



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

**SEDE SUR**

**Departamento de Farmacobiología**

**PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR GABA<sub>A</sub>- $\alpha$ <sub>6</sub> EN EL DOLOR  
NEUROPÁTICO INDUCIDO POR EL DAÑO A LOS NERVIOS ESPINALES**

Tesis que presenta

**M. en C. Erick Josué Rodríguez Palma**

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias en**

**Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Director de la Tesis: **Dr. Vinicio Granados Soto**

**Ciudad de México**

**Agosto, 2022**



La parte experimental de este trabajo se realizó en el laboratorio 12 de neurobiología del dolor del departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.N.P (Sede sur). Este trabajo estuvo bajo la dirección del Dr. Vinicio Granados Soto.

Los análisis de inmunohistoquímica se realizaron en la Facultad de Ciencias del Comportamiento y del Cerebro de la Universidad de Texas en Dallas (UTD) bajo la supervisión del Dr. Theodore J. Price durante la estancia realizada con el apoyo del proyecto CONACyT A1-S-40015.

Durante la realización de este trabajo se contó con la beca de doctorado No. 615618.

The greatest leader is not necessarily the one who does the greatest things.  
He is the one gets the people to do the greatest things.

-Ronald Reagan

**A mis padres**

**Ana Laura Palma Barrientos y Emilio Rodríguez León**

Por siempre apoyarme en todas las decisiones que he ido tomando durante  
estos años, por siempre estar motivándome a seguir adelante y no rendirme.  
Los amo infinitamente.

**A mi hermana**

**Nancy Rodríguez Palma**

Por estar siempre a mi lado, por las risas que compartimos cuando estamos  
en casa. Además por enseñarme a tomar las cosas de una manera más  
ligera. Te amo mucho.

**A mi familia**

Por estar siempre pendientes de mi y motivarme a seguir adelante y no  
rendirme nunca. En especial a mi abuelita **Celia León** por motivarme a  
superarme día con día.

Put your heart, mind, and soul into even your smallest acts. This is the  
secret of success.

-Swami Sivananda

### **AL CINVESTAV Y CONACYT**

Por el apoyo y las facilidades para poder desarrollar este proyecto.

### **AL DR. VINICIO GRANADOS SOTO**

Por todos los consejos y enseñanzas tanto académicas como personales; las cuales me han permitido crecer durante estos años de mi vida. Por su confianza y todo el apoyo que he recibido de su parte, muchas gracias.

### **A LA DRA. JANET MURBARTIÁN AGUILAR**

Por todas las sugerencias al presente proyecto y las facilidades prestadas por ella y los integrantes de su laboratorio para la realización de los experimentos con el plásmido.

### **A MI COMITÉ SINODAL**

A la **Dra. Myrna Déciga Campos, Dr. Rodolfo Delgado Lezama y el Dr. Alonso Fernández Guasti**. Por su tiempo y sugerencias para mejorar el presente proyecto. Además por siempre exigirme a dar lo mejor de mí.

### **A SAÚL HUERTA DE LA CRUZ**

Por estar al lado mío durante esta gran aventura. Por ayudarme en la realización del presente proyecto. Por todos los consejos y el apoyo incondicional durante estos años. Que sigamos apoyándonos y creciendo en este gran camino de la ciencia.

### **A MIS AMIGOS**

A **Grecia Medina Terol, Yarim de la Luz Cuellar, Daniel Fonseca Barriandos, Eduardo Ávila Díaz, Christopher Martínez Aguirre, Cindy Santiago Castañeda, Mara Islas Espinoza, Félix López Preza, Belén Salinas Abarca e Itzel Ramos Rodríguez**. Por hacer que la distancia de casa sea más ligera. Por todos los buenos momentos, risas y lágrimas que hemos compartido juntos estos años, momentos que voy a atesorar con mucho cariño en mi corazón. Les deseo lo mejor de la vida a todos.

### **A LOS INTEGRANTES DEL LABORATORIO 12**

A la **M. en C. Guadalupe Vidal Cantú**, **M. en C. Yarim de la Luz Cuellar** y **M. en C. Mara Islas Espinoza** por el excelente ambiente de trabajo que tenemos dentro del laboratorio 12. Por todos sus consejos y palabras de aliento cuando los experimentos se complicaban. Además, por el apoyo incondicional en todo momento durante estos años, gracias.

### **A LOS INTEGRANTES DEL DUSSOR AND PRICE LAB**

Al **Dr. Ted Price** y la **Dra. Stephanie Shiers** por todas las sugerencias al presente proyecto y las facilidades prestadas por ellos y los integrantes del laboratorio para la realización de los experimentos de inmunohistoquímica.

### **AL PERSONAL DEL CINVESTAV SEDE SUR**

Por todas las facilidades brindadas para la realización de este proyecto.

En especial al Sr. Ramón Martínez y al personal del bioterio que son parte fundamental en la realización de este proyecto.

Al Ing. José Fernández Calderón por ayudarnos a salir adelante con cualquier inconveniente de última hora.

Al Lic. Víctor Mendoza Salas por su apoyo en la búsqueda de material bibliográfico.



---

---

**ÍNDICE GENERAL**

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	ix
<b>RESUMEN</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. Dolor.....	1
1.1.1. Clasificación del dolor .....	2
1.1.2. Nocicepción .....	5
1.1.3. Nociceptores .....	6
1.2. Dolor neuropático.....	8
1.3. Tratamiento del dolor neuropático.....	10
1.4. Fisiopatología del dolor neuropático .....	11
1.4.1. Sensibilización periférica.....	12
1.4.2. Actividad ectópica .....	14
1.4.3. Sensibilización central.....	17
1.4.3.1 Sensibilización central mediada por glutamato .....	19
1.4.3.2. Sensibilización central mediada por la interacción neuro-inmune....	20
1.4.3.3. Sensibilización central mediada por GABA.....	21
<b>2. Antecedentes</b> .....	23
2.1. Neurotransmisión GABAérgica .....	23
2.2. Receptores GABA <sub>A</sub> .....	24
2.3. Control inhibitorio GABAérgico.....	26

