalter, S, O Weinmann, H Mohler, y J M Fritschy. 1996. "Laminar Compartmentalization of GABAA-Receptor Subtypes in the Spinal Cord: An Immunohistochemical Study." *The Journal of Neuroscience* 16 (1): 283–97.
- Böhme, I., H. Rabet, y H. Lüddens. 2004. "Four Amino Acids in the α Subunits Determine the γ -Aminobutyric Acid Sensitivities of GABAA Receptor Subtypes." *Journal of Biological Chemistry* 279 (34): 35193–200. doi:10.1074/jbc.M405653200.
- Bonin, R. P., y Y. De Koninck. 2013. "Restoring Ionotropic Inhibition as an Analgesic Strategy." *Neuroscience Letters* 557. Elsevier Ireland Ltd: 43–51. doi:10.1016/j.neulet.2013.09.047.
- Bormann, J. 1988. "Electrophysiology of GABAA and GABAB Receptor Subtypes." *Trends in Neurosciences* 11 (3): 112–16. doi:10.1016/0166-2236(88)90156-7.
- Bos, R, F Brocard, y L Vinay. 2011. "Primary Afferent Terminals Acting as Excitatory Interneurons Contribute to Spontaneous Motor Activities in the Immature Spinal Cord." *J Neurosci* 31 (28): 10184–88. doi:10.1523/JNEUROSCI.0068-11.2011.
- Boucher, T. J., K. Okuse, D. L. H. Bennett, J. B. Munson, J. W. Wood, y S. B. McMahon. 2000. "Potent Analgesic Effects of GDNF in Neuropathic Pain States." *Science* 290 (5489): 124–27. doi:10.1126/science.290.5489.124.
- Bravo-Hernández, M., L. A. Fera-Morales, J. E. Torres-López, C. Cervantes-Durán, R. Delgado-Lezama, V. Granados-Soto, y H. I. Rocha-González. 2014. "Evidence for the Participation of Peripheral $\alpha 5$ Subunit-Containing GABAA Receptors in GABAA Agonists-Induced Nociception in Rats." *European Journal of Pharmacology* 734 (1). Elsevier: 91–97. doi:10.1016/j.ejphar.2014.03.051.
- Bravo-Hernández, M., J. A. Corleto, P. Barragán-Iglesias, R. González-Ramírez, J.B. Pineda-Farías, R. Felix, N.A. Calcutt, R. Delgado-Lezama, M. Marsala, y V. Granados-Soto. 2016. "The $\alpha 5$ Subunit Containing GABAA Receptors Contribute to Chronic Pain." *Pain* 157 (3). doi:10.1097/j.pain.0000000000000410.
- Braz, J., C. Solorzano, X. Wang, y A. I. Basbaum. 2014. "Transmitting Pain And Itch Messages: A Contemporary View Of The Spinal Cord Circuits That Generate Gate Control" *Neuron* 82 (3): 522–36. doi:10.1016/j.neuron.2014.01.018.
- Brickley S. G., y I. Mody. 2012. "Extrasynaptic GABAA Receptors: Their Function In The CNS And Implications For Disease" *Neuron* 73(1): 23–34. doi:10.1016/j.immuni.2011.12.012.
- Brunner, R., P. Zimmermann, y F. W. Klußmann. 1980. "Localization and Neurophysiological Properties of Motoneurons of the M. Triceps Surae of the Rat after Retrograde Labelling with Evans Blue." *Cell and Tissue Research* 212 (1): 73–81. doi:10.1007/BF00234034.
- Calcutt, N. 2002. "Potential Mechanisms of Neuropathic Pain in Diabetes." *International Review of Neurobiology* 50: 205–28. doi:10.1016/S0074-7742(02)50078-7.
- Campbell, J. N., y R. A. Meyer. 2006. "Mechanisms of Neuropathic Pain." *Neuron* 52 (1): 77–92. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.021.
- Campbell, J. N., S. N. Raja, R. A. Meyer, y S. E. Mackinnon. 1988. "Myelinated Afferents Signal the Hyperalgesia Associated with Nerve Injury." *Pain* 32 (1): 89–94. doi:10.1016/0304-3959(88)90027-9.

- Charles, K. J., M. L. Evans, M. J. Robbins, A. R. Calver, R. A. Leslie, y M. N. Pangalos. 2001. "Comparative Immunohistochemical Localisation of GABAB1a, GABAB1b and GABAB2 Subunits in Rat Brain, Spinal Cord and Dorsal Root Ganglion." *Neuroscience* 106 (3): 447–67. doi:10.1016/S0306-4522(01)00296-2.
