

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y  
NEUROCIENCIAS

**Participación de los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> en el  
dolor neuropático en ratas diabéticas**

T E S I S

Que presenta

JOSÉ EDUARDO HERNÁNDEZ REYES

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y  
MOLECULAR

Directores de tesis

Dr. Vinicio Granados Soto y Dr. José Rodolfo Delgado Lezama

## **AGRADECIMIENTO A CONACYT**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca con número 587956, otorgada durante la duración de mi proyecto de maestría.

## CONTENIDO

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
Diabetes	6
Clasificación de diabetes	7
Dolor neuropático	8
Transmisión nociceptiva	10
Receptores GABA <sub>A</sub>	11
Desinhibición GABAérgica	12
Regulación de la actividad de KCC2 por BDNF	14
Receptores $\alpha_5$ GABA <sub>A</sub> en el dolor	14
Reflejo de Hoffman	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS PARTICULARES	17
MATERIALES Y MÉTODOS	
Hiperglucemia inducida por STZ	17
Prueba de alodinia táctil	18
Registro del reflejo de Hoffman	18
Depresión dependiente de la frecuencia del reflejo de Hoffman	18
Análisis de resultados	19
RESULTADOS	
Efectos de la administración de estreptozotocina en la glucosa sérica.	20
Efecto de la estreptozotocina en el peso de los animales	21
Efecto de la STZ en la respuesta a la aplicación de presión mecánica con filamentos de Von Frey	21

Efecto de la aplicación intratecal de L-655,708 en los animales adultos sanos y tratados con estreptozotocina	22
Efecto de la aplicación intratecal de L-655,708 en los animales sanos y tratados neonatalmente con estreptozotocina	23
Efecto analgésico de L-655,708 es dependiente de la dosis	24
Efecto de L-655,708 en la depresión dependiente de la frecuencia del reflejo de Hoffman en ratas sanas y tratadas con estreptozotocina	26
DISCUSIÓN	
Modelos de diabetes inducida por STZ	28
Papel de los receptores $\alpha_5$ GABAA en animales sanos	29
Acción analgésica de L-655,708 es dependiente de la concentración	30
Papel antinociceptivo y pronociceptivo de los receptores $\alpha_5$ GABA <sub>A</sub>	31
REFERENCIAS	33

## RESUMEN

La diabetes es una de las principales causas de morbimortalidad a nivel mundial, el desarrollo de dolor neuropático es una de sus complicaciones. El modelo de diabetes inducida por estreptozotocina en ratas ha sido una herramienta para el estudio de esta patología. Los reportes indican que, en las ratas diabéticas con dolor neuropático que presentan alodinia e hiperalgesia hay una disminución en la expresión del cotransportador de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  (KCC2) en el asta dorsal de la médula espinal. En el dolor neuropático inducido por lesión de los nervios periféricos, se ha demostrado que en las neuronas de la lámina I, también se presenta una disminución en la expresión del transportador KCC2, producido por la activación del receptor TrKB por BDNF, lo que induce la despolarización del potencial de equilibrio del  $\text{Cl}^-$ , de tal modo que cuando se activan los receptores  $\text{GABA}_A$  el  $\text{Cl}^-$  en lugar de entrar sale de la neurona. Por lo tanto, la acción del GABA pasa de ser inhibitoria a excitadora. Aun cuando no se ha demostrado que también esto ocurra en ratas diabéticas, podría ser el factor que determina la aparición de alodinia en estos animales, ya que el bloqueo de los receptores  $\text{GABA}_A$  con bicuculina produjo analgesia y revirtió la pérdida de la depresión del reflejo de Hoffman. De relevancia es que en el modelo de dolor crónico inducido por formalina se produce analgesia y recuperación de la depresión dependiente de la frecuencia del reflejo de Hoffman después de bloquear de los receptores extrasinápticos  $\alpha_5\text{GABA}_A$  con L-655,708. En base a estos antecedentes, en el presente trabajo nos propusimos investigar el papel que desempeñan los receptores  $\alpha_5\text{GABA}_A$  en el dolor neuropático en ratas diabéticas que presentaron alodinia táctil y pérdida de la depresión dependiente de la frecuencia del reflejo de Hoffman. La administración intratecal L-655,708, agonista inverso de los receptores  $\alpha_5\text{GABA}_A$ , produjo analgesia dependiente de la concentración así como recuperación de la depresión dependiente de la frecuencia del reflejo de Hoffman. Adicionalmente, en ratas sanas la administración intratecal de L-655,708 indujo un efecto contrario al observado en ratas diabéticas, presentaron alodinia táctil y una pérdida de la depresión dependiente de la frecuencia del reflejo de Hoffman. Los resultados sugieren que los receptores extrasinápticos  $\alpha_5\text{GABA}_A$ , tónicamente activados por GABA del medio extracelular, desempeñan un papel antinociceptivo en animales sanos y pronociceptivo en aquellos con dolor neuropático.

## ABSTRACT

Diabetes is one of the main causes of morbidity and mortality worldwide, the development of neuropathic pain is one of its complications. The model of diabetes induced by streptozotocin in rats has been a tool for the study of this pathology. Reports indicate that in diabetic rats with neuropathic pain that present allodynia and hyperalgesia there is a decrease in the expression of the cotransporter of Cl<sup>-</sup> and K<sup>+</sup> (KCC2) in the dorsal horn of the spinal cord. In the neuropathic pain induced by peripheral nerve injury, it has been shown that in the neurons of lamina I, there is also a decrease in the expression of the KCC2 cotransporter, produced by the activation of the TrkB receptor by BDNF, which induces the depolarization of the equilibrium potential of Cl<sup>-</sup>, so that when the GABA<sub>A</sub> receptors are activated the Cl<sup>-</sup> instead of entering leaves the neuron. Therefore, the action of GABA changes from being inhibitory to excitatory. Although this has not been shown to occur in diabetic rats as well, it may be the factor that determines the occurrence of allodynia in these animals, since the expression of cotransporter KCC2 is also reduced in the dorsal horn of the spinal cord, as in nerve injury neuropathy. In addition, blockade of GABA<sub>A</sub> receptors with bicuculline produced analgesia and reversed the loss of frequency-dependent depression of the Hoffman reflex. It is noteworthy that in the formalin-induced chronic pain model analgesia and recovery of the frequency-dependent depression of the Hoffman reflex are produced after blocking the extrasynaptic  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> receptor with L-655,708. Based on this background, in the present work we aimed to investigate the role of  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> receptors in neuropathic pain in diabetic rats who presented tactile allodynia and loss of frequency-dependent depression of the Hoffman reflex. Intrathecal administration L-655,708, a  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> receptor agonist, produced concentration-dependent analgesia as well as recovery of the frequency-dependent depression of the Hoffman reflex. In addition, in healthy rats the intrathecal administration of L-655,708 induced an effect contrary to that observed in diabetic rats, presented tactile allodynia and a loss of frequency-dependent depression of the Hoffman reflex. The results suggest that extrasynaptic  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> receptors, tonically activated by GABA from the extracellular medium, play an antinociceptive and pronociceptive role in healthy animals and with neuropathic pain, respectively.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Diabetes**

La diabetes es una enfermedad de etiología múltiple, caracterizada por hiperglucemia crónica, un desorden en el metabolismo de los carbohidratos, grasa y proteínas que resultan de una secreción deficiente de insulina, de la acción de la insulina en tejidos blanco o ambos. Los efectos de la diabetes incluyen daño a largo plazo, disfunción y falla de varios órganos. La hiperglucemia puede ocasionar cambios funcionales y patológicos de larga duración que incluyen un desarrollo progresivo de complicaciones como retinopatía, nefropatía y/o neuropatía.

En el desarrollo de la diabetes se involucran varios procesos patogénicos, como la destrucción de las células beta pancreáticas con la consecuente deficiencia de insulina y otros que resultan en resistencia a la acción de la insulina (OMS, 1999). Se estima que para el 2020, el 10% de la población mundial tendrá algún tipo de diabetes, principalmente diabetes tipo 2. El 95% de la población con diabetes presenta algún tipo de complicación derivada de su enfermedad como las microvasculares y macrovasculares que afectan diversos órganos y sistemas, llegando a ser incapacitantes. Esto tiene un gran impacto socio-económico (Ibarra y Rocha, 2012).

### **Clasificación de diabetes**

La diabetes tipo 1 antes denominada diabetes dependiente de insulina o juvenil se produce por una destrucción autoinmune de las células beta del páncreas, la velocidad de la destrucción es variable entre individuos, siendo más rápido en infantes que en adultos. En este tipo de diabetes la insulina se requiere para sobrevivir y prevenir el desarrollo de complicaciones como cetoacidosis, coma y muerte.

La diabetes tipo 2 antes denominada diabetes no dependiente de insulina o adulta, es un término que se utiliza en individuos con relativa deficiencia de insulina (y no absoluta como en la diabetes tipo 1). Es la forma más común de diabetes, se caracteriza por un desorden en la acción de la insulina y/o de la secreción de la insulina. Frecuentemente las personas con este tipo de diabetes son resistentes a la acción de la insulina. Esta forma de diabetes no se diagnostica a tiempo debido a que la hiperglicemia no es lo suficientemente

severa como para provocar síntomas importantes, sin embargo estos pacientes se encuentran en riesgo de desarrollar complicaciones macrovasculares y microvasculares. La causa específica para el desarrollo de estos desordenes no se conocen (ADA, 2010).

Existen otros tipos de diabetes menos comunes, en los que la causa se puede determinar de manera relativamente específica como diabetes relacionada a desnutrición, farmacológica y gestacional.

En la población mexicana el 95% de los pacientes con diabetes tipo 2 presenta algún tipo de complicación secundaria a un mal manejo de su enfermedad. Las complicaciones se clasifican de acuerdo a su afección microvascular o macrovascular y abarcan principalmente la pérdida total o parcial de la visión, arterioesclerosis, eventos cerebrovasculares o alguna manifestación de neuropatía. Casi la mitad de estos individuos con complicaciones presentan alguna afección neuropática con síntomas como parestesias, pérdida de la sensibilidad y/o dolor neuropático (Hernández et al., 2013).

### **Dolor neuropático**

El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular real o potencial, o descrita en términos de dicho daño. La alteración patológica y/o de la función del sistema somatosensorial central o periférico puede resultar en el desarrollo de dolor neuropático (IASP, 2012).