---

---

2.3.1. Inhibición periférica.....	28
2.3.2. Inhibición espinal.....	31
2.4. El receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ .....	32
2.5. Función del receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ en el sistema nervioso.....	34
2.6. Participación del receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ en la nocicepción.....	35
2.7. La influencia del sexo en la percepción del dolor .....	37
<b>3. Justificación.....</b>	<b>33</b>
<b>4. Hipótesis .....</b>	<b>34</b>
<b>5. Objetivo general .....</b>	<b>34</b>
<b>6. Objetivos particulares .....</b>	<b>34</b>
<b>7. Materiales y métodos .....</b>	<b>35</b>
7.1. Animales.....	35
7.2. Neuropatía periférica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6 .....	35
7.3. Evaluación de las conductas nociceptivas .....	36
7.3.1. Evaluación del umbral de retiro de la pata .....	36
7.3.2. Evaluación del umbral de presión muscular .....	37
7.4. Evaluación de las conductas nociceptivas espontáneas.....	37
7.4.1. Sacudidas espontáneas y levantamientos verticales .....	37
7.5. Determinación de la expresión del receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ por <i>Western blot</i> .....	38
7.6. Inmunohistoquímica.....	39
7.7. Análisis de imágenes confocal .....	41
7.8. Administración intratecal <i>in vivo</i> .....	42



---

---

7.9. Silenciamiento del receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ .....	42
7.10. Transfección del plásmido <i>Gabra6 in vivo</i> .....	43
7.11. Fármacos .....	44
7.12. Análisis estadístico.....	44
<b>8. Diseño experimental</b> .....	<b>45</b>
8.1. Participación del receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ en condiciones fisiológicas .....	45
8.2. Localización celular del receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ en la médula espinal y los ganglios de la raíz dorsal .....	47
8.3. Participación del receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ en condiciones patológicas .....	48
8.4. Influencia del sexo y especie de los animales en el efecto antinociceptivo de los MAPs del receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ .....	51
8.5. Restitución proteica del receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ en animales con dolor neuropático experimental.....	53
<b>9. Resultados</b> .....	<b>54</b>
9.1. El receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ desempeña un papel antinociceptivo en condiciones fisiológicas .....	54
9.2. Localización celular del receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ en animales intactos .....	58
9.3. La participación del receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ en el dolor neuropático experimental .....	62
9.4. La activación del receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ reduce las conductas nociceptivas inducidas por el daño a los nervios espinales.....	64
9.5. La administración repetida de PZ-II-029 reduce la alodinia táctil a través de restaurar la expresión proteica del receptor.....	69
9.6. La activación del receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ reduce las conductas nociceptivas en ratones con dolor neuropático.....	70

---



---

9.7. La activación del receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ no reduce las conductas nociceptivas en roedores macho con dolor neuropático .....	70
9.8. La restitución proteica del receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ reduce las conductas nociceptivas inducidas por el daño a los nervios espinales .....	74
9.9. El receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ se expresa en la médula espinal de humanos ....	76
<b>10. Discusión</b> .....	<b>79</b>
10.1. El receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ ejerce un papel anti-nociceptivo en condiciones fisiológicas.....	79
10.2. La activación del receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ reduce las conductas nociceptivas en animales neuropáticos .....	81
10.3. El receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ reduce de manera diferencial la alodinia táctil en ratas neuropáticas.....	84
10.4. La restitución del receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ reduce las conductas nociceptivas en animales con dolor neuropático.....	85
10.5. El receptor GABA <sub>A</sub> - $\alpha_6$ se expresa en neuronas sensoriales de humano .....	86
<b>11. Conclusión</b> .....	<b>88</b>
<b>12. Perspectivas</b> .....	<b>89</b>
<b>13. Referencias</b> .....	<b>91</b>
<b>14. Anexos</b> .....	<b>131</b>

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Clasificación del dolor .....	4
<b>Figura 2.</b> La vía del dolor .....	6
<b>Figura 3.</b> Tipos de fibras sensoriales .....	8
<b>Figura 4.</b> Sensibilización periférica.....	15
<b>Figura 5.</b> Sensibilización central.....	18
<b>Figura 6.</b> Estructura y localización de los receptores GABA <sub>A</sub> .....	26
<b>Figura 7.</b> Pérdida del control GABAérgico .....	29
<b>Figura 8.</b> Diseño experimental de la participación del receptor GABA <sub>A</sub> -α <sub>6</sub> en condiciones fisiológicas .....	46
<b>Figura 9.</b> Diseño experimental del silenciamiento <i>in vivo</i> del receptor GABA <sub>A</sub> -α <sub>6</sub> en ratas hembras intactas.....	46
<b>Figura 10.</b> Diseño experimental del análisis de la expresión proteica del receptor GABA <sub>A</sub> -α <sub>6</sub> mediante microscopia confocal .....	47
<b>Figura 11.</b> Diseño experimental del efecto de la lesión a los nervios espinales (LNE) sobre la expresión proteica del receptor GABA <sub>A</sub> -α <sub>6</sub> ....	49
<b>Figura 12.</b> Diseño experimental del efecto de los moduladores alostéricos positivos del receptor GABA <sub>A</sub> -α <sub>6</sub> en ratas hembras con dolor neuropático .....	49
<b>Figura 13.</b> Diseño experimental del efecto de furosemida sobre el efecto anti-alodínico de PZ-II-029 en ratas hembras con dolor neuropático .....	50
<b>Figura 14.</b> Diseño experimental del efecto de los moduladores alostéricos positivos del receptor GABA <sub>A</sub> -α <sub>6</sub> en ratones hembras con dolor neuropático .....	52

---



---

<b>Figura 15.</b> Diseño experimental de la administración repetida de PZ-II-029 en ratas con dolor neuropático.....	51
<b>Figura 16.</b> Diseño experimental de la purificación y efecto del plásmido Gabra6 en ratas con dolor neuropático.....	53
<b>Figura 17.</b> Diseño experimental de la participación diferencial del receptor GABA <sub>A</sub> -α <sub>6</sub> en animales macho y hembra.....	52
<b>Figura 18.</b> La administración de furosemida induce conductas nociceptivas en ratas hembra.....	55
<b>Figura 19.</b> La administración de furosemida induce un efecto pronociceptivo mayor en hembras comparado con machos.....	56
<b>Figura 20.</b> El silenciamiento del receptor GABA <sub>A</sub> -α <sub>6</sub> induce conductas nociceptivas en ratas hembra.....	57
<b>Figura 21.</b> Expresión del receptor GABA <sub>A</sub> -α <sub>6</sub> en la médula espinal de ratas hembras intactas.....	60
<b>Figura 22.</b> Expresión del receptor GABA <sub>A</sub> -α <sub>6</sub> en las neuronas sensoriales del GRD en ratas hembras intactas.....	61
<b>Figura 23.</b> El daño a los nervios espinales induce conductas nociceptivas en ratas.....	63
<b>Figura 24.</b> El daño a los nervios espinales reduce la expresión proteica del receptor GABA <sub>A</sub> -α <sub>6</sub> en ratas hembras.....	64
<b>Figura 25.</b> La administración de Ro 15-4513 reduce las conductas nociceptivas inducidas por el daño a los nervios en ratas hembra.....	65
<b>Figura 26.</b> La administración de PZ-II-029 reduce las conductas nociceptivas inducidas por el daño a los nervios en ratas hembra.....	67