- Chebib, M., y G. A.R. Johnston. 1999. "The 'ABC' of GABA Receptors: A Brief Review." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 26 (11): 937–40. doi:10.1046/j.1440-1681.1999.03151.x.
- Chen, S., y H. Pan. 2003. "Spinal GABA B Receptors Mediate Antinociceptive Actions of Cholinergic Agents in Normal and Diabetic Rats" *Brain Research* 965: 67–74.
- Chen, X., y J. D. Levine. 2001. "Hyper-Responsivity in a Subset of C-Fiber Nociceptors in a Model of Painful Diabetic Neuropathy in the Rat." *Neuroscience* 102 (1): 185–92. doi:10.1016/S0306-4522(00)00454-1.
- Clark, J A, E Mezey, A S Lam, y T I Bonner. 2000. "Distribution of the GABA(B) Receptor Subunit gb2 in Rat CNS." *Brain Research* 860 (1–2): 41–52. doi:10.1016/S0006-8993(00)01958-2.
- Cohen, S. P., y J. Mao. 2014. "Neuropathic Pain: Mechanisms y Their Clinical Implications." *Bmj* 348 (feb05 6): f7656–f7656. doi:10.1136/bmj.f7656.
- Curtis, R, J W Phillis, y J C Watkins. 1959. "The Depression Of Spinal Neurones By γ -Amino-n-Butyric And β -Alanine." *Journal of Physiology* 146: 185–203.
- Dirig, D M, y T L Yaksh. 1995. "Intrathecal Baclofen and Muscimol, but Not Midazolam, Are Antinociceptive Using the Rat-Formalin Model." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 275 (1): 219–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7562553>.
- Djoughri, L, D Dawbarn, A Robertson, R Newton, y S N Lawson. 2001. "Time Course and Nerve Growth Factor Dependence of Inflammation-Induced Alterations in Electrophysiological Membrane Properties in Nociceptive Primary Afferent Neurones." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (22): 8722–33. doi:10.1523/JNEUROSCI.1111-01.2001 [pii].
- Du, X., H. Hao, Y. Yang, S. Huang, C. Wang, S. Gigout, R. Ramli, et al. 2017. "Local GABAergic Signaling within Sensory Ganglia Controls Peripheral Nociceptive Transmission." *Journal of Clinical Investigation* 127 (5): 1741–56. doi:10.1172/JCI86812.
- Eccles, J. C., R. M. Eccles, y F. Magni. 1961. "Central Inhibitory Action Attributable to Presynaptic Depolarization Produced by Muscle Afferent Volleys." *J Physiol*, 147–66. doi:10.1113/jphysiol.1961.sp006798.
- Erdö S.L., y B. Kiss. 1986 "Presence Of GABA, Glutamate Decarboxylase, And GABA Transaminase In Peripheral Tissues: A Collection Of Quantitative Data" S.L. Erdö, N.G. Bowery (Eds.), GABAergic Mechanisms in the Mammalian Periphery, Raven Press, New York (1986), 9-17
- Engle, M. P., M. A. Merrill, B. M. De Prado, y D. L. Hammond. 2012. "Spinal Nerve Ligation Decreases γ -Aminobutyric Acid B Receptors on Specific Populations of Immunohistochemically Identified Neurones in L5 Dorsal Root Ganglion of the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 520 (8): 1663–77. doi:10.1002/cne.23005.
- Everill, B., y J. D. Kocsis. 1994. "Reduction in Potassium Currents in Identified Cutaneous Afferent Dorsal Root Ganglion Neurones After Axotomy" *J. Physiol* 1994: 700–708.
- Fang, X, S McMullan, S N Lawson, y L Djoughri. 2005. "Electrophysiological Differences between Nociceptive and Non-Nociceptive Dorsal Root Ganglion Neurones in the Rat in Vivo." *The Journal of Physiology* 565 (Pt 3): 927–43. doi:10.1113/jphysiol.2005.086199.

- Farrant, M., y Z. Nusser. 2005. "Variations on an Inhibitory Theme: Phasic and Tonic Activation of GABA_A Receptors." *Nature Reviews Neuroscience* 6 (3): 215–29. doi:10.1038/nrn1625.
- Fritschy, J M y H Mohler. 1995. "GABA_A-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits." *The Journal of comparative neurology* 359 1: 154-94.
- Gallagher, J.P., H. Higashi, y S. Nishi. 1978 "Characterization and ionic basis of GABA-induced depolarizations recorded in vitro from cat primary afferente neurones" *J. Physiol* 275, 263–82.