La diabetes es una de las principales causas de neuropatía periférica. El dolor neuropático por diabetes es consecuencia de alteraciones en el sistema periférico somatosensorial. Estas son consecuencia de cambios metabólicos y microvasculares asociados a la toxicidad por hiperglicemia (Tsfaye et al., 2010). El dolor neuropático, también es causado por lesión del sistema nervioso periférico o central, que cuando ocurre en las neuronas aferentes primarias se activan potenciales de acción espontáneos generados en los sitios dañados, conocidos como neuromas (Wall y Devor, 1983; Basbaum et al., 2009), así como en los somas de los ganglios de la raíz dorsal. Se propone que estos potenciales producen cambios plásticos en la médula espinal que afectan la inhibición GABAérgica y glicinérgica, que funciona como un inhibidor de la entrada de información proveniente de las fibras aferentes primarias de bajo umbral y nociceptivas, dando lugar a la sensibilización central (Baron, 2000). Cuando se alteran los mecanismos que integran y



regulan la información nociceptiva, el dolor se vuelve patológico llegando a ser debilitante e incapacitante. De acuerdo a su duración, el dolor se clasifica en agudo o crónico (Basbaum et al., 2009).

### **Transmisión nociceptiva**

Las neuronas que transmiten la información desde la periferia hacia la médula espinal son neuronas bipolares y se denominan fibras aferentes primarias (FAP). Su soma se encuentra en el ganglio de la raíz dorsal y su axón se proyecta hacia la periferia y hacia la médula espinal. La terminal periférica de las FAP está asociada a receptores sensibles a diferentes tipos de energía, como mecánica, térmica o química que la transducen en potenciales de acción. Esta característica les permite transmitir la información nociceptiva, no nociceptiva y propioceptiva desde la periferia hacia la médula espinal. Son varias las propiedades que distinguen a los diferentes tipos de fibras aferentes, como la morfología y la velocidad de conducción. En la rata, por su velocidad de conducción se clasifican en: A  $\alpha$  o tipo I (30-55 m/s); A  $\beta$  o tipo II (14-30 m/s); A  $\delta$  o tipo III (2.2-8 m/s) y C o tipo IV (< 1.4 m/s) (Erlanger y Gasser, 1994). Las fibras más rápidas (A  $\alpha$  y A  $\beta$ ) son principalmente musculares (propioceptivas) y cutáneas, mientras que las más lentas son nociceptivas (A  $\delta$  y C) (Basbaum et al., 2009).

La médula espinal se encuentra organizada anatómica y fisiológicamente en láminas (Fig. 1). En particular, las neuronas de las láminas I-II y la sección más profunda de la lámina IV, donde se procesa la información nociceptiva reciben entradas sinápticas de las fibras nociceptivas A  $\delta$ . Las aferentes de conducción rápida A  $\beta$  proyectan a láminas profundas (III, IV y V) y las fibras C, proyectan a láminas más superficiales, principalmente lámina I y II (Todd, 2010).

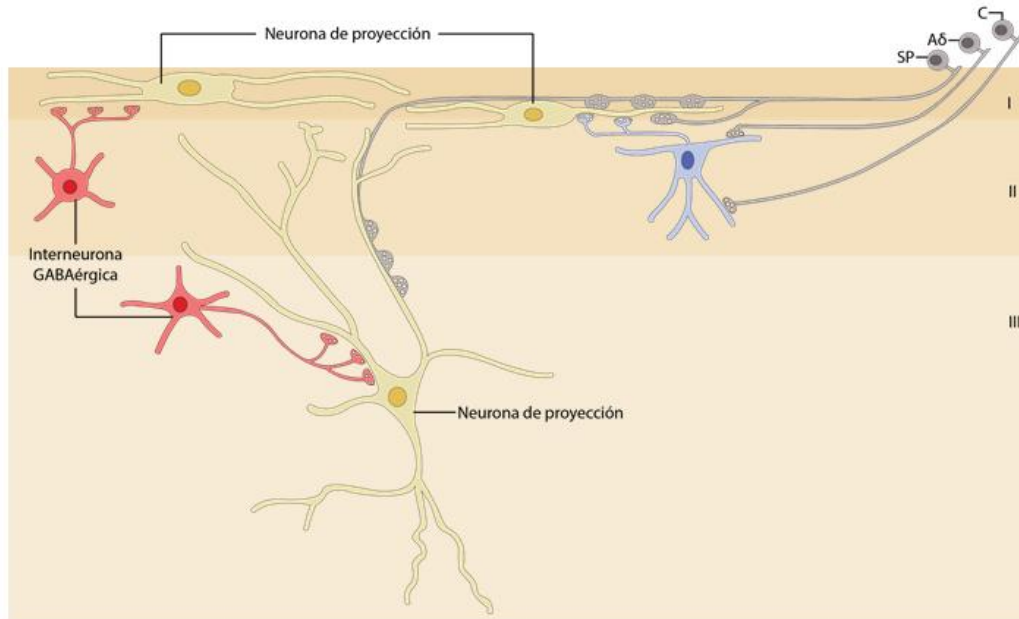


Figura 1. Organización laminar de las neuronas de proyección del asta dorsal de la médula espinal y. Modificada de Todd, 2010.

En la médula espinal el relevo principal de la entrada sensorial nociceptiva está constituido por neuronas de proyección localizadas entre las láminas I-III y V, constituyendo la principal salida de información hacia núcleos de procesamiento supraespinal. Las neuronas de proyección reciben sinapsis de interneuronas excitadoras glutamatérgicas e inhibitoras GABAérgicas y glicinérgicas. La importancia de la inhibición neuronal para el procesamiento de la información nociceptiva en la médula espinal es la base de la “teoría de la compuerta” (Melzack y Wall, 1965). La disminución de esta inhibición explica algunos modelos de dolor crónico (Woolf et al., 2000). Esto se basa en las evidencias que muestran que el bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> produce hipersensibilidad al dolor, semejante a la observada en los modelos animales con neuropatía (Sivilotti y Wolff, 1994). Estos resultados demuestran que los receptores GABA<sub>A</sub> tienen un papel relevante en el procesamiento de la información nociceptiva en el asta dorsal de la médula espinal (Basbaum et al., 2009; Todd, 2012; Bonin y De Koninck, 2013; Baz et al., 2014).

## Receptores GABA<sub>A</sub>

Los receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub> pertenecen a la familia de los receptores activados por ligando cys-loop (Fig. 2). Son receptores pentaméricos conformados por una combinación de 16 subunidades ( $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$  y  $\rho_{1-3}$ ) y algunas variaciones por splicing alternativo (Olsen et al., 2009).

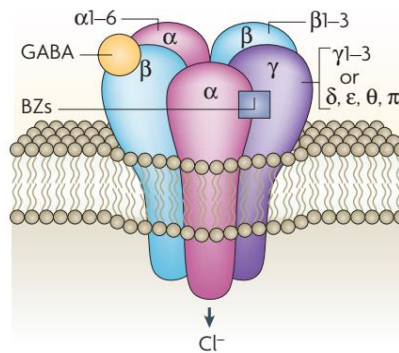


Figura 2. Subunidades que conforman los receptores GABA<sub>A</sub>. El sitio de unión del GABA se encuentra entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , el sitio de unión de las benzodiazepinas entre  $\beta$  y  $\gamma$ . Tomado de Jacob et al., 2008

Las posibles combinaciones de las diferentes subunidades dan un número muy amplio de receptores, no obstante, funcionalmente solo se expresan 19. El subtipo que se expresa de manera amplia está conformado por las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta_2$  y  $\gamma_2$ . La estequiometría más común es  $2\alpha$ ,  $2\beta$  y  $1\gamma$ , distribuidos de manera simétrica alrededor de un canal, permeable a aniones, comúnmente  $\text{Cl}^-$  y bicarbonato (Fig. 2). Los receptores que poseen las subunidades  $\gamma_1$ ,  $\gamma_3$  o  $\delta$  son menos abundantes. La importancia funcional del receptor reside en las subunidades que lo conforman, lo que determina no solo sus propiedades biofísicas y farmacológicas, sino también su distribución en la superficie celular (Olsen et al., 2008). Por ejemplo, los receptores con subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  y  $\gamma_2$  son preferentemente sinápticos (Fig. 3), median la inhibición sináptica fásica. Los receptores con subunidades  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$  y  $\alpha_6$  son predominantemente extrasinápticos, producen una inhibición y un corto circuito tónicos (disminución de la resistencia de entrada) (Farrant y Nusser, 2005).

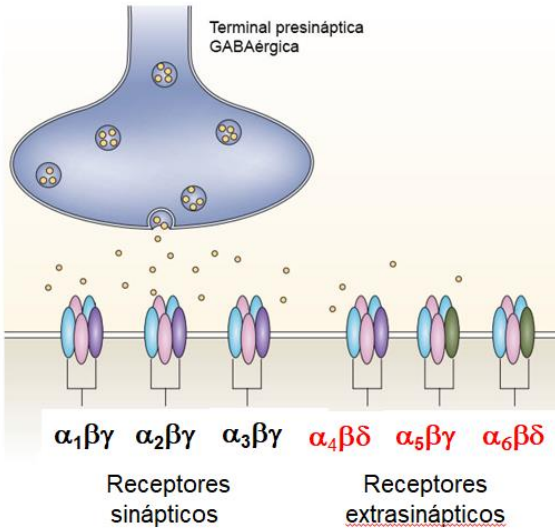


Figura 3. Receptores GABA<sub>A</sub> sinápticos y extrasinápticos.

### Desinhibición GABAérgica

En experimentos de comportamiento en animales sin daño neuronal, el bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> con bicuculina induce hipersensibilidad al dolor, semejante a la que se presenta en el modelo de dolor neuropático e inflamatorio que se acompaña de alodinia e hiperalgesia (Sivilotti y Woolf, 1994). En estudios electrofisiológicos realizados en rebanadas de la médula espinal, se demostró que después de bloquear los receptores GABA<sub>A</sub>, las neuronas nociceptivas de la lámina I responden a estímulos inocuos. (Keller et al, 2007). Por lo tanto, la pérdida del control inhibitorio en la lámina I del asta dorsal de la médula espinal revela una red polisináptica excitadora activada por aferentes nociceptivas y no nociceptivas, que convergen en vías nociceptivas específicas, lo que podría explicar el fenómeno de alodinia (Bonin y De Koninck, 2013).