**Figura 27.** El bloqueo del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> reduce el efecto antinociceptivo de PZ-II-029..... 68

**Figura 28.** Los MAPs del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> reducen las conductas nociceptivas inducidas por el daño a los nervios espinales en ratones hembra..... 72

**Figura 29.** La administración repetida de PZ-II-029 restaura la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> ..... 70

**Figura 30.** La administración del plásmido Gabra6 restaura la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> y reduce las conductas nociceptivas inducidas por el daño a los nervios espinales en ratas hembra..... 75

**Figura 31.** El receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> tienen un expresión proteica diferencial en hembras y machos ..... 62

**Figura 32.** La activación del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> induce un efecto anti-alodínico mayor en roedores hembra comparado con roedores macho..... 73

**Figura 33.** Expresión del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> en la médula espinal dorsal de humanos ..... 77

**Figura 34.** El receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> esta expresado en neuronas peptidérgicas y no-peptidérgicas en la médula espinal dorsal de humanos ..... 78

**Figura 35.** El receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> tiene un papel antinociceptivo en condiciones fisiológicas y patológicas ..... 88

**ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1.** Clasificación del dolor .....3

**Tabla 2.** Etiología del dolor neuropático..... 10

**Tabla 3.** Tratamiento del dolor neuropático..... 11

**Tabla 4.** Información demográfica de los donadores ..... 40

**Tabla 5.** Lista de anticuerpos utilizados para los ensayos de  
inmunohistoquímica ..... 41

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentración intracelular del cloruro
<b>5-HT</b>	Serotonina
<b>5-HT<sub>3</sub></b>	Receptor de serotonina 3
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AMPA</b>	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpiónico
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ASIC</b>	Canales sensibles a ácido
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>Cav 3.2</b>	Canal de calcio tipo T
<b>CFA</b>	Coadyuvante completo Freud
<b>c-Fos</b>	Proteína c-Fos
<b>CGRP</b>	Péptido relacionado al gen de la calcitonina
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Cloruro
<b>Conc</b>	Concentración
<b>CTCF</b>	Fluorescencia celular total corregida
<b>DAP</b>	Despolarización de la aferente primaria
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido

<b>DPP10</b>	Dipeptil peptidasa 10
<b>EAAT2</b>	Transportador de aminoácidos excitadores 2
<b>ENSANUT</b>	Encuesta nacional de salud y nutrición
<b>ERK</b>	Proteína cinasa activada por señales extracelulares
<b>Furo</b>	Furosemida
<b>GABA</b>	Ácido gamma-aminobutírico
<b>GABA-T</b>	GABA-transaminasa
<b>GAD</b>	Ácido glutámico descarboxilasa
<b>GAD65</b>	Ácido glutámico descarboxilasa de 65 kDa
<b>GAD67</b>	Ácido glutámico descarboxilasa de 67 kDa
<b>GAT-1</b>	Transportador de GABA 1
<b>GAT-3</b>	Transportador de GABA 3
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar glial
<b>GRD</b>	Ganglio de la raíz dorsal
<b>GT</b>	Ganglio del trigémino
<b>HV</b>	Alto voltaje
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IASP</b>	Asociación internacional para el estudio del dolor
<b>IB4</b>	Isolectina B4
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>IPSC</b>	Corriente post-sináptica inhibitoria



---

<b>JNK</b>	Cinasa C-jun N-terminal
<b>KCC2</b>	Cotransportador de potasio-cloruro
<b>KChIp1</b>	Proteína de interacción con el canal de potasio Kv4
<b>KChIp2</b>	Proteína de interacción con el canal de potasio Kv4 2
<b>KCNQ</b>	Canales de potasio de bajo umbral
<b>Kv4.2</b>	Canal de potasio dependiente de voltaje 4.2
<b>LNE</b>	Ligadura de los nervios espinales
<b>MAP</b>	Modulador alostérico positivo
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógenos
<b>MAPs</b>	Moduladores alostéricos positivos
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnesio
<b>mGluR</b>	Receptores metabotrópicos a glutamato
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>Nav</b>	Canales de sodio dependientes de voltaje
<b>NeuN</b>	Núcleos neuronales
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento neuronal
<b>NKCC1</b>	Cotransportador de sodio-potasio-cloruro
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NR2B</b>	Subunidad epsilon-2 del receptor a glutamato
<b>P2X<sub>3</sub></b>	Receptor purinérgico X3
<b>P2X<sub>4</sub></b>	Receptor purinérgico X4

---

<b>PB</b>	Solución de fosfatos
<b>p-ERK</b>	Proteína cinasa activada por señales extracelulares en estado de fosforilación
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandinas E <sub>2</sub>
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3-cinasa
<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>PKC<math>\gamma</math></b>	Proteína cinasa C isoforma gama
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno
<b>PZ</b>	PZ-II-029
<b>Ro15</b>	Ro 15-4513
<b>RRD</b>	Reflejos de la raíz dorsal
<b>siRNA</b>	ARN de interferencia pequeño
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SP</b>	Sustancia P
<b>SSA</b>	Semialdehído succínico
<b>TBS</b>	Solución amortiguadora de Tris
<b>TBS-T</b>	Solución TBS suplementada con Tween-20
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>TREK-1</b>	Canal de potasio de dos poros
<b>TrkA</b>	Receptor tirosina cinasa A

<b>TrkB</b>	Receptor tirosina cinasa B
<b>TRPV1</b>	Receptor vanilloide de potencial transitorio 1
<b>Veh</b>	Vehículo
<b>VGAT</b>	Transportador vesicular de GABA
<b>VGlut3</b>	Transportador vesicular de glutamato tipo 3
<b>μM</b>	Micromolar