- Gemes, G., A. Koopmeiners, M. Rigaud, P. Lirk, D. Sapunar, M. L. Bangaru, D. Vilceanu, et al. 2013. "Failure of Action Potential Propagation in Sensory Neurons: Mechanisms and Loss of Afferent Filtering in C-Type Units after Painful Nerve Injury." *The Journal of Physiology* 591 (Pt 4): 1111–31. doi:10.1113/jphysiol.2012.242750.
- Gharagozloo, A, A M Holohean, J C Hackman, y R A Davidoff. 1990. "Serotonin and GABA-Induced Depolarization of Frog Primary Afferent Fibers." *Brain Res.* 532: 19–24.
- Glykys, J., y I. Mody. 2007. "The Main Source of Ambient GABA Responsible for Tonic Inhibition in the Mouse Hippocampus." *The Journal of Physiology* 582 (3): 1163–78. doi:10.1113/jphysiol.2007.134460.
- Guo, D., y J. Hu. 2014. "Spinal Presynaptic Inhibition in Pain Control." *Neuroscience* 283: 95–106. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.09.032.
- Harper, A. A., y S. N. Lawson. 1985. "Conduction Velocity Is Related To Morphological Cell Type In Rat Dorsal Root Ganglion Neurones" *J Physiol* 359: 31-46.
- Hedblom, E., y E. F. Kirkness. 1997. "A Novel Class of GABA A Receptor Subunit in Tissues of the Reproductive System" *272 (24): 15346–50.* doi:10.1074/jbc.272.24.15346.
- Horch K. W., y S. J. W. Lisney. 1981. "Changes In Primary Afferent Depolarization Of Sensory Neurones During Peripheral Nerve Regeneration In Cat" *J Physiol* 313: 287–99.
- Huntsman, M. M. 1999. "Reciprocal Inhibitory Connections and Network Synchrony in the Mammalian Thalamus." *Science* 283 (5401): 541–43. doi:10.1126/science.283.5401.541.
- Jensen, T. S., R. Baron, M. Haanpää, E. Kalso, J. D. Loeser, A. S. C. Rice, y R. D. Treede. 2011. "A New Definition of Neuropathic Pain." *Pain* 152 (10). International Association for the Study of Pain: 2204–5. doi:10.1016/j.pain.2011.06.017.
- Jensen, T. S., y N. B. Finnerup. 2014. "Allodynia and Hyperalgesia in Neuropathic Pain: Clinical Manifestations and Mechanisms." *The Lancet Neurology* 13 (9). Elsevier Ltd: 924–35. doi:10.1016/S1474-4422(14)70102-4.
- Jolival, C. G., C. A. Lee, K. M. Ramos, N. A. Calcutt, S. Park, J. M. Park, S. Kim, et al. 2008. "Allodynia And Hiperalgesia In Diabetic Rats Are Mediated By GABA And Depletion Of Spinal Potassium-Chloride Co-Transporters" *Pain* 140 (1): 48–57. doi:10.1016/j.pain.2008.07.005.Allodynia.
- Jonas, P., J. Bischofberger, D. Fricker, y R. Miles. 2004. "Interneuron Diversity Series: Fast In, Fast out - Temporal and Spatial Signal Processing in Hippocampal Interneurons." *Trends in Neurosciences* 27 (1): 30–40. doi:10.1016/j.tins.2003.10.010.
- Jones, Toni L., Sarah M. Sweitzer, Michael C. Peters, Steven P. Wilson, y David C. Yeomans. 2005. "GABAB Receptors on Central Terminals of C-Afferents Mediate Intersegmental A δ -Afferent Evoked Hypoalgesia." *European Journal of Pain* 9 (3): 233–42. doi:10.1016/j.ejpain.2004.06.004.

- Kahle, K.T., K.J. Staley, B.V. Nahed, G. Gamba, S.C. Hebert, R.P. Lifton, D.B. Mount. 2008 "Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease" *Nat Clin Pract Neurol*, 4, pp. 490-503.
- Kaizawa, J., y I. Takahashi. 1970. "Fiber Analysis of the Lumbar Spinal Roots and Their Sciatic Branches in Rats." *Physiology* 100: 61–74. doi:10.1620/tjem.100.61.