La inhibición neuronal mediada por los receptores GABA<sub>A</sub> se da por el movimiento de iones de Cl<sup>-</sup> a través de la membrana, lo que resulta en la hiperpolarización por la entrada del ion Cl<sup>-</sup>, esto ocurre porque el E<sub>Cl<sup>-</sup></sub> es más negativo que el potencial de membrana (V<sub>m</sub>), como sucede en el sistema nervioso central (SNC) maduro, donde la concentración del ion Cl<sup>-</sup> intracelular se mantiene por la acción del cotransportador K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>, KCC2, que transporta ambos iones hacia el exterior celular (Rivera et al., 1999). La expresión de este cotransportador aumenta de manera gradual durante la maduración

neuronal, etapa donde se expresa el cotransportador de  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$  (NKCC1) que introduce  $\text{Cl}^-$ , de tal modo que en neuronas inmaduras las concentraciones de  $\text{Cl}^-$  son más altas, resultando en un  $E_{\text{Cl}^-}$  más despolarizado que  $V_m$ . Se ha propuesto que la actividad despolarizante dada por activación de los receptores  $\text{GABA}_A$  contribuyen a la maduración y migración neuronal (Ben-Ari, 2002).

En el SNC maduro, el potencial de equilibrio del  $\text{Cl}^-$  se encuentra alrededor de -70 mV. Por lo tanto, si el  $V_m$  es más positivo que el  $E_{\text{Cl}^-}$  la activación de los receptores  $\text{GABA}_A$  producida por dos moléculas de GABA, permitirá la entrada del ion cloruro al interior de la célula, produciendo inhibición por la hiperpolarización transitoria mediada por los receptores sinápticos o tónica por los extrasinápticos, disminuyendo la probabilidad de activación de potenciales de acción (Farrant y Nusser, 2005). En neuronas donde el potencial  $V_m$  es igual al  $E_{\text{Cl}^-}$  la inhibición no se da por la hiperpolarización de la membrana, sino por el corto circuito que se traduce en una reducción de la resistencia de entrada, resultando en una disminución de la amplitud de los potenciales sinápticos excitadores, así como la acortamiento de la ventana temporal para la integración sináptica, debido a reducción de la constante de tiempo de la membrana (Wlodarczyk et al., 2013).

En el dolor neuropático inducido por ligadura del nervio ciático se ha demostrado que la expresión de KCC2 disminuye en las neuronas de la lámina I, lo que resulta en la acumulación del cloruro intracelular. Bajo estas condiciones, el potencial de equilibrio del cloro se encuentra aproximadamente en -35mV, más despolarizado que  $V_m$  (Coull et al., 2003). Por consiguiente, la activación de los receptores  $\text{GABA}_A$  resultará en la salida de cloruro del interior celular, produciendo despolarización o incremento de la excitabilidad de la neurona, aumentando la probabilidad de generar potenciales de acción. Estos resultados se han obtenido con registros de *patch-clamp* de neuronas de la lámina I de ratas neuropáticas. En estos experimentos la desinhibición GABAérgica se convirtió en excitación, de tal modo que el GABA despolariza a las neuronas llegando a activar potenciales de acción (Coull et al., 2003). En apoyo a este resultado está el hallazgo obtenido en ratas sanas, en las que el bloqueo del cotransportador KCC2 resultó en una disminución del umbral nociceptivo, replicando los síntomas observados en el dolor neuropático (Coull et al., 2003).

## **Regulación de la actividad de KCC2 por BDNF**

La expresión del cotransportador KCC2 se encuentra regulada por la acción del *Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro* (BDNF) que tiene como receptor al TrkB. En estudios realizados en cultivos de neuronas se encontró que la exposición a BDNF produce una regulación a la baja del mRNA y de la proteína KCC2 (Rivera et al., 2002). Además, se observó que el tratamiento agudo de rebanadas de médula espinal con BDNF despolarizó el potencial de equilibrio del Cl<sup>-</sup> lo suficiente como para convertir la corriente entrante de Cl<sup>-</sup> en saliente, a través de los receptores GABA<sub>A</sub> resultando en la conversión de acción de inhibidora a excitadora. El papel del BDNF en la inducción del dolor neuropático se probó bloqueando su acción con un anticuerpo contra su receptor TrkB, este tratamiento previno el cambio en el potencial de equilibrio del Cl<sup>-</sup>, lo que se tradujo en la disminución de la alodinia táctil en animales con daño neural (Coull et al., 2005).

El BDNF, responsable de la regulación a la baja del co-transportador KCC2 en las neuronas de la lámina I de la médula espinal, es sintetizado y liberado por la microglía activada posiblemente por el ATP proveniente de las neuronas sensoriales dañadas, que además induce la expresión de los receptores purinérgicos P2X4 (Beggs et al., 2012). Esto se puso en evidencia al bloquear la expresión del receptor purinérgico P2X4, lo que disminuyó la alodinia táctil en el modelo de neuropatía por daño neural (Tsuda et al., 2003).

En el modelo de dolor neuropático por diabetes, no hay evidencia directa que demuestre la pérdida de la inhibición GABAérgica en las neuronas de proyección de la lámina I. No obstante, en este modelo se ha demostrado una disminución de la expresión del cotransportador KCC2 en el asta dorsal de la médula espinal (Jolivalt et al., 2008), lo que convertiría la acción del GABA de inhibidor a excitador. En apoyo a esto, se encontró que el bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> con bicuculina produjo analgesia y reversión de la pérdida de la depresión dependiente de la frecuencia del reflejo de Hoffman (Jolivalt et al., 2008).

## **Receptores $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> en el dolor**

Por lo antes mencionado, se puede concluir que los receptores GABA<sub>A</sub> tienen un papel muy relevante en el circuito de la médula espinal que regula la información nociceptiva, no obstante, poco se sabe de la participación de los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> en este circuito. En modelos de dolor neuropático inducido por ligadura de nervios periféricos e inflamatorio, el bloqueo de estos receptores con L-655,708, un agonista inverso, produjo analgesia y revirtió la pérdida de la depresión dependiente de la frecuencia del reflejo de Hoffman (Bravo-Hernández et al., 2016). Lo que sugiere que en el dolor crónico por neuropatía e inflamación los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> desempeñan un papel pronociceptivo. En las neuronas de la lámina I estos receptores son del tipo extrasináptico, como lo demostraron Perez-Sanchez et al. (2017), registrando la corriente tónica GABAérgica, encontraron que ésta desapareció en ratones *knock out* para los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>, sin que se afectara la corriente GABAérgica sináptica fásica espontánea, confirmando la localización extracelular de estos receptores (Perez-Sanchez et al., 2016). Además, se encontró que en estos ratones se incrementó la sensibilidad de la hiperalgesia inducida por formalina, lo que sugirió que los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> tienen un papel antinociceptivo en ratones sanos (Perez-Sanchez et al., 2016). En la discusión de este trabajo, los autores critican el resultado reportado por Bravo-Hernández et al. (2016). Mencionan que la analgesia producida por L-655,708, a la concentración empleada podría tener una acción inespecífica, lo que pone en duda que estuviera actuando solo en los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>. Si bien esto es posible, estos autores no discuten el hecho que la analgesia es producida por el bloqueo de receptores GABA<sub>A</sub> (Perez-Sanchez et al., 2015), lo que también se observó en la neuropatía diabética, donde se indujo analgesia bloqueando los receptores GABA<sub>A</sub> con bicuculina (Jolivalt et al., 2008).

## **Reflejo de Hoffman**

El reflejo de Hoffman (RH) se activa por la estimulación eléctrica de las fibras aferentes tipo Ia que hacen contacto monosináptico con las motoneuronas en la médula espinal (Fig. 4). El RH se puede evocar por estimulación eléctrica transcutánea o cutánea de un nervio y se observa por el registro de la actividad eléctrica del músculo homónimo. Este

reflejo se ha utilizado ampliamente en modelos animales con dolor, así como en humanos para obtener información de cambios en la excitabilidad de las motoneuronas (Gozariu et al., 1998).

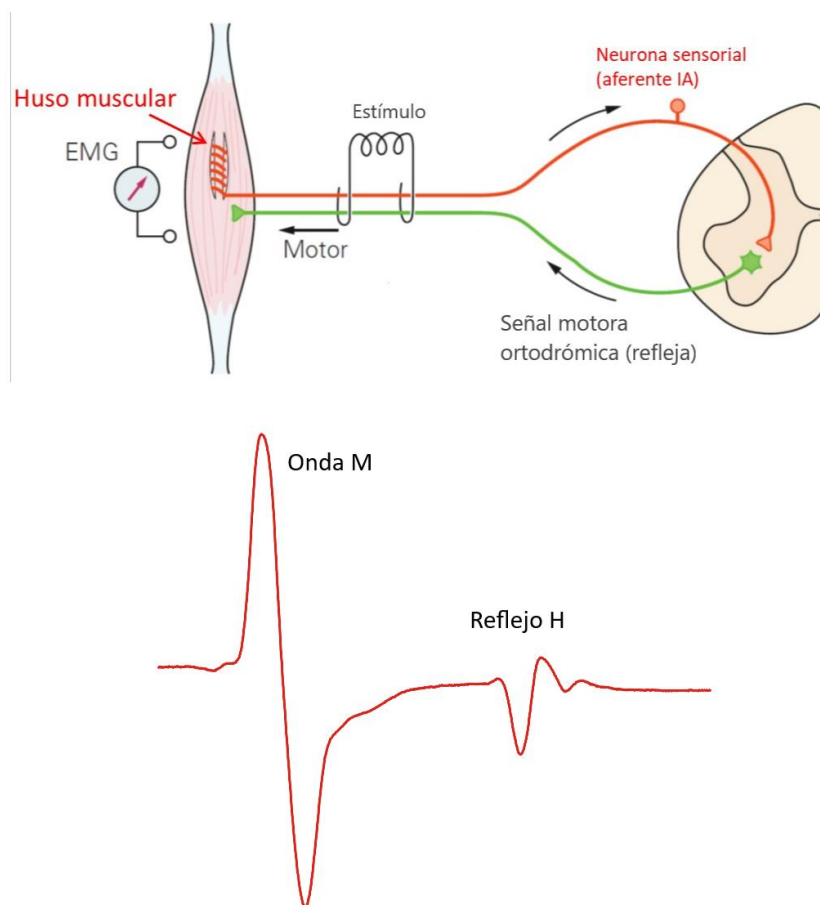


Figura 4. Esquema representativo del registro del arco reflejo de Hoffman. La estimulación eléctrica del nervio activa las fibras aferentes primarias Ia que excitan monosinápticamente las motoneuronas homónimas, lo que resulta en la activación refleja del músculo homónimo (Reflejo de Hoffman; RH) que se registra con un par de electrodos conectados a un amplificador de AC. El estímulo eléctrico activa directamente las fibras eferentes del músculo produciendo la respuesta M que antecede el RH.