**RESUMEN**

La pérdida de la inhibición GABAérgica es un mecanismo que subyace al dolor neuropático. Por tal motivo, el aumento del tono GABAérgico inhibitorio a través de la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> es una estrategia adecuada para tratar el dolor neuropático. Este estudio fue diseñado con el propósito de conocer la función del receptor GABA<sub>A</sub> que contienen la subunidad alfa 6 (GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ ) en condiciones fisiológicas y patológicas en ratas hembra y macho. Los resultados muestran que el bloqueo farmacológico o el silenciamiento transitorio de la subunidad  $\alpha_6$  del receptor GABA<sub>A</sub> inducen hipersensibilidad y dolor espontáneo en ratas hembra intactas. Además, el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  se expresa en neuronas aferentes primarias IB4<sup>+</sup> y CGRP<sup>+</sup> en la médula espinal y en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) de ratas hembra intactas, pero no en astrocitos. El daño a los nervios espinales redujo la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en las terminales centrales de las aferentes primarias y en los GRD, mientras que la administración de moduladores alostéricos positivos (MAPs) del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  disminuyó la alodinia táctil y el dolor espontáneo en roedores hembra con dolor neuropático, pero no en machos. Por otra parte, la sobreexpresión del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  redujo la alodinia táctil y restauró la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en ratas con dolor neuropático. De manera interesante, los MAPs del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  produjeron un efecto antinociceptivo mayor en roedores hembra, comparado con roedores macho. Finalmente, el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  se expresa en humanos. Este receptor se encontró en neuronas sensoriales P2X<sub>3</sub><sup>+</sup> y CGRP<sup>+</sup>, pero no en astrocitos en la médula espinal de humano. Nuestros resultados sugieren que el receptor GABA<sub>A</sub> que contiene la subunidad  $\alpha_6$  tiene una función antinociceptiva dependiente del sexo. Además, este receptor puede representar un blanco interesante para desarrollar un nuevo tratamiento para el dolor neuropático.

**ABSTRACT**

The loss of GABAergic inhibition is a mechanism that underlies neuropathic pain. Therefore, rescuing the GABAergic inhibitory tone through activation of GABA<sub>A</sub> receptors is a strategy to reduce neuropathic pain. This study was designed to elucidate the function of the  $\alpha_6$ -containing GABA<sub>A</sub> receptor in physiological conditions and neuropathic pain in female and male rats. Blockade or transient knockdown of  $\alpha_6$ -containing GABA<sub>A</sub> receptor induced evoked hypersensitivity and spontaneous pain in naïve female rats. The  $\alpha_6$  subunit was expressed in IB4<sup>+</sup> and CGRP<sup>+</sup> primary afferent neurons in the rat spinal dorsal horn and dorsal root ganglia (DRG), but not astrocytes. Nerve injury reduced  $\alpha_6$  subunit protein expression in the central terminals of the primary afferent neurons and DRG, whereas intrathecal administration of positive allosteric modulators (PAMs) of the  $\alpha_6$ -containing GABA<sub>A</sub> receptor reduced tactile allodynia and spontaneous nociceptive behaviors in female, but not male, neuropathic rats and mice. Overexpression of the spinal  $\alpha_6$  subunit reduced tactile allodynia and restores  $\alpha_6$  subunit expression in neuropathic rats. PAMs of the  $\alpha_6$ -containing GABA<sub>A</sub> receptor induced a greater antiallodynic effect in females compared to male rats and mice. Finally,  $\alpha_6$  subunit is expressed in humans. This receptor was found in CGRP<sup>+</sup> and P2X<sub>3</sub><sup>+</sup> primary afferent fibers, but not astrocytes in the human spinal dorsal horn. Our results suggest that the  $\alpha_6$ -containing GABA<sub>A</sub> receptor has a sex-specific antinociceptive role in neuropathic pain, suggesting that this receptor may represent an interesting target to develop a novel treatment for neuropathic pain.



## 1. Introducción

### 1.1. Dolor

El dolor es posiblemente la sensación más antigua de la cual se tenga un registro médico. Sin embargo, el entendimiento sobre los mecanismos celulares o moleculares que se desencadenan y/o participan en el proceso de dolor no han sido del todo entendidos, lo que impacta de manera importante en la falta de tratamientos farmacológicos adecuados para el alivio del dolor crónico (Moscoso, 2012; Rodríguez-Palma y Granados-Soto, 2022). De acuerdo con la Asociación internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés), el dolor es *una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con, o similar a la asociada con, un daño al tejido en términos reales o potenciales* (Raja et al., 2020). Lo anterior muestra que el dolor es un fenómeno subjetivo, complejo e influenciado por diversos factores tales como las emociones, el estado afectivo, las experiencias previas e incluso el medio ambiente donde se desarrollan los individuos (Berry et al., 2001).

El dolor crónico es un problema de salud que afecta al 27% de la población mundial. Los costos relacionados con el tratamiento del dolor y sus consecuencias son elevados. En este sentido, se estima que al año se invierten cerca de 635 mil millones de pesos en la atención médica de las personas que sufren dolor crónico (Cohen et al., 2021; Katz, 2002; Payne, 2000). Actualmente, en México, se desconoce la cifra exacta de las personas que padecen dolor crónico. Sin embargo, en 2010 se estimaba que alrededor de 28 millones de mexicanos tenían dolor crónico (Covarrubias-Gómez et al., 2010). Por tal motivo, el estudio, entendimiento y control del dolor crónico es un tema de interés nacional e internacional.

### **1.1.1. Clasificación del dolor**

El dolor se divide en dos categorías que cumplen con la función de proteger o contribuir a mantener el daño, dolor adaptativo y maladaptativo. Los mecanismos que participan de manera activa durante el dolor adaptativo tienen la finalidad de proteger el área lesionada o al organismo de un daño mayor. En contraste, el dolor maladaptativo no ofrece una función de protección al cuerpo debido a que este tipo de dolor se origina después de una lesión o enfermedad que afecta al sistema nervioso (Vardeh et al., 2016; Woolf, 2004). El dolor también puede clasificarse de acuerdo con el mecanismo neurofisiológico que le da origen en: nociceptivo, inflamatorio, neuropático y disfuncional (Figura 1). El dolor nociceptivo es una respuesta fisiológica normal del cuerpo ante la presencia de estímulos potencialmente dañinos. Este tipo de dolor se inicia por la activación de los nociceptores que tienen un umbral de activación suficientemente alto para no interferir con las actividades diarias, pero adecuadamente bajo para producir una respuesta de alarma para evitar el daño al tejido (Woolf, 2004, 2010). El dolor inflamatorio es una respuesta del cuerpo ante el daño tisular o una infección. El daño tisular induce un proceso inflamatorio que está acompañado por el reclutamiento y la proliferación de células del sistema inmune, además de la liberación de sustancias pronociceptivas como citocinas proinflamatorias, bradicinina, prostaglandinas, sustancia P, entre otras. Todas estas sustancias, liberadas en el sitio de la lesión, alteran la sensibilidad de los nociceptores contribuyendo a incrementar el proceso doloroso (Vasko, 2009; Woolf, 2004, 2010).