- Kambiz, S., M. Baas, L. S. Duraku, A. L. Kerver, A. H J Koning, E. T. Walbeehm, y T. J H Ruigrok. 2014. "Innervation Mapping of the Hind Paw of the Rat Using Evans Blue Extravasation, Optical Surface Mapping and CASAM." *Journal of Neuroscience Methods* 229. Elsevier B.V.: 15–27. doi:10.1016/j.jneumeth.2014.03.015.
- Kanaka, C., K. Ohno, A. Okabe, K. Kuriyama, T. Itoh, A. Fukuda, y K. Sato. 2001. "The Differential Expression Patterns of Messenger RNAs Encoding K-Cl Cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl Cotransporter (NKCC1) in the Rat Nervous System." *Neuroscience* 104 (4): 933–46. doi:10.1016/S0306-4522(01)00149-X.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2013). Principles of neural science. Neurology (Vol. 3). 475-480
- Kaupmann, K., K. Huggel, J. Heid, P. J. Flor, S. Bischoff, S. J. Mickel, G. McMaster, et al. 1997. "Expression Cloning of GABAB Receptors Uncovers Similarity to Metabotropic Glutamate Receptors." *Nature* 386 (6622): 239–46. doi:10.1038/386239a0.
- Kerr, D.I.B., y J. Ong. 1995. "GABAB Receptors." *Pharmacology & Therapeutics* 67 (2): 187–246. doi:10.1016/0163-7258(95)00016-A.
- Khan, G. M., S. R. Chen, y H. L. Pan. 2002. "Role of Primary Afferent Nerves in Allodynia Caused by Diabetic Neuropathy in Rats." *Neuroscience* 114 (2): 291–99. doi:10.1016/S0306-4522(02)00372-X.
- Kim H. S., y J. M. Chung. 1992. "An Experimental Model for Peripheral Neuropathy Produced by Segmental Spinal Nerve Ligation in the Rat." *Pain* 50 (3): 355–63. doi:10.1016/0304-3959(92)90041-9.
- Kim, Y I, H S Na, S H Kim, H C Han, Y W Yoon, B Sung, H J Nam, S L Shin, y S K Hong. 1998. "Cell Type-Specific Changes of the Membrane Properties of Peripherally-Axotomized Dorsal Root Ganglion Neurons in a Rat Model of Neuropathic Pain." *Neuroscience* 86 (1): 301–9. doi:10.1016/S0306-4522(98)00022-0.
- Kingery, W. S., R. D. Fields, y J. D. Kocsis. 1988. "Diminished Dorsal Root GABA Sensitivity Following Chronic Peripheral Nerve Injury." *Experimental Neurology* 100 (3): 478–90. doi:10.1016/0014-4886(88)90033-7.
- Knabl, J., R. Witschi, K. Hösl, H. Reinold, U. B. Zeilhofer, S. Ahmadi, J. Brockhaus, et al. 2008. "Reversal of Pathological Pain through Specific Spinal GABAA Receptor Subtypes." *Nature* 451 (7176): 330–34. doi:10.1038/nature06493.
- Koltzenburg, M., H. E. Torebjörk, L. Ka. Wahren. 1994. "Nociceptor modulated central sensitization causes mechanical hyperalgesia in acute chemogenic and chronic neuropathic pain." *Brain*, Volume 117, Issue 3, Pages 579–591, doi:10.1093/brain/117.3.579
- Kou, Zhen-Zhen, Chun-Yu Li, Jia-Chen Hu, Jun-Bin Yin, Dong-Liang Zhang, Yong-Hui Liao, Zhen-Yu Wu, et al. 2014. "Alterations in the Neural Circuits from Peripheral Afferents to the Spinal Cord: Possible Implications for Diabetic Polyneuropathy in Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetic Rats." *Frontiers in Neural Circuits* 8 (January): 6. doi:10.3389/fncir.2014.00006.
- Krames, E. S. 2015. "The Dorsal Root Ganglion in Chronic Pain and as a Target for Neuromodulation:

- A Review." *Neuromodulation* 18 (1): 24–32. doi:10.1111/ner.12247.
- Kullmann, D. M., A. Ruiz, D. M. Rusakov, R. Scott, A. Semyanov, y M. C. Walker. 2005. "Presynaptic, Extrasynaptic and Axonal GABA A Receptors in the CNS: Where and Why?" *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 87 (1 SPEC. ISS.): 33–46. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2004.06.003.
- Lai, J., M. S. Gold, C. S. Kim, D. Biana, M. H. Ossipov, J. C. Hunterc, y F. Porreca. 2002. "Inhibition of Neuropathic Pain by Decreased Expression of the Tetrodotoxin-Resistant Sodium Channel, NaV1.8." *Pain* 95 (1–2): 143–52. doi:10.1016/S0304-3959(01)00391-8.