La depresión dependiente de la frecuencia del reflejo H se ha utilizado en humanos y en roedores para evaluar la inhibición GABAérgica. Debido a que cuando la depresión se



pierde, ésta se restaura bloqueando los receptores GABA<sub>A</sub> de en la médula espinal (Jolivalt et al., 2008). La depresión dependiente de la frecuencia del RH se encuentra alterada en modelos de dolor neuropático producido por daño espinal o del sistema nervioso periférico, así como en humanos que presentan dolor por traumatismos (Gozariu et al., 1998).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Hasta la fecha no se conocen los mecanismos que subyacen la neuropatía diabética. Por lo tanto, no existe un tratamiento integral y completo de este padecimiento.

Los cambios funcionales y morfológicos que subyacen el dolor crónico se han descrito principalmente en modelos de dolor neuropático inducido por ligadura del nervio ciático e inflamatorio inducido por sustancias químicas. Se ha propuesto que en el sistema nervioso se presentan cambios plásticos estructurales y de expresión proteica que explican el mecanismo de la pérdida de la inhibición GABAérgica en la médula espinal.

El grupo de Calcutt y col. demostraron que el bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub>, con bicuculina, produce analgesia y revierte la pérdida de la depresión dependiente de la frecuencia del RH en ratas diabéticas con dolor neuropático (Jolivalt et al., 2008). Los hallazgos de nuestro grupo (Bravo-Hernandez et al., 2016) han demostrado que en ratas con dolor inflamatorio agudo y crónico (inducido por formalina y el coadyuvante de Freund) y neuropático (inducido por ligadura de los nervios espinales), el bloqueo de los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> produce analgesia, además, se revirtió la pérdida de la depresión dependiente de la frecuencia del RH. Estos resultados sugieren que los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> podrían tener una acción pronociceptiva en estos modelos animales de dolor crónico y neuropático.

## **HIPÓTESIS**

Los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> desempeñan un papel pronociceptivo en la neuropatía diabética y antinociceptivo en los animales sanos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Demostrar que en animales con neuropatía diabética el bloqueo de los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> extrasinápticos espinales produce analgesia y restaura la depresión dependiente de la frecuencia del RH, mientras que en los animales sanos tienen el efecto contrario, su bloqueo produce alodinia y pérdida de la depresión dependiente de la frecuencia del RH.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Mediante la inyección de estreptozotocina en ratas neonatas y adultas se establecerán dos modelos de neuropatía diabética.

2. Para determinar el curso temporal del establecimiento de la diabetes y de la aparición de la alodinia mecánica se evaluarán cada dos semanas los niveles de glucosa sérica y el umbral de retiro ante la aplicación de un estímulo con los filamentos de Von Frey.

3. Mediante la inyección intratecal de L-655,708, agonista inverso de los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>, se evaluará el papel de estos receptores en ratas sanas y con neuropatía diabética.

4. Activar el reflejo de Hoffman en animales sanos y con neuropatía y obtener la curva de reclutamiento.

5. Evaluar el papel de los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> en la depresión dependiente de la frecuencia del reflejo de Hoffman en animales sanos y con neuropatía diabética.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Hiper glucemia inducida por estreptozotocina (STZ)**

Se utilizarán ratas Wistar machos neonatos (5 días), con peso aproximado de 25 a 50 gramos y ratas hembras adultas (4 semanas) con un peso aproximado de 200 a 250 gramos. Se les administrará de manera intraperitoneal estreptozotocina, un antibiótico citotóxico contra células beta pancreática a una dosis de 70 mg/kg para las ratas neonatas y 50 mg/kg para las ratas adultas. Posteriormente, a partir de la semana 2 en las neonatas y la

semana 1 de adultas, se harán mediciones periódicas quincenales de la concentración de glucosa sérica, esto se realizará colocando en un glucómetro *OneTouch UltraMini* una muestra capilar de sangre tomado de la cola de cada rata.

### **Prueba de alodinia táctil**

Se colocarán las ratas sobre una malla metálica en un cuarto con temperatura controlada. Después de 30 minutos de ambientación, se evaluará la alodinia táctil con los filamentos de Von Frey. En esta prueba se estimula la planta de la pata de la extremidad posterior de la rata con distintos filamentos calibrados para ejercer una presión de 3 a 15 gramos. Se considera respuesta alodínica cuando la flexión de la extremidad de la rata ocurre a una presión menor a 4 gramos.

Bajo anestesia con isoflurano, se administrarán intratecalmente, entre las vertebrae L4 y L5, 15  $\eta$ mol de L-655,708 disueltos en 10  $\mu$ l de solución salina. Una vez que la rata se recupere de la anestesia se evaluará cada hora la alodinia táctil durante las siguientes 6 a 8 horas.

### **Registro del reflejo de Hoffman**

Bajo anestesia con ketamina (50mg/kg) y xilazina (5mg/kg), se colocará a la rata sobre una cama térmica y se sujetará la extremidad posterior izquierda en un soporte. Se estimulará eléctricamente el nervio tibial con un par de electrodos de tungsteno, conectados a una fuente de corriente e insertados transcutáneamente en la región poplíteo o maleolar. La actividad eléctrica muscular directa (M) y la refleja (H) (Fig. 4) se registrarán con un par de electrodos conectados a un amplificador de AC, insertados en el músculo interóseo de la planta de la pata de la extremidad ipsilateral.

### **Depresión dependiente de la frecuencia del reflejo de Hoffman**

Se obtendrá la curva de reclutamiento estimulando eléctricamente el nervio tibial desde una intensidad que no produzca respuesta M ni RH. Para determinar el umbral del RH se incrementará la intensidad en pasos de 20  $\mu$ A (~130  $\mu$ A, 0.5 ms). Se graficará el área bajo la curva rectificadas del RH en función de la corriente aplicada. Para evaluar la

depresión del RH, se seleccionará la corriente que produzca aproximadamente el 50% del RH máximo (Trazo rojo, Fig. 5). El registro control se registrará aplicando un tren de 10 estímulos eléctricos de 0.5 ms a una frecuencia de 0.1 Hz. Para evaluar la depresión del RH se aplicará un tren de 10 estímulos a la frecuencia 5 Hz (Fig. 11A).

A continuación, se aplicará intratecalmente el agonista inverso de los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>, L-655,708 (15  $\eta$ mol en 10  $\mu$ l). Después de 30 min se empezará a evaluar la depresión del RH aplicando el tren de estimulación eléctrica a 5 Hz.

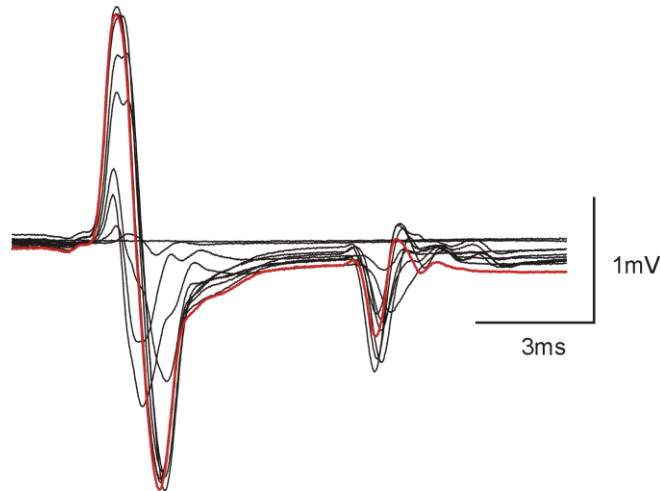


Figura 5. Curva de reclutamiento del reflejo de Hoffman. Se muestran las respuestas M de corta latencia y del RH de mayor latencia, evocados con estímulos eléctricos de intensidad creciente. En rojo se resalta el registro donde se reclutó aproximadamente el 50% del reflejo de Hoffman.

### Análisis de resultados

Se analizarán los registros del RH utilizando el *software pCLAMP 10.2*. Este debe presentar una latencia de aproximadamente 10 ms con respecto al artefacto de estimulación (Fig. 5). Se rectificará e integrará el área bajo la curva de los RH evocados con el tren de estimulación a la frecuencia de 0.1 Hz y 5 Hz. Empleando el *software OriginPro 8*, se graficarán los valores del área rectificada promedio y su error estándar de los 10 RH obtenidos a las dos frecuencias. Para el análisis estadístico de la muestra estudiada, en cada animal se normalizará el área bajo la curva de los 10 RH, tomando como 100% el área del primer RH de cada tren de

estimulación (Fig. 11B). La diferencia entre las muestras control y experimental se evaluará empleando la estadística no paramétrica ANOVA.

## RESULTADOS

### Efectos de la administración de estreptozotocina (STZ) en la glucosa sérica.

Las mediciones de la concentración de glucosa capilar se tomaron cada quince días posteriores a la administración de STZ, se presentó una hiperglicemia sostenida a partir de la segunda semana en ratas adultas (Fig. 6A) y un aumento gradual desde la primera hasta la semana sexta en ratas neonatas, alcanzando en ambos grupos un valor máximo que se mantuvo constante (Fig. 6B).

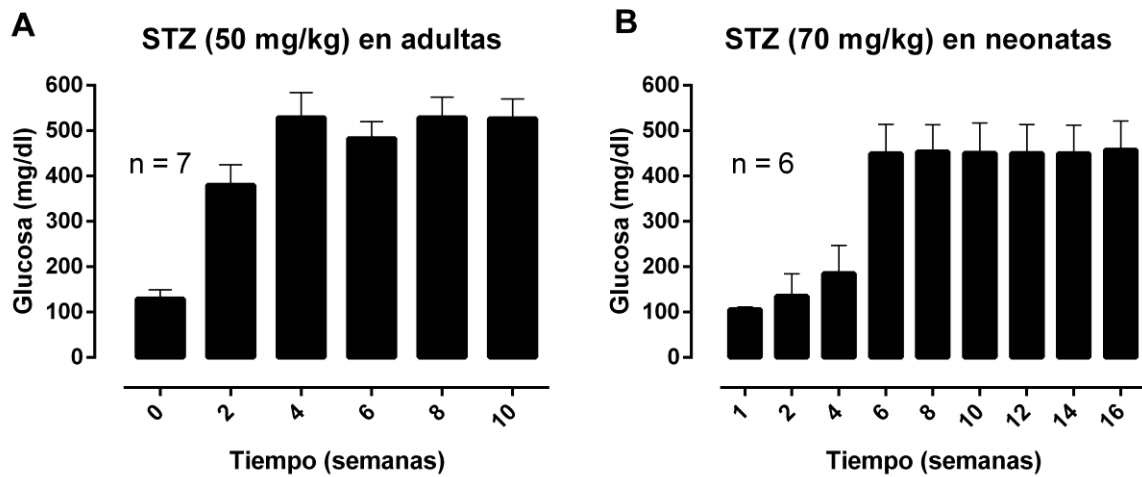


Figura 6. La administración intraperitoneal de estreptozocina induce hiperglicemia sostenida en las ratas. Los datos presentados son el promedio  $\pm$  error estándar de 7 animales adultos (A) y 6 neonatas (B) en función del tiempo después de administrada STZ.