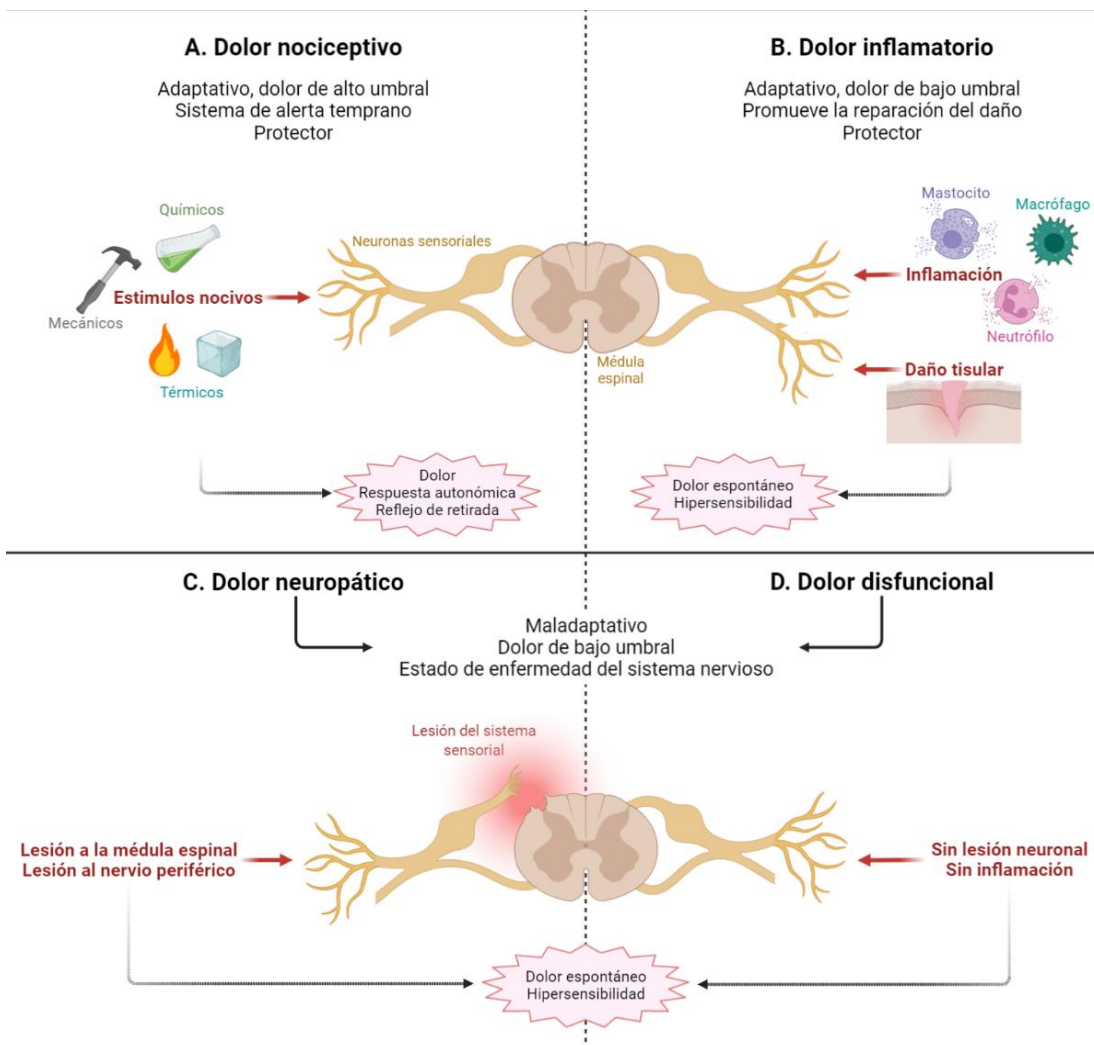
Por otra parte, el dolor neuropático resulta de una lesión directa a los nervios, de una afección metabólica, una enfermedad viral o por tratamientos farmacológicos que afecten el funcionamiento correcto del sistema somatosensorial y, con ello, la percepción de los estímulos nocivos (Scholz et al., 2019). Finalmente, el dolor disfuncional es una respuesta de



hipersensibilidad o dolor inexplicable ya sea generalizado o localizado. Este tipo de dolor se presenta en ausencia de un daño estructural o inflamación aparentes. Entre los padecimientos asociados con este tipo de dolor se encuentra el síndrome de colon irritable, la disfunción temporomandibular crónica, el síndrome de dolor pélvico y de fatiga crónica (Egloff et al., 2014; Mayer et al., 2009; Nagakura, 2015). En la Tabla 1 se resume la clasificación del dolor.

**Tabla 1. Clasificación del dolor**

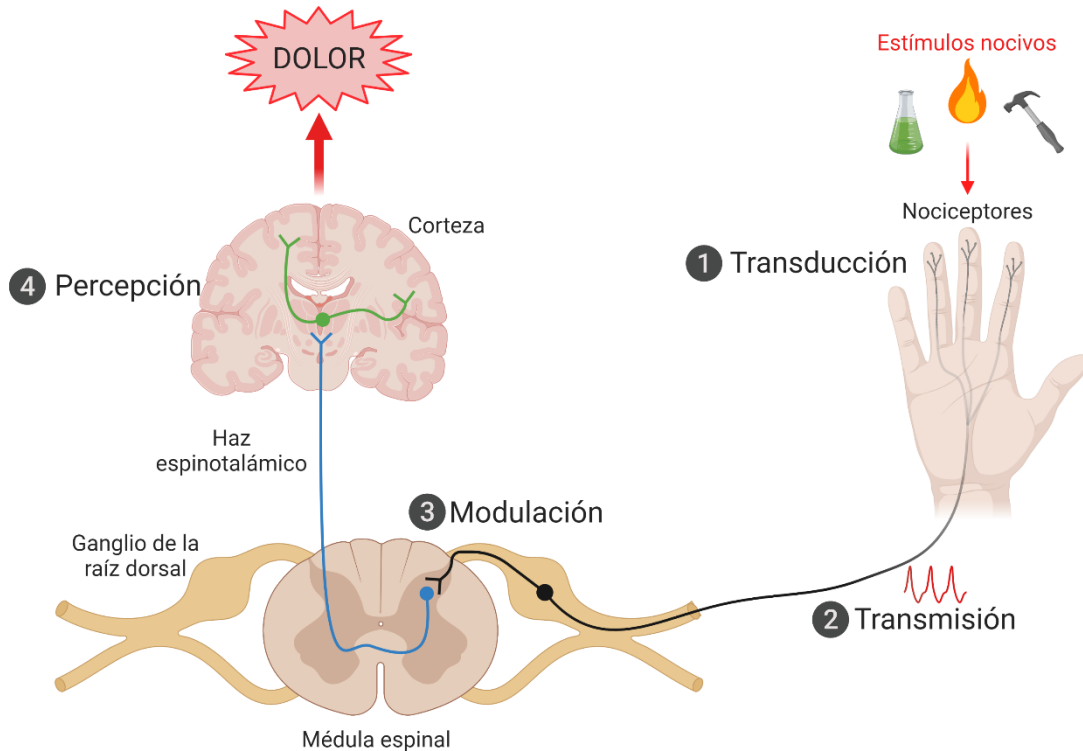
<b>Clasificación del dolor</b>				
	<b>Función</b>	<b>Tipo de dolor</b>	<b>Definición</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>Adaptativo</b>	Brinda protección al organismo.	Nociceptivo	Dolor que se presenta en respuesta a un estímulo nocivo.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dolor de estómago</li> <li>• Dolor muscular</li> </ul>
		Inflamatorio	Sensibilidad espontánea que se presenta después de una lesión al tejido.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Artritis reumatoide</li> <li>• Dolor postoperatorio</li> <li>• Lesión en la piel</li> </ul>
<b>Maladaptativo</b>	Es el resultado de un funcionamiento inadecuado del sistema sensorial. No brinda función de protección al organismo.	Neuropático	Dolor causado por una lesión o enfermedad que afecta al sistema nervioso central o periférico.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neuropatía diabética</li> <li>• Dolor del nervio ciático</li> <li>• Neuralgia postherpética</li> </ul>
		Disfuncional	Sensibilidad en ausencia de un daño aparente al sistema nervioso.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibromialgia</li> <li>• Síndrome de colon irritable</li> <li>• Dolor pélvico crónico</li> </ul>