- Laurent, G. 2002. "Olfactory Network Dynamics and the Coding of Multidimensional Signals." *Nature Reviews Neuroscience* 3 (11): 884–95. doi:10.1038/nrn964.
- Lawson, S N, B a Crepps, y E R Perl. 1997. "Relationship of Substance P to Afferent Characteristics of Dorsal Root Ganglion Neurones in Guinea-Pig." *The Journal of Physiology* 505 (Pt 1: 177–91. doi:10.1111/j.1469-7793.1997.00177.x.
- Levy, R. A., y E. G. Anderson. 1972. "The Effect of the GABA Antagonists Bicuculline and Picrotoxin on Primary Afferent Terminal Excitability." *Brain Research* 43 (1): 171–80. doi:10.1016/0006-8993(72)90282-X.
- Liu, C N, M Michaelis, R Amir, y M Devor. 2000. "Spinal Nerve Injury Enhances Subthreshold Membrane Potential Oscillations in DRG Neurons: Relation to Neuropathic Pain." *Journal of Neurophysiology* 84 (1): 205–15.
- Loeza-Alcocer, E., M. Canto-Bustos, J. Aguilar, R. González-Ramírez, R. Felix, y R. Delgado-Lezama. 2013. "α(5)GABA(A) Receptors Mediate Primary Afferent Fiber Tonic Excitability in the Turtle Spinal Cord." *Journal of Neurophysiology* 110 (9): 2175–84. doi:10.1152/jn.00330.2013.
- Lu, Xin-yun, M Behnam Ghasemzadeh, y Peter W Kalivas. 1999. "Regional Distribution and Cellular Localization of γ -Aminobutyric Acid Subtype 1 Receptor mRNA in the Rat Brain" 182 (May 1998): 166–82.
- Luscher C., J. Streit, R. Quadroni, H. R. Luscher. 1994. "Action potential propagation through embryonic dorsal root ganglion cells in culture. I. Influence of the cell morphology on propagation properties" *Journal of Neurophysiology*, 72 (2) 622-633;
- MacDonald, R L, y R W Olsen. 1994. "GABAA Receptor Channels." *Ann.Rev.Neurosci.* 17: 569–602.
- Malcangio, M. 2017. "GABA B Receptors and Pain." *Neuropharmacology*, 10–13. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.05.012.
- Malmberg, A. B. 1997. "Preserved Acute Pain and Reduced Neuropathic Pain in Mice Lacking PKC." *Science* 278 (5336): 279–83. doi:10.1126/science.278.5336.279.
- Mao, S., T. Garzon-Muvdi, M. Di Fulvio, Y. Chen, E. Delpire, F. J. Alvarez, y F. J. Alvarez-Leefmans. 2012. "Molecular and Functional Expression of Cation-Chloride Cotransporters in Dorsal Root Ganglion Neurons during Postnatal Maturation." *Journal of Neurophysiology* 108 (3): 834–52. doi:10.1152/jn.00970.2011.
- Millan, M. J. 1999. "The Induction of Pain: An Integrative Review." *Progress in Neurobiology* 57 (1): 1–164. doi:10.1016/S0301-0082(98)00048-3.
- Mizisin, A P, N A Calcutt, D R Tomlinson, A Gallagher y P Fernyhough. 1999. "Neurotrophin-3 reverses nerve conduction velocity deficits in streptozotocin-diabetic rats." *Journal of the peripheral nervous system: JPNS* 4 3-4: 211-21.
- Moore, K A, T Kohno, L A Karchewski, J Scholz, H Baba, y C J Woolf. 2002. "Partial Peripheral Nerve

- Injury Promotes a Selective Loss of GABAergic Inhibition in the Superficial Dorsal Horn of the Spinal Cord." *J Neurosci* 22 (15): 6724–31. doi:20026611.
- Moore, S. A., y R. G. Peterson. 1980. "A Quantitative Comparison of Motor and Sensory Conduction Velocities in Short-and Long-Term Streptozotocin-and Alloxan-Diabetic Rats." *Journal of the Neurological* 1.
- Olausson, H., J. Cole, K. Rylander, F. McGlone, Y. Lamarre, B. G. Wallin, H. Krämer, et al. 2008. "Functional Role of Unmyelinated Tactile Afferents in Human Hairy Skin: Sympathetic Response and Perceptual Localization." *Experimental Brain Research* 184 (1): 135–40. doi:10.1007/s00221-007-1175-x.