## Efecto de la estreptozotocina en el peso de los animales

La administración de STZ, comparado con un grupo control, al que solo se le administró el vehículo, produjo una reducción en el peso a partir de la cuarta semana en ratas adultas y a partir de la décima semana en las ratas tratadas neonatalmente. Antes del inicio de la reducción en la ganancia de peso, ambos grupos presentaron cambios de peso que no fueron estadísticamente diferentes con respecto al grupo control (Fig. 7).

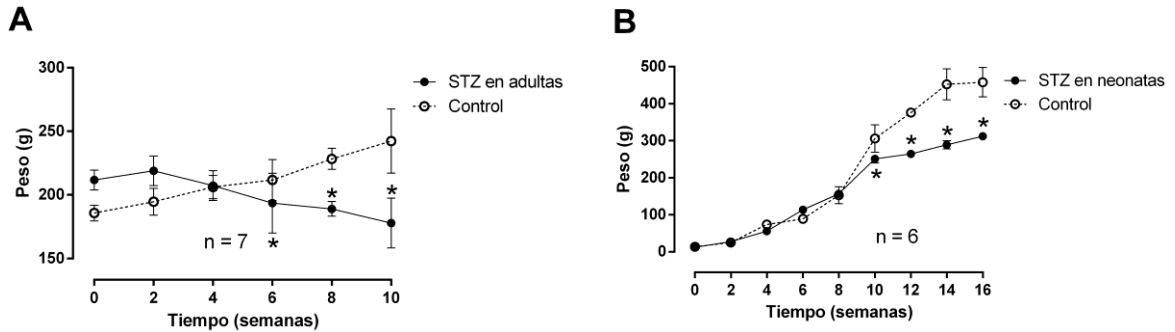


Figura 7. Efecto de STZ sobre el peso en ratas adultas (A) y en ratas tratadas neonatalmente (B). Los datos presentados son el promedio  $\pm$  error estándar. \* indica diferencia estadística ( $p < 0.0001$ ) entre los valores promedio de las ratas control y de las tratadas con STZ.

## Efecto de la STZ en la respuesta a la aplicación de presión mecánica con filamentos de Von Frey (alodinia mecánica).

Los valores del umbral de retiro de la extremidad posterior de ratas sanas se encontraron por encima de los 15 gramos de presión. En ratas adultas, posterior a la administración de STZ el umbral de retiro comenzó a disminuir gradualmente hasta ser diferente estadísticamente del valor control a partir de la sexta semana, manteniéndose en valores por debajo de 5 gramos a partir de la octava semana (Fig. 8A). En las ratas tratadas neonatalmente con STZ la disminución del umbral también fue gradual, llegando a ser estadísticamente diferente del control hasta la semana 14, bajando de 5 gramos en la semana 16 (Fig. 8B).

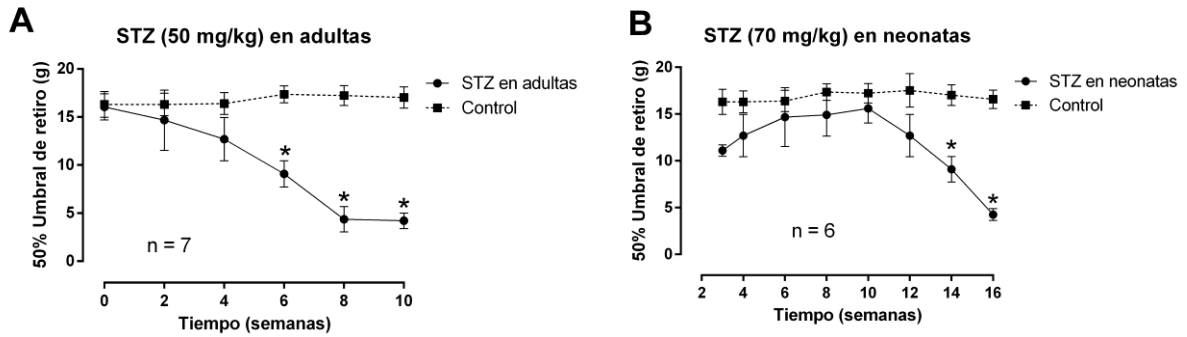


Figura 8. La administración intraperitoneal de STZ induce alodinia táctil en las ratas adultas (A, n=7, \*p < 0.0012) y así como en las tratadas neonatalmente (B, n=6, \*p < 0.0048). Las líneas discontinuas marcan el valor basal de ratas sin tratamiento. Los datos presentados son el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 6 animales.

### Efecto de la aplicación intratecal de L-655,708 en los animales adultos sanos y tratados con estreptozotocina

En ratas adultas sanas la administración intratecal de 15  $\mu$ mol de L-655,708 disuelto en 10  $\mu$ l de solución salina, produjo una disminución gradual del umbral de retiro de la extremidad posterior durante las tres horas posteriores de la aplicación, alcanzando un mínimo a las dos horas, con un umbral de retiro por debajo de 5 gramos de presión (Fig. 9A). En las ratas adultas sanas a las que se les administró solamente el vehículo presentaron un umbral de retiro de 15 g (línea punteada, Fig. 9A). En ratas adultas tratadas con STZ, que presentaron alodinia táctil con un umbral de retiro menor a 5 gramos de presión, se les administró intratecalmente L-655,708. Durante tres horas posteriores a su administración se produjo analgesia, alcanzando un efecto máximo a las dos horas, el umbral de retiro aumentó hasta valores obtenidos en ratas sanas (Fig. 9B). Estos resultados demuestran que los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> desempeñan un papel antinociceptivo en los animales sanos, mientras que en los neuropáticos su papel es pronociceptivo.

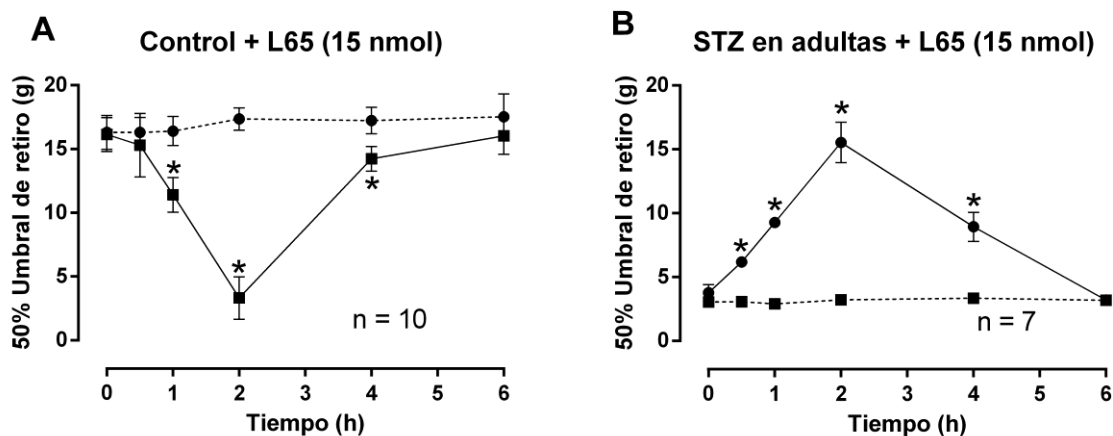


Figura 9. La administración intratecal de 15  $\eta$ mol de L-655,708 (L65) produce alodinia táctil (A, línea continua) en ratas sanas (\* $p = 0.0145$ ) y analgesia (B, línea continua) en ratas adultas tratadas con estreptozotocina (\* $p < 0.0001$ ). La línea discontinua en A indica el valor basal en ratas sin tratamiento y en B los valores basales de ratas alodínicas. Los datos presentados son el promedio  $\pm$  error estándar de 10 animales en A y 7 en B.

### Efecto de la aplicación intratecal de L-655,708 en los animales sanos y tratados neonatalmente con estreptozotocina

En ratas adultas sanas de aproximadamente 16 semanas, la administración intratecal de 15  $\eta$ mol de L-655,708, produjo durante las tres horas posteriores una disminución gradual del umbral de retiro de la extremidad posterior a la estimulación con filamentos de Von Frey, alcanzando un mínimo una hora después de la administración, con un umbral de retiro alrededor de los 7 gramos (Fig. 10A). En ratas adultas tratadas neonatalmente con STZ que presentaron alodinia táctil con un umbral de retiro a la estimulación con los filamentos de Von Frey menor a 5 gramos de presión, se les administró intratecalmente L-655,708, produciéndose analgesia que alcanzó un máximo a las cuatro horas, cercano a los valores observados en animales sanos (Fig. 10B). Este resultado sugiere que al igual que en los animales adultos los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> desempeña un papel pronociceptivo en los animales neonatos tratados con STZ, mientras que en los sanos se corroboró su papel antinociceptivo.



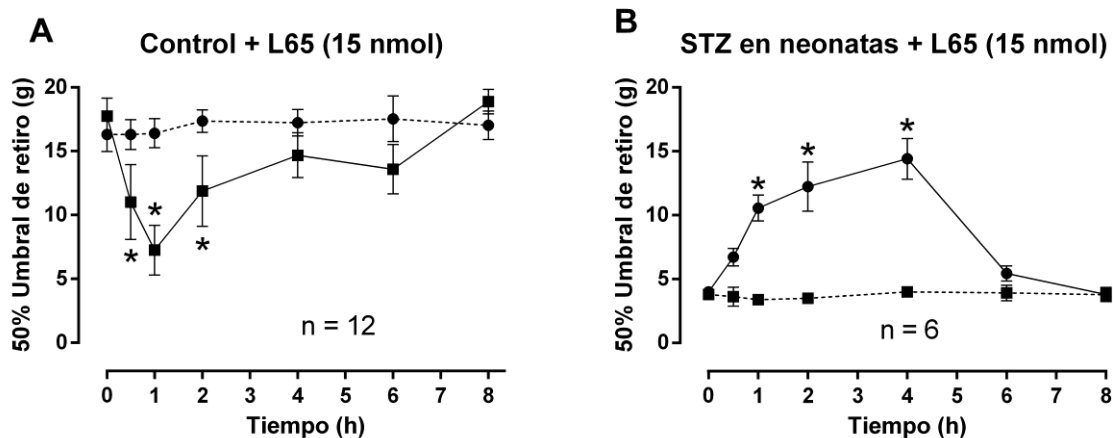


Figura 10. La administración intratecal de 15 nmol de L-655,708 produce alodinia táctil (A) en ratas sanas (A, n= 12, \*p < 0.0111) y analgesia (B, n=6, \*p < 0.0001) en ratas adultas tratadas neonatalmente con estreptozotocina. La línea discontinua marca el valor basal de ratas sin tratamiento (A) y de ratas adultas tratadas neonatalmente con STZ (B). Los datos presentados son el promedio  $\pm$  error estándar.