**Figura 1. Clasificación del dolor.** El dolor se puede dividir en 4 clases: **A)** el dolor nociceptivo representa la sensación asociada con la detección de un potencial estímulo nocivo al tejido. **B)** el dolor inflamatorio está asociado con la lesión al tejido y la infiltración de células del sistema inmune. Este dolor puede promover la reparación por causar dolor hasta que el daño sea resuelto. **C)** el dolor neuropático es estado patológico causado por la lesión directa del sistema nervioso central y periférico. **D)** el dolor disfuncional se caracteriza por la ausencia de una lesión o proceso inflamatorio aparente al cuerpo. Sin embargo, hay una función anormal del sistema sensorial. Imagen realizada utilizando BioRender.com.

### **1.1.2. Nocicepción**

Los tejidos cutáneos y somáticos se encuentran inervados por neuronas aferentes primarias que tienen contactos sinápticos con neuronas de segundo orden dentro de la médula espinal. Los nociceptores son una familia amplia de neuronas sensoriales capaces de traducir estímulos mecánicos, térmicos y químicos provenientes del ambiente, externo e interno, en potenciales de acción a través de la expresión de una serie de proteínas localizadas en la membrana celular (Gold y Stucky, 2020). En este sentido, las neuronas aferentes primarias desempeñan una función importante en el proceso de la nocicepción que involucra los mecanismos neuronales a través de los cuales un estímulo nocivo originado en la periferia se transmite al sistema nervioso central (SNC). La nocicepción está conformada por 4 procesos principales: 1) la transducción que se refiere al proceso mediante el cual un estímulo nocivo se convierte en una señal eléctrica; 2) la transmisión es la propagación de las señales eléctricas a través de las fibras aferentes primarias; 3) modulación que involucra la amplificación o inhibición de la señal nociceptiva, si la información nociceptiva es amplificada y enviada a centros supra-espinales se presenta; 4) la percepción consiste en la integración de las señales nociceptivas con factores cognitivos y emocionales que le brindan al dolor la característica de ser una experiencia consiente y altamente subjetiva (Figura 2) (Kidd y Urban, 2001; Tracey y Mantyh, 2007).



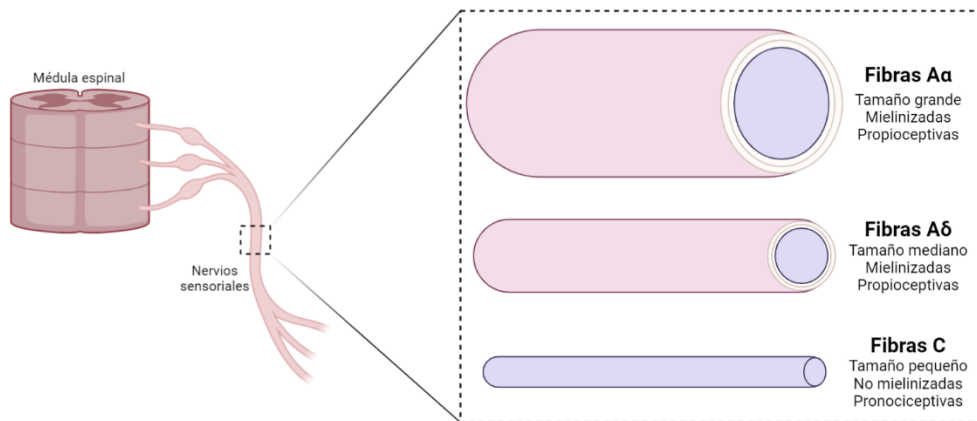
**Figura 2. La vía del dolor.** La vía del dolor está integrada por 4 procesos principales: 1) transducción, 2) transmisión, 3) modulación y 4) percepción. Imagen realizada utilizando BioRender.com.

### 1.1.3. Nociceptores

Las aferentes primarias tienen sus cuerpos celulares localizados en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) o el ganglio del trigémino (GT) y poseen un axón que se bifurca en una fibra periférica que inerva los tejidos blancos y una fibra central que hace sinapsis con neuronas de la médula espinal. Los nociceptores se pueden clasificar de acuerdo al calibre de sus axones y al nivel de mielinización (Figura 3) (Middleton et al., 2021).