- Olsen, R. W., y W. Sieghart. 2009. "GABAA Receptors: Subtypes Provide Diversity of Function and Pharmacology." *Neuropharmacology* 56 (1). Elsevier Ltd: 141–48. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.045.
- Oprée, A, y M Kress. 2000. "Involvement of the Proinflammatory Cytokines Tumor Necrosis Factor-Alpha, IL-1 Beta, and IL-6 but Not IL-8 in the Development of Heat Hyperalgesia: Effects on Heat-Evoked Calcitonin Gene-Related Peptide Release from Rat Skin." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (16): 6289–93. doi:20/16/6289 [pii].
- Oyelese, A. A., y J. D. Kocsis. 1996. "GABAA-Recepter-Mediated Conductances And Action Potential Waveform in Cutaneous And Muscle Afferent Neurons Of The Adult Rat: Differential Expression And Response To Nerve Injury." *J Neurophysiology* 76 (4): 2383-2392.
- Paul, J., H. U. Zeilhofer, y J. M. Fritschy. 2012. "Selective Distribution of GABA_A Receptor Subtypes in Mouse Spinal Dorsal Horn Neurons and Primary Afferents." *Journal of Comparative Neurology* 520 (17): 3895–3911. doi:10.1002/cne.23129.
- Paulus, W., y J. C. Rothwell. 2016. "Membrane Resistance and Shunting Inhibition: Where Biophysics Meets State-Dependent Human Neurophysiology." *The Journal of Physiology* 594 (10): 2719–28. doi:10.1113/JP271452.
- Pavlov, I., L. P. Savtchenko, D. M. Kullmann, A. Semyanov, y M. C. Walker. 2009. "Outwardly Rectifying Tonic Active GABAA Receptors in Pyramidal Cells Modulate Neuronal Offset, Not Gain." *Journal of Neuroscience* 29 (48): 15341–50. doi:10.1523/JNEUROSCI.2747-09.2009.
- Perez-Sanchez, J., L. E. Lorenzo, I. Lecker, A. A. Zurek, C. Labrakakis, E. M. Bridgwater, B. A. Orser, Y. De Koninck, y R. P. Bonin. 2016. "α5GABA_A Receptors Mediate Tonic Inhibition in the Spinal Cord Dorsal Horn and Contribute to the Resolution Of Hyperalgesia." *Journal of Neuroscience Research* 0 (October): 1–12. doi:10.1002/jnr.23981.
- Persohn, E., P. Malherbe, y J. G. Richards. 1991. "In Situ Hybridization Histochemistry Reveals a Diversity of GABAA Receptor Subunit mRNAs in Neurons of the Rat Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia." *Neuroscience* 42 (2): 497–507. doi:10.1016/0306-4522(91)90392-2.
- Pitcher, M. H., y F. Cervero. 2010. "Role of the NKCC1 Co-Transporter in Sensitization of Spinal Nociceptive Neurons." *Pain* 151 (3). International Association for the Study of Pain: 756–62. doi:10.1016/j.pain.2010.09.008.
- Polgár, E., D. I. Hughes, J. S. Riddell, D. J. Maxwell, Z. Puskár, y A. J. Todd. 2003. "Selective Loss of Spinal GABAergic or Glycinergic Neurons Is Not Necessary for Development of Thermal Hyperalgesia in the Chronic Constriction Injury Model of Neuropathic Pain." *Pain* 104 (1–2): 229–39. doi:10.1016/S0304-3959(03)00011-3.
- Price, T. J., F. Cervero, M. S. Gold, D. L. Hammond, y S. A. Prescott. 2009. "Chloride Regulation in

- the Pain Pathway.” *Brain Research Reviews* 60 (1). Elsevier B.V.: 149–70. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.12.015.
- Price, T. J., K. M. Hargreaves, y F. Cervero. 2006. “Protein Expression and mRNA Cellular Distribution of the NKCC1 Cotransporter in the Dorsal Root and Trigeminal Ganglia of the Rat.” *Brain Research* 1112 (1): 146–58. doi:10.1016/j.brainres.2006.07.012.
- Rudomin, P. y R. F. Schmidt. 1999. “Presynaptic Inhibition in the Vertebrate Spinal Cord Revisited,” *Exp Brain Res* 129: 1–37.
- Sapunar, D., M. Ljubkovic, P. Lirk, J. B. McCallum, y Q. H. Hogan. 2005. “Distinct Membrane Effects of Spinal Nerve Ligation on Injured and Adjacent Dorsal Root Ganglion Neurons in Rats.” *Anesthesiology* 103 (2): 360–76. doi:10.1097/00000542-200508000-00020.