### Efecto analgésico de L-655,708 es dependiente de la dosis

Se emplearon ratas adultas tratadas neonatalmente con STZ que desarrollaron alodinia táctil a las que se les administró intratecalmente L-655,708 a tres concentraciones: 1.5, 7.5 y 15  $\eta$ mol. En la figura 11A se presentan los cursos temporales de los valores del umbral de retiro obtenidos en animales sanos (naive, línea punteada) y tratados con STZ después de aplicar L-655,708 a las tres dosis. Como se observa en B, donde se graficó el área bajo la curva de A, el afecto antialodínico se incrementó con la dosis. A la concentración de de 15  $\eta$ mol se alcanzó el valor máximo, que es estadísticamente diferente del obtenido a las demás concentraciones, así como el del vehículo (Fig. 11B). En otro grupo de animales adultos tratados con STZ que presentaron alodinia táctil también se probaron las tres concentraciones de L-655,708. En la figura 12A se muestra el curso temporal del umbral de retiro obtenido en los animales sanos (línea punteada) y en los tratados con L-655,708, similar a lo observado en los animales neonatos el efecto antialodínico se incrementó con la dosis, como se muestra en B al graficar el área bajo la

curva de la gráfica A, a 15  $\eta$ mol el área es estadísticamente mayor que el obtenido con el vehículo y con las otras dos dosis. En resumen, independientemente de la edad a la que se aplicó STZ la acción antialodínica de L-655,708 es dependiente de la dosis y fue máxima con 15  $\eta$ mol.

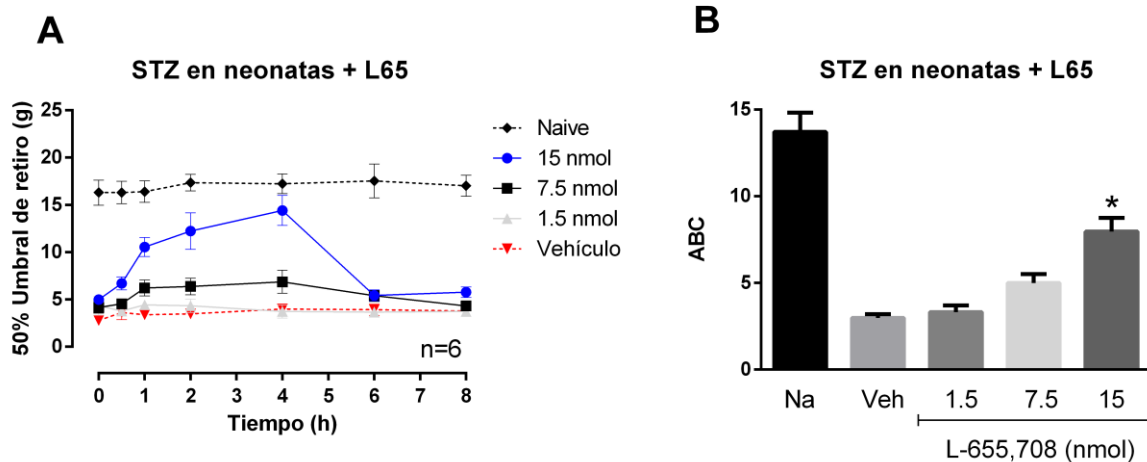


Figura 11. A) Curva dosis respuesta del umbral de retiro de ratas adultas tratadas neonatalmente con STZ en función de la concentración de L-655,708. B) Grafica de barras del área bajo las curvas de (A). Los datos presentados son el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 6 animales. \*  $p < 0.0001$

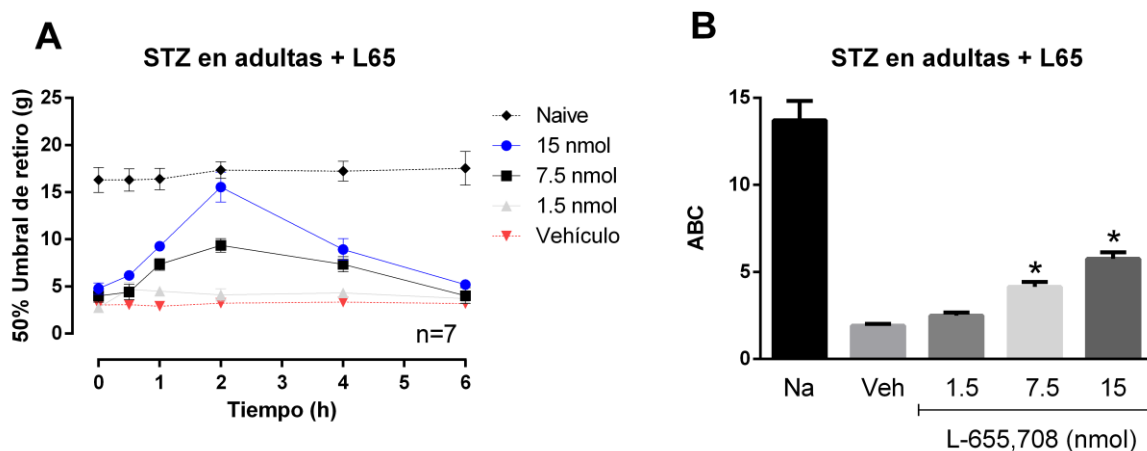


Figura 12. La acción antialodínica de L-655,708 es dependiente de la dosis. A) Curva dosis respuesta del curso temporal del umbral de retiro de ratas adultas tratadas con STZ en función de la concentración de L-655,708. B) Gráfica de barras del área bajo la curva de

(A). Los datos presentados son el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 6 animales. \*  $p < 0.0001$ .

### **Efecto de L-655,708 en la depresión dependiente de la frecuencia del reflejo de Hoffman en ratas sanas y tratadas con estreptozotocina**

En la figura 13A se muestran 10 trazos representativos del RH y la respuesta M registrados en ratas naive a las frecuencias de 0.1 y 5 Hz antes y después de la aplicación intratecal de L-655,708. A la frecuencia de 0.1 Hz los RH no se deprimieron, no obstante cuando se incrementó la frecuencia a 5 Hz después del primer RH (trazo rojo) los demás presentaron depresión, lo que se observa mejor en la gráfica del área bajo la curva de los 10 RH normalizados con respecto al primero de cada condición (B). Lo interesante fue que después de aplicar intratecalmente L-655,708 se perdió la depresión del RH, trazos inferiores en A, presentando valores del área bajo la curva mayores de 1 (triángulos rojos en B). En todos los trazos las respuestas M se muestran parcialmente.

En las ratas adultas alodínicas que fueron tratadas neonatalmente con STZ y en las adultas tratadas con STZ se observó una respuesta contraria a la obtenida con ratas sanas sin tratamiento. Como se muestra en los trazos representativos de la figura 13C panel izquierdo, a 5 Hz los RH no presentaron depresión, no obstante, después de la aplicación intratecal de L-655,708 se restauró la depresión del RH, como se muestra en los trazos representativos del panel derecho de C, así como en las gráficas del área bajo la curva del RH registrados en ambos grupos de animales tratados con STZ (triángulos rojos). Los trazos en rojo indican el primer RH registrado en ambos modelos. Estos resultados sugieren que los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> podrían tener un papel relevante en la modulación de los reflejos espinales, inhibiéndolos en los animales sanos y facilitándolos en los animales con neuropatía diabética.