Las fibras  $A\beta$  poseen axones de diámetro grande ( $>10 \mu\text{m}$ ) envueltos en una capa gruesa de mielina. Además, las fibras  $A\beta$  tienen una velocidad de conducción rápida del estímulo nocivo (30-100 m/seg); por lo tanto, participan en la detección de estímulos mecánicos inocuos como presión, tacto y

vibración, entre otros. En contraste, los axones de las fibras  $A\delta$  son de diámetro mediano (2-6  $\mu\text{m}$ ) y tienen una capa de mielina más delgada en comparación con las fibras  $A\beta$ . Las fibras  $A\delta$  tienen una velocidad de conducción media (12-30 m/seg) y se clasifican en mecanorreceptores de bajo y alto umbral. Por otra parte, las fibras  $A\delta$  pueden activarse por estímulos térmicos. En este sentido, el 12% de las fibras  $A\delta$  son sensibles al calor ( $\sim 42^\circ\text{C}$ ) y el 50% de éstas son sensibles al frío ( $\sim 8^\circ\text{C}$ ). La heterogeneidad que tienen las fibras  $A\delta$  les confiere adaptarse lentamente al estímulo nocivo; lo que ayuda a comprender porque la sensación de dolor permanece durante todo el estímulo (Cain et al., 2001; Caterina y Julius, 1999; Smith y Lewin, 2009). Por su parte, las fibras C son de diámetro pequeño (0.4-1.2  $\mu\text{m}$ ) y no poseen mielina, lo cual reduce la velocidad de conducción de la información sensorial (0.5-2 m/seg). De manera general, las fibras C son activadas por diversos estímulos nocivos como presión mecánica, calor y sustancias químicas. Esto les confiere su característica de ser fibras polimodales. Las fibras C son el grupo de fibras sensoriales más abundante y se clasifican en peptidérgicas y no peptidérgicas. Estas subpoblaciones de neuronas se ha definido por la presencia del péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP) y/o sustancia P (SP) en el caso de las neuronas peptidérgicas, mientras que las neuronas no peptidérgicas se caracterizan por la unión de isolectina B4 (IB4) y/o la expresión del receptor purinérgico  $P2X_3$  (Middleton et al., 2021; Smith y Lewin, 2009). Además, el último grupo de fibras C, identificado en roedores y humanos, se denomina “silenciosas”. Las fibras C silenciosas no poseen mielina en sus axones y se localizan en la piel, articulaciones y vísceras. Este tipo de fibras no se activan por estímulos mecánicos o térmicos. Sin embargo, se sensibilizan a estos estímulos en condiciones de inflamación o daño tisular (Weidner et al., 1999).



**Figura 3. Tipos de fibras sensoriales.** Las fibras aferentes primarias presentan diferentes grados de mielinización y diámetro, lo que les confiere diferentes velocidades de conducción. Las fibras A $\beta$  participan en la detección de estímulos mecánicos no nocivos como presión, tacto y vibración, entre otros. Las fibras A $\delta$  se clasifican en mecanonociceptores de alto y bajo umbral de activación pero también pueden ser activadas por estímulos térmicos. Las fibras C son activadas por diversos estímulos nocivos como presión mecánica, calor y sustancias químicas. Imagen realizada utilizando BioRender.com.

## 1.2. Dolor neuropático

El dolor neuropático es un padecimiento crónico que de acuerdo con la IASP se define como *dolor causado por una lesión o enfermedad del sistema somatosensorial*. Este tipo de dolor conlleva a una serie de cambios morfológicos y moleculares en la vía del dolor, lo que altera la percepción y el procesamiento de los estímulos nocivos (Scholz et al., 2019; Serra-Catafu, 2007). En este sentido, las personas que padecen dolor neuropático cursan con diversos signos y síntomas que se han clasificado en positivos y negativos. Entre los signos negativos se encuentran el déficit somatosensorial y la pérdida de la sensación vibratoria (signos no dolorosos). Algunos signos positivos se manifiestan en ausencia de un estímulo nocivo, entre los cuales destacan la parestesia, disestesia y el dolor espontáneo (Serra-Catafu, 2007; von Hehn et al., 2012). Adicionalmente, los pacientes con dolor neuropático experimentan síntomas que se desarrollan en presencia de un estímulo

nocivo, como la alodinia e hiperalgesia mecánica y/o térmica (Jensen y Finnerup, 2014). Sin embargo, estos síntomas no se presentan en la misma magnitud entre las personas con dolor neuropático. Se estima que el 90% de los pacientes desarrollan dolor espontáneo, 64% alodinia mecánica y el 38% hiperalgesia mecánica o térmica (Alles y Smith, 2018). Además de estos síntomas, el dolor neuropático presenta un elevado grado de comorbilidades, como depresión, ansiedad y trastornos del sueño. En conjunto, todos estos síntomas impactan la calidad de vida de la persona que padece dolor neuropático.

El dolor neuropático es una entidad patológica sin importar su etiología. Actualmente, se estima que aproximadamente del 6.9-10% de la población a nivel mundial padece dolor neuropático (Alles y Smith, 2018; Meacham et al., 2017). Desafortunadamente, en México no hay información precisa sobre el número de personas que padecen dolor neuropático. La encuesta nacional de salud y nutrición (ENSANUT) en 2016 reportó que el 41.2% de las personas diabéticas presentan dolor neuropático. Además, el 73% de las personas que se contagiaron con el virus del herpes zóster desarrollan neuropatía postherpética (García-González y Rosas-Carrasco, 2017). Lo anterior demuestra que el dolor neuropático es una enfermedad que debe ser estudiada y tratada de manera oportuna.

El dolor neuropático se puede clasificar, de acuerdo con su etiología, en periférico y central. Lo anterior dependiendo si la lesión se origina en los nervios periféricos o en la médula espinal y/o cerebro, respectivamente. Entre las etiologías más comunes del dolor neuropático se encuentran: 1) degenerativas, 2) traumáticas, 3) infecciosas, 4) metabólicas, y 5) tóxicas, aunque también ciertas circunstancias como problemas vasculares, neoplásicas y genéticas pueden dar origen al desarrollo de dolor neuropático

(Gilron et al., 2015). En la Tabla 2 se enlistan las principales etiologías del dolor neuropático.