- Schmalbruch H. 1986. “Fiber composition of the rat sciatic nerve”. *Anat Rec* 215:71–81.
- Scholz, a, M Gruss, y W Vogel. 1998. “Properties and Functions of Calcium-Activated K⁺ Channels in Small Neurons of Rat Dorsal Root Ganglion Studied in a Thin Slice Preparation.” *The Journal of Physiology* 513 (Pt 1: 55–69. doi:10.1111/j.1469-7793.1998.055by.x.
- Seltzer, Z., R. Dubner, y Y. Shir. 1990. “A Novel Behavioral Model of Neuropathic Pain Disorders Produced in Rats by Partial Sciatic Nerve Injury.” *Pain* 43 (2): 205–18. doi:10.1016/0304-3959(90)91074-S.
- Semyanov, A., M. C. Walker, y D. M. Kullmann. 2003. “GABA Uptake Regulates Cortical Excitability via Cell Type-specific Tonic Inhibition.” *Nature Neuroscience* 6 (5). doi:10.1038/nn1043.
- Shehab, S. A.S., K. Al-Marashda, A. Al-Zahmi, A. Abdul-Kareem, y M. A.H. Al-Sultan. 2008. “Unmyelinated Primary Afferents from Adjacent Spinal Nerves Intermingle in the Spinal Dorsal Horn: A Possible Mechanism Contributing to Neuropathic Pain.” *Brain Research* 1208: 111–19. doi:10.1016/j.brainres.2008.02.089.
- Shehab, S., M. Anwer, D. Galani, A. Abdulkarim, K. Al-Nuaimi, A. Al-Baloushi, S. Tariq, N. Nagelkerke, y M. Ljubisavljevic. 2015. “Anatomical Evidence That the Uninjured Adjacent L4 Nerve Plays a Significant Role in the Development of Peripheral Neuropathic Pain after L5 Spinal Nerve Ligation in Rats.” *Journal of Comparative Neurology* 523 (12): 1731–47. doi:10.1002/cne.23750.
- Shelp, B. J., A. W. Bown, y M. D. McLean. 1999. “Metabolism and Functions of Gamma-Aminobutyric Acid.” *Trends in Plant Science* 4 (11): 446–52. doi:10.1016/S1360-1385(99)01486-7.
- Sidenius, P. y J. Jakobsen. 1980. “Reduced Perikaryal Volume of Lower Motor and Primary Sensory Neurons in Early Experimental Diabetes” *Diabetes*, 29 (3) 182-187; Doi: 10.2337/diab.29.3.182
- Sitio Oficial de la International Association for the Study of Pain, [en línea], URL:<https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698&navItemNumber=576%202011>, [consulta: 28 de Agosto de 2017]
- Sivilotti L., y C. J. Woolf. 1994. “The contribution of GABA_A and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord” *Journal of Neurophysiology* 72 (1): 169-179;
- Snider, W. D., y S. B. McMahon. 1998. “Tackling Pain at the Source: New Ideas about Nociceptors.” *Neuron* 20 (4): 629–32. doi:10.1016/S0896-6273(00)81003-X.
- Spitzer, N. C. 2010. “How GABA Generates Depolarization.” *The Journal of Physiology* 588 (Pt 5): 757–58. doi:10.1113/jphysiol.2009.183574.
- Stoney, S. D. 1990. “Limitations on Impulse Conduction at the Branch Point of Afferent Axons in Frog

- Dorsal Root Ganglion." *Experimental Brain Research* 80 (3): 512–24. doi:10.1007/BF00227992.
- Sun, W., B. Miao, X. C. Wang, J. H. Duan, W. T. Wang, F. Kuang, R. G. Xie, et al. 2012. "Reduced Conduction Failure of the Main Axon of Polymodal Nociceptive C-Fibres Contributes to Painful Diabetic Neuropathy in Rats." *Brain* 135 (2): 359–75. doi:10.1093/brain/awr345.
- Swett, J E, Y. Torigoe, V. R. Elie, C. M. Bourassa, y P. G. Miller. 1991. "Sensory Neurons of the Rat Sciatic Nerve." *Experimental Neurology* 114 (1): 82–103. doi:10.1016/0014-4886(91)90087-S.
- Swett, J E, R P Wikholm, R H Blanks, a L Swett, y L C Conley. 1986. "Motoneurons of the Rat Sciatic Nerve." *Experimental Neurology* 93 (1): 227–52. doi:10.1016/0014-4886(86)90161-5.