## DISCUSIÓN

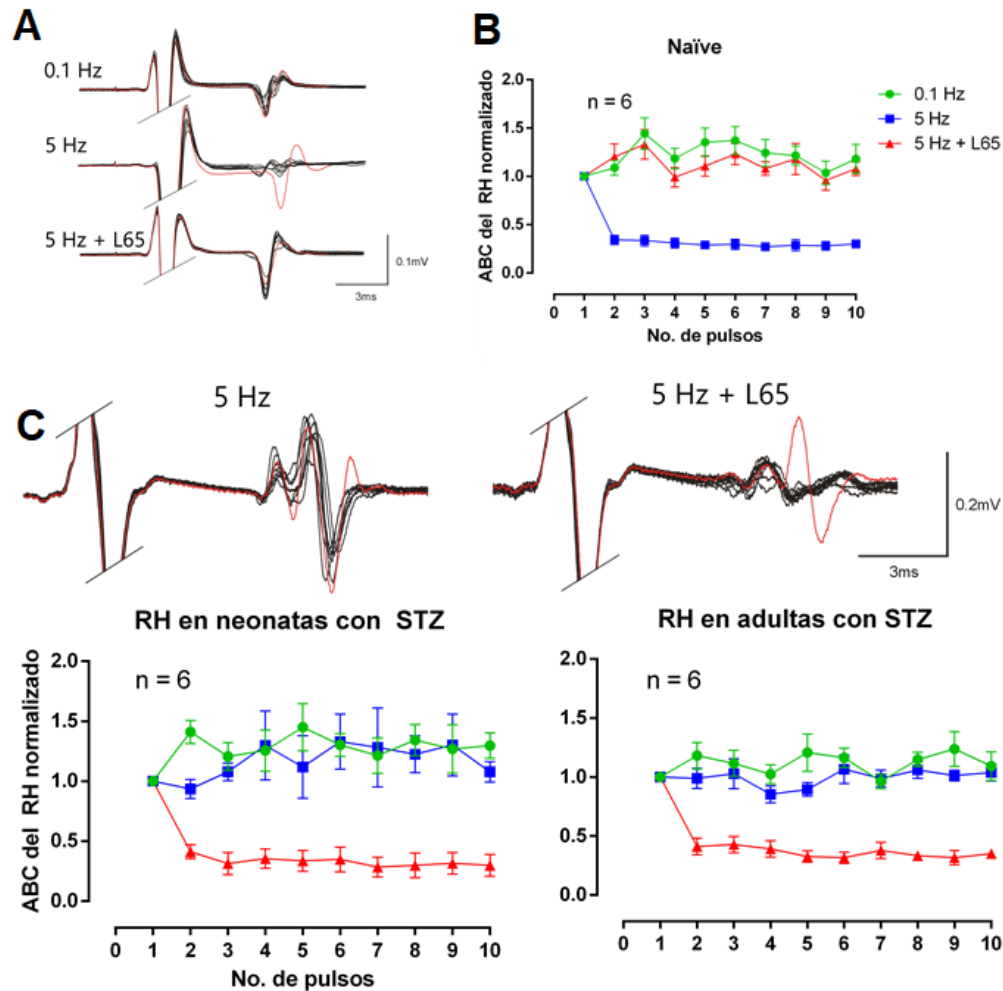


Figura 13. Efecto de L-655,708 en animales sanos, neonatos y adultos tratados con STZ. (A) Trazos representativos de 10 reflejos de Hoffman registrados a las frecuencias de 0.1 Hz y a 5 Hz en ratas *naïve* antes y después de administrar L-655,708. (B) Área bajo la curva de los RH normalizados con respecto al primero (trazo rojo) registrados en cada condición. (C) Trazos representativos de 10 RH producidos por un tren de estimulación a 5 Hz en ratas tratadas con STZ antes (panel de la izquierda) y después (panel de la derecha) de la administración de L-655,708. Paneles inferiores, gráficas de los valores del área bajo la curva de los RH producidos por un tren de estimulación a las frecuencias de 0.1 y 5 HZ antes y después de L-655,708, en animales tratados con STZ en la edad neonatal y adulta. Los datos presentados son el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 6 animales.  $p < 0.0001$

En esta investigación se desarrollaron dos modelos de diabetes mediante la aplicación de estreptozotocina en animales neonatos y adultos. En ambos casos se produjo hiperglucemia y alodinia. Además, se estudió el papel que desempeñan los receptores  $\alpha_5\text{GABA}_A$  en animales sanos y en los diabéticos que presentaron alodinia. En el primer grupo estos receptores tienen una función antinociceptiva, mientras que en los neuropáticos actúan facilitando la nocicepción.

### **Modelos de diabetes inducidos por STZ**

Los efectos de la administración intraperitoneal de estreptozotocina fueron diferentes en los dos grupos de animales de prueba, en las ratas neonatas la hiperglucemia se estableció más tardíamente que en las adultas. Esto se podría deber a que en las ratas neonatas la administración de STZ se realizó en la fase de desarrollo del páncreas, quedando una población residual funcional de células beta pancreáticas después de la degradación de STZ, mientras que en los animales adultos STZ produce la muerte por alquilación de todas las células de los islotes del páncreas (King, 2012). En los animales neonatos el establecimiento de la hiperglicemia es más lento, alcanzando valores menores a los que se producen en los animales adultos (King, 2012). En ambos casos la hiperglicemia no se revirtió durante el tiempo que duró la investigación. Entre los efectos relevantes producidos en ambos grupos de animales por la administración de estreptozotocina, se encuentran la disminución de la ganancia de peso atribuido a las alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, así como al desarrollo gradual de la alodinia táctil, una de las características principales del dolor neuropático (Jolivalt et al., 2008). Es importante destacar, que como ocurre en los humanos en estos modelos de diabetes no se presentó alodinia en todos los animales que desarrollaron hiperglucemia. Estos resultados concuerdan con lo descrito por el grupo de Calcutt, quienes desarrollaron el modelo de diabetes por la aplicación STZ en ratas adultas, encontrando un patrón de desarrollo de la hiperglucemia y alodinia semejante al reportado en este trabajo (Calcutt et al., 1996).

### **Papel de los receptores $\alpha_5\text{GABA}_A$ en animales sanos**

Un resultado muy relevante obtenido en animales sanos, fue la inducción de alodinia y la pérdida de la depresión dependiente de la frecuencia del RH, observada

después de bloquear los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> con su agonista inverso L-655,708. Este resultado, confirma la propuesta del grupo de De Koninck, de que estos receptores podrían tener un papel antinociceptivo en animales sanos, conclusión a la que llegaron al observar que en ratones a los que se les suprimió la subunidad  $\alpha_5$  del receptor GABA<sub>A</sub>, después de la aplicación de formalina presentaron una hipersensibilidad al dolor de mayor duración que la observada en animales naive (Perez-Sanchez et al., 2017). En trabajos previos se ha propuesto que estos receptores median una inhibición tónica que es más intensa que la sináptica, lo que se demostró al calcular la cantidad de carga (Cl<sup>-</sup>) que permean ambos tipos de receptores, siendo 6 a 10 veces mayor en los extrasinápticos que en los sinápticos (Farrant y Nusser, 2005). Un hallazgo muy relevante publicado por Perez-Sanchez y col., demostró que los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> son principalmente del tipo extrasináptico, debido a que la corriente tónica GABAérgica registrada en las neuronas de las láminas I y II de ratones naive, desapareció en los ratones que no expresaron el receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>, además no se modificó la corriente sináptica GABAérgica (Perez-Sanchez et al., 2017). Estos resultados demuestran que la inhibición mediada por los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> es de gran importancia en el circuito neuronal que procesa la información nociceptiva en el asta dorsal de la médula espinal. Se expresan en las células de las láminas I-III, en las neuronas de proyección y en otros tipos neuronales que no han sido identificados (Bravo-Hernández., et al., 2016; Perez-Sanchez et al., 2017), además también se localizan en las neuronas sensoriales (Bravo-Hernández et al., 2016), donde se expresan extrasinápticamente (Loeza-Alcocer et al., 2013; Bravo-Hernández et al., 2016). Su participación en la modulación de la actividad motriz quedó de manifiesto cuando al bloquearlos con L-655, 708 se perdió la depresión dependiente de la frecuencia del RH. Esta depresión del RH es un fenómeno sobre el que no se ha podido esclarecer los mecanismos que la producen, las evidencias indican que la inhibición GABAérgica tiene un papel relevante, esto está sustentado por la recuperación de la depresión dependiente de la frecuencias del RH después de haber bloqueado con bicuculina los receptores GABA<sub>A</sub> en las ratas con neuropatía diabética (Jollivalt et al., 2008). Así como el hallazgo reportado en este trabajo, donde se demostró que en ratas sanas el bloqueo de los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> produjo alodinia y pérdida de la mencionada de la depresión dependiente de la frecuencia del reflejo de Hoffman.

No obstante estos hallazgos, no queda claro cómo la inhibición mediada por los receptores GABA<sub>A</sub> produce estos cambios. Se ha descartado que la inhibición presináptica GABAérgica sea la causa de la depresión, debido a que su duración es menor a la de la depresión de largo plazo del RH (Hultborn et al., 1996). La pregunta que queda por explicar es cómo los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> participan en la regulación del reflejo H, de tal modo que su bloqueo en ratas sanas produzca la pérdida de la depresión en función de la frecuencia. Una posibilidad es que su expresión en las motoneuronas (Canto-Bustos et al., 2017) sea de relevancia en la regulación de su excitabilidad, de tal modo que cuando se bloquean está se incrementa lo suficiente como para impedir que se produzca el silenciamiento de las motoneuronas, con la consiguiente pérdida de la depresión del RH. Otra posibilidad podría ser que la activación tónica de los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> en las neuronas sensoriales producen un corto circuito tónico (Loeza-Alcocer et al., 2013), que reduce su excitabilidad induciendo una inhibición tónica de la liberación de transmisor excitador, de tal modo que cuando estos receptores son bloqueados con L-655,708 se libera la inhibición presináptica tónica, incrementándose la liberación de transmisor, dando lugar a un incremento en la respuesta posináptica que podría producir la facilitación del reflejo H.

### **Acción analgésica de L-655,708 es dependiente de la concentración**

L-655,708 es un agonista inverso de alta afinidad por el receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>, con una  $EC_{50}$  de 3  $\eta$ M obtenida en un sistema heterólogo (Atack et al., 2006), sin embargo en sistemas nativos como en rebanadas de hipocampo se ha reportado que bloquea la corriente tónica en neuronas piramidales CA1 del hipocampo a concentraciones de hasta 50  $\mu$ M, sin afectar otros receptores GABA<sub>A</sub> que se expresan en estas neuronas (Caraiscos et al., 2004). En otros modelos de dolor crónico inflamatorio y neuropático inducido por ligadura de los nervios espinales, su aplicación intratecal entre los segmentos L4 y L5, produjo analgesia a la dosis de 15  $\eta$ mol disuelto en 10  $\mu$ l de solución salina (Bravo-Hernández et al., 2016). En ratones naive aplicado intratecalmente a una dosis de 0.5 pmol facilitó el LTP del potencial de campo producido por activación de las fibras C (Xue et al., 2017). En el trabajo de Perez-Sanchez et al. (2017), mencionan en la discusión que la concentración de L-655,708 empleada por Bravo-Hernández et al. (15  $\eta$ mol), que produjo analgesia, es alta y estaría bloqueando, además del receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> otros receptores GABA<sub>A</sub>. Por esta razón, en

este trabajo se decidió hacer la curva dosis respuesta de la acción de L-655,708 en el umbral de retiro. Se encontró que la dosis más efectiva para producir analgesia en la neuropatía diabética fue de 15  $\eta$ mol, semejante a la reportada por Bravo-Herández et al. (2016). Para descartar la acción inespecífica de L-655,708 se requiere realizar un experimento en animales con neuropatía diabética, en donde el silenciamiento del receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> con un RNA de interferencia produzca reduzca el dolor o probar si alguna función que esté mediada por otro receptor GABA<sub>A</sub> no sea bloqueada por L-655,708. Por ejemplo, podría realizarse la prueba de Wall (1958). Esta consiste en la estimulación eléctrica intraespinal de las terminales de las neuronas sensoriales del nervio tibial, a una intensidad que active potenciales de acción que se propagarían antidrómicamente a lo largo del nervio, hasta la región poplíteo donde se registrarían. Como estímulo condicionante se estimularían eléctricamente los nervios sural y peroneo para activar la depolarización de las terminales centrales del nervio tibial, que se sabe está mediada por la activación sináptica de los receptores  $\alpha_2$ GABA<sub>A</sub> (Witschi et al., 2011). De este modo, el estímulo de prueba condicionado reclutaría más axones, por lo tanto, si se aplica directamente 15  $\eta$ mol disuelto en 10  $\mu$ l de solución salina, se esperaría que del mismo modo como ocurrió en la tortuga (Loeza-Alcocer et al., 2013), se recluten más axones tanto por el estímulo de prueba, como por el condicionado, debido al incremento de la excitabilidad de los axones producida por la eliminación del corto circuito que generan los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> tónicamente activados por el GABA del medio extracelular. De ser así, se podría concluir que la concentración de L-655,708 no bloquea otros receptores GABA<sub>A</sub>.