**Tabla 2. Etiología del dolor neuropático**

Etiología	Lesión inducida a nivel periférico	Lesión inducida a nivel central	
		Espinal	Cerebral
<b>Ejemplos de síndrome de dolor neuropático</b>			
<b>Genética</b>	Neuropatía de Fabry	Siringomielia	Siringobulbia
<b>Infecciosa</b>	Neuralgia postherpética	Mielitis infecciosa	Encefalitis
<b>Inmunológica</b>	-	Esclerosis múltiple	Esclerosis múltiple
<b>Metabólica</b>	Neuropatía diabética	Mielopatía por déficit de vitamina B <sub>12</sub>	-
<b>Neoplásica</b>	Neuropatía por compresión tumoral	Compresión tumoral	Compresión tumoral
<b>Toxica</b>	Neuropatía secundaria a quimioterapia	-	-
<b>Traumática</b>	Lesión de los nervios	Lesión medular	Traumatismo cráneo-encefálico
<b>Vascular</b>	Neuropatía vascular	Infarto medular	Accidente vascular cerebral

### 1.3. Tratamiento del dolor neuropático

En la actualidad el tratamiento del dolor neuropático es un reto importante para el personal de salud debido a que los mecanismos involucrados en la generación de este padecimiento son poco comprendidos (Sah et al., 2003). En este sentido, las opciones terapéuticas disponibles se clasifican con base en su eficacia clínica en primera, segunda y tercera línea de tratamiento. En la primera línea se encuentran fármacos como los antidepresivos y



antiepilépticos; en la segunda línea están los analgésicos opioides débiles y los agentes tópicos como la capsaicina y los anestésicos locales. Finalmente, en la tercera línea podemos encontrar los opioides fuertes como el fentanilo (Tabla 3). Sin embargo, la terapéutica actual posee una eficacia baja. El tratamiento farmacológico solo disminuye el 30% de los síntomas de dolor (Rasmussen et al., 2004). Además, los efectos adversos son factores clave que llevan a los pacientes con dolor neuropático a abandonar los tratamientos farmacológicos. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas que sean más seguras y eficaces se ha vuelto una necesidad a nivel mundial.

#### **1.4. Fisiopatología del dolor neuropático**

Algunos de los mecanismos que subyacen el dolor neuropático son desconocidos debido a las diferentes etiologías de este padecimiento. Se sabe que después de la lesión a los nervios periféricos se generan descargas ectópicas que contribuyen al desarrollo del dolor neuropático. Además, el daño a los nervios también induce cambios plásticos a nivel espinal. Estos cambios favorecen al desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático. Entre los mecanismos que participan de manera importante en el dolor neuropático se encuentran: 1) la sensibilización periférica y/o central, 2) las descargas ectópicas, 3) la neuroinflamación, y 4) la activación de células gliales y 5) la pérdida del control GABAérgico periférico o espinal (Alles y Smith, 2018).

Tabla 3. Tratamiento del dolor neuropático

	<b>Grupo farmacológico</b>	<b>Ejemplos</b>	<b>Efectos adversos</b>
<b>Primera línea</b>	Antidepresivos tricíclicos	Amitriptilina Imipramina	Aumento de peso Convulsiones Hipotensión Sedación Somnolencia
	Antidepresivos inhibidores de la recaptura de serotonina y noradrenalina	Duloxetina Venlafaxina	Ansiedad Estreñimiento Nausea Sedación Pérdida del apetito
	Antiepilépticos	Gabapentina Pregabalina	Ataxia Fatiga Mareos Sedación Aumento de peso
	Iminoestilbeno	Carbamazepina	Ataxia Confusión Debilidad Mareo Sedación Somnolencia
<b>Segunda línea</b>	Opioides débiles	Tramadol	Tolerancia
	Anestésicos locales	Lidocaína	Estreñimiento
	Agentes tópicos	Capsaicina tópica	Mareos Somnolencia
<b>Tercera línea</b>	Opioides fuertes	Morfina	Sedación
		Oxicodona	Vomito
		Fentanilo	

#### 1.4.1. Sensibilización periférica

La sensibilización periférica se refiere al incremento de la excitabilidad neuronal, consecuencia de la disminución del umbral de activación y el aumento en la actividad eléctrica de los nociceptores, entre otros (Woolf y Ma, 2007). Lo anterior resulta en que estímulos inocuos, como el tacto ligero, temperaturas frías o calientes, se perciban como dolorosos (alodinia) o que los estímulos dolorosos se perciban como extremadamente dolorosos (hiperalgesia).

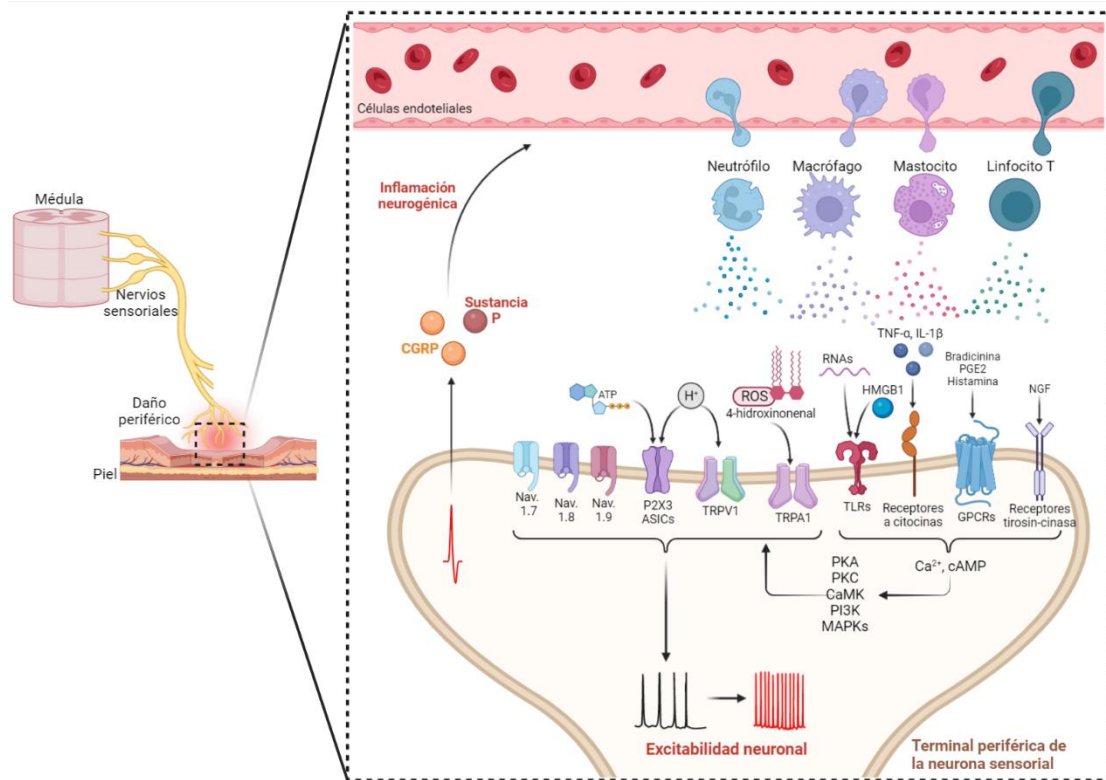
Después de que ocurre el daño a los nervios se produce la liberación de mediadores pronociceptivos y proinflamatorios en el sitio del daño. Estos