- Tanaka, C. 1985. "GABA in Peripheral Tissues." *Life Sciences* 37 (c): 2221–35.
- Todd, A. J. 2010. "Neuronal Circuitry for Pain Processing in the Dorsal Horn." *Nature Reviews. Neuroscience* 11 (12): 823–36. doi:10.1038/nrn2947.
- Torebjörk, H. E., L. E. R. Lundberg, y R. H. LaMotte. 1992. "Central Changes in Processing of Mechanoreceptive Input in Capsaicin-Induced Secondary Hyperalgesia in Humans." *The Journal of Physiology* 448: 765–80. doi:10.1113/jphysiol.1992.sp019069.
- Towers, S, A Princivale, A Billinton, M Edmunds, B Bettler, L Urban, J Castro-Lopes, y N G Bowery. 2000. "GABAB Receptor Protein and mRNA Distribution in Rat Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia." *The European Journal of Neuroscience* 12 (9): 3201–10.
- Tretter, V, N Ehya, K Fuchs, y W Sieghart. 1997. "Stoichiometry and Assembly of a Recombinant GABAA Receptor Subtype." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17 (8): 2728–37. doi:10.1085/jgp.110.5.485.
- Wang, Xiu-Li, Qi Zhang, Ying-Ze Zhang, Yan-Tao Liu, Rui Dong, Qiu-Jun Wang, y Yue-Xian Guo. 2011. "Downregulation of GABAB Receptors in the Spinal Cord Dorsal Horn in Diabetic Neuropathy." *Neuroscience Letters* 490 (2). Elsevier Ireland Ltd: 112–15. doi:10.1016/j.neulet.2010.12.038.
- Wang, Y., T. Summers, W. Peterson, E. Müller, y B. D. Burrell. 2015. "Differential Effects of GABA in Modulating Nociceptive vs. Non-Nociceptive Synapses." *Neuroscience* 298. IBRO: 397–409. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.04.040.
- Watanabe, M., K. Maemura, K. Kanbara, T. Tamayama, y H. Hayasaki. 2002. "GABA and GABA Receptors in the Central Nervous System and Other Organs." *International Review of Cytology* 213: 1–47. doi:10.1016/S0074-7696(02)13011-7.
- Witschi, R., P. Punnakal, J. Paul, J.-S. Walczak, F. Cervero, J.-M. Fritschy, R. Kuner, R. Keist, U. Rudolph, y H. U. Zeilhofer. 2011. "Presynaptic 2-GABAA Receptors in Primary Afferent Depolarization and Spinal Pain Control." *Journal of Neuroscience* 31 (22): 8134–42. doi:10.1523/JNEUROSCI.6328-10.2011.
- Woolf, C. J. 2010. "Review Series Introduction What Is This Thing Called Pain?" *The Journal of Clinical Investigation* 120 (11): 10–12. doi:10.1172/JCI45178.3742.
- Yaksh, T. L. 1999. "Spinal Systems and Pain Processing: Development of Novel Analgesic Drugs with Mechanistically Defined Models." *Trends in Pharmacological Sciences* 20 (8): 329–37. doi:10.1016/S0165-6147(99)01370-X.
- Zeilhofer, H. U., H. Wildner, y G. E. Yevenes. 2012. "Fast Synaptic Inhibition in Spinal Sensory Processing and Pain Control." *Physiological Reviews* 92 (1): 193–235. doi:10.1152/physrev.00043.2010.
- Zeilhofer, H. U., D. Benke, y G. E Yevenes. 2012. "Chronic Pain States: Pharmacological Strategies

to Restore Diminished Inhibitory Spinal Pain Control.” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 52: 111–33. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134636.

Zemoura, K., W. T. Ralvenius, P. Malherbe, y D. Benke. 2016. “The Positive Allosteric GABAB Receptor Modulator Rac-BHFF Enhances Baclofen-Mediated Analgesia in Neuropathic Mice.” *Neuropharmacology* 108. Elsevier Ltd: 172–78. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.04.028.

Zhou, L, y S Y Chiu. 2001. “Computer Model for Action Potential Propagation through Branch Point in Myelinated Nerves.” *Journal of Neurophysiology* 85 (1): 197–210.

Zhu, Y., S. G. Lu, y M. S. Gold. 2012. “Persistent Inflammation Increases GABA-Induced Depolarization of Rat Cutaneous Dorsal Root Ganglion Neurons in Vitro.” *Neuroscience* 220: 330–40. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.06.025.