### **Papel antinociceptivo y pronociceptivo de los receptores $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>**

En los dos modelos de diabetes que presentaron alodinia mecánica se encontró que L-655,708 produjo analgesia y recuperación de la depresión dependiente de la frecuencia del reflejo de Hoffman, esto concuerda con lo reportado por Jolival et al. (2008), solo que este grupo encontró la misma acción por la aplicación de bicuculina, que se sabe bloquea todos los receptores GABA<sub>A</sub>. Lo relevante de mi trabajo fue que el mismo efecto se logró bloqueando solo los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>. Esto es de gran relevancia, ya que como se mencionó arriba estos receptores se expresan en las neuronas de las láminas I y II (Bravo-Hernández et al., 2016; Perez-Sanchez et al., 2017), donde median una corriente tónica en



las neuronas de proyección y en otras neuronas que no se han identificado y que pertenecen al circuito que procesa la información nociceptiva (Todd, 2010; Perez-Sanchez et al., 2017). La acción pronociceptiva de estos receptores en animales con neuropatía se podría deber a la activación del receptor TrKB por el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF), que produce una disminución de la expresión del cotransportador de  $K^+/Cl^-$  (KCC2), lo que tiene como consecuencia un incremento del  $Cl^-$  intracelular, despolarizando el  $E_{Cl^-}$ , de tal modo que la acción inhibitoria producida por activación de los receptores  $GABA_A$  disminuye pudiendo volverse excitadora. Esto se demostró registrando con la técnica de patch clamp neuronas de proyección en rebanadas de médula espinal de animales con neuropatía, donde se encontró que la aplicación de GABA despolarizó las neuronas, llegando a activar potenciales de acción (Coull et al., 2003). En otro trabajo, se demostró que la disminución en la expresión del cotransportador KCC2 se debió a la activación de la microglía, en la que se indujo la síntesis y liberación de BDNF que activó los receptores TrKB en las neuronas de proyección (Coull et al., 2005). Ésta disminución en la expresión del cotransportador KCC2 también se presentó en el asta dorsal de ratas con neuropatía diabética, donde se indujo analgesia por bloqueo con bicuculina de los receptores  $GABA_A$ . Por lo tanto, si los receptores  $\alpha_5GABA_A$  están tónicamente activos en las neuronas de proyección, en animales sanos estarían mediando una inhibición tónica que es de 6 a 10 veces más intensa que la producida por activación de los receptores sinápticos (Farrant y Nusser, 2005), reduciendo su excitabilidad, de tal modo que no se activen potenciales de acción ante cualquier entrada sináptica excitadora. Esto podría explicar su papel antinociceptivo en animales sanos. No obstante, en los animales con neuropatía diabética podrían estar produciendo una excitación tónica que incrementaría la excitabilidad de estas neuronas, facilitando la acción de las sinapsis excitadoras provenientes de neuronas sensoriales de alto y bajo umbral de activación, que antes no producían potenciales de acción (Keller et al., 2007). De lo anterior, se puede concluir que los receptores  $\alpha_5GABA_A$  desempeñan un papel antinociceptivo en los animales sanos y pronociceptivo en los que presentan dolor crónico inflamatorio y neuropático.

## REFERENCIAS

- Atack JR1, Pike A, Clarke A, Cook SM, Sohal B, McKernan RM, Dawson GR. (2006). Rat pharmacokinetics and pharmacodynamics of a sustained release formulation of the GABAA  $\alpha_5$ -selective compound L-655,708. *Drug Metab Dispos.* 34(5):887-93.
- Atack JR, Bayley PJ, Seabrook GR, Wafford KA, McKernan RM, Dawson GR. (2006). L-655,708 enhances cognition in rats but is not proconvulsant at a dose selective for  $\alpha_5$  containing GABAA receptors. *Neuropharmacology.* 51(6):1023-1029.
- Baron, R., 2000. Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms. *Clin. J. Pain* 16, S12-S20.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, 139(2), 267-284.
- Beggs, S., Trang, T., Salter, M. W. (2012) P2X4R+ microglia drive neuropathic pain. *Nat. Neurosci.* 15:1068-1073.
- Bonin, R. P., De Koninck, Y. (2013). Restoring ionotropic inhibition as an analgesic strategy. *Neuroscience Letters.* 557:34-51.
- Bravo-Hernández, M., Corleto, J. A., Barragán-Iglesias, P., González-Ramírez, R., Pineda-Farias, J. B., Felix, R., Granados-Soto, V. (2016). The  $\alpha_5$  subunit containing GABA<sub>A</sub> receptors contribute to chronic pain. *Pain*, 157(3).
- Bravo-Hernandez, M., Feria-Morales, L. A., Torres-Lopez, J. E., Cervantes-Duran, C., Delgado-Lezama, R., Granados-Soto, V., & Rocha-González, H. I. (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), 91-97.
- Calcutt, N. A., & Backonja, M. M. (2007). Pathogenesis of pain in peripheral diabetic neuropathy. *Current Diabetes Reports*, 7(6), 429-434.
- Calcutt NA, Jorge MC, Yaksh TL, Chaplan SR. Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. *Pain.* 1996 Dec;68(2-3):293-9
- Caraiscos VB1, Elliott EM, You-Ten KE, Cheng VY, Belelli D, Newell JG, Jackson MF, Lambert JJ, Rosahl TW, Wafford KA, MacDonald JF, Orser BA. (2004) Tonic

inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(10):3662-7.

- Lee-Kubli CA1, Mixcoatl-Zecuatl T, Jolivalt CG, Calcutt NA. (2014). Animal models of diabetes-induced neuropathic pain. *Curr Top Behav Neurosci*.20:147-70.
- . Chawla, A., Chawla, R., & Jaggi, S. (2016). Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 20(4), 546.
- Coull, J. A., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S. A., Nault, F., Sik, A., De Koninck, Y. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*, 424(6951), 938-942.
- Coull, J. A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M. W., De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 438:1017-1021.
- Farrant, M., & Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(March), 215-229.
- Gozariu, M., Roth, V., Keime, F., Le Bars, D., & Willer, J. C. (1998). An electrophysiological investigation into the monosynaptic H-reflex in the rat. *Brain Research*, 782(1-2), 343-347.
- Hernández, M., Rivera, J., Shamah, T., Cuevas, L., Gómez, L., Gaona, E., García, D. (2013). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016, 2016(Ensanut), 1-154.
- Hultborn H1, Illert M, Nielsen J, Paul A, Ballegaard M, Wiese H. (1996). On the mechanism of the post-activation depression of the H-reflex in human subjects. *Exp Brain Res*. Mar;108(3):450-62.
- Ibarra C., Rocha J., et al. (2012). Prevalence of peripheral neuropathy among primary care type 2 diabetic patients. *Revista Médica de Chile*, 140(9), 1126-31.
- Jolivalt, C. G., Lee, C. A., Ramos, K. M., & Calcutt, N. A. (2008). Allodynia and hyperalgesia in diabetic rats are mediated by GABA and depletion of spinal potassium-chloride co-transporters. *Pain*, 140(1), 48-57.

- Keller, A. F., Beggs, S., Salter, M. W., De Koninck, Y. (2007). Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Mol Pain*. 3:27.
- King JF. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*. 166, 877-894.
- Olsen, R. W., Sieghart, W. (2009). GABAA receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*. 56:141-148.
- Jimena Perez-Sanchez,<sup>1</sup> Louis-Etienne Lorenzo,<sup>1</sup> Irene Lecker,<sup>7</sup> Agnieszka A. Zurek,<sup>2</sup> Charalampos Labrakakis,<sup>3</sup> Erica M. Bridgwater,<sup>2</sup> Beverley A. Orser,<sup>2,4,5</sup> Yves De Koninck,<sup>1,6</sup> and Robert P. Bonin<sup>1</sup>. (2017).  $\alpha 5$ GABAA Receptors Mediate Tonic Inhibition in the Spinal Cord Dorsal Horn and Contribute to the Resolution Of Hyperalgesia. *J Neurosci Res*. Jun;95(6):1307-1318.
- Rivera, C., Thomas-Crusells, H. Li. J., Lahtinen, H., Votanen, T., Nanobashvili, A., Kokaia, Z., Airaksinen, M. S., Voipio, J., Kaila, K. (2002). BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K<sup>+</sup> -Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl<sup>-</sup> extrusion. *J. Cell. Biol.* 159:747-752.
- Sivilotti, L, Woolf, C. J. (1994). The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol*. 72(1):169-79
- Tesfaye, S., Boulton, A.J., Dyck, P.J., Freeman, R., Horowitz, M., Kempler, P., Lauria, G., Malik, R.A., Spallone, V., Vinik, A., Bernardi, L., Valensi, P., 2010. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care* 33, 2285-2293.
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M. W., Inoue, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*, 424:778-783.
- Todd, A. J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(12), 823-36.
- Agnieszka I. Włodarczyk, Chun Xu, Inseon Song, Maxim Doronin<sup>2,3</sup>, Yu-Wei Wu<sup>2</sup>, Matthew C. Walker and Alexey Semyanov<sup>2,3\*</sup>
- Tonic GABAA conductance decreases membrane time constant and increases EPSP

- spikeprecisioninhippocampalpyramidalneurons Front. Neural Circuits, 2013 |
- Xue M1, Liu JP1, Yang YH1, Suo ZW1, Yang X1, Hu XD1. (2017) Inhibition of  $\alpha 5$  subunit-containing GABAA receptors facilitated spinal nociceptive transmission and plasticity. Eur J Pain. Jul;21(6):1061-1071.
- Wall PD, Devor M. Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats. Pain. 1983 Dec;17(4):321-39.
- Witschi R1, Punnakkal P, Paul J, Walczak JS, Cervero F, Fritschy JM, Kuner R, Keist R, Rudolph U, Zeilhofer HU. (2011). Presynaptic alpha2-GABAA receptors in primary afferent depolarization and spinal pain control. J Neurosci.31(22):8134-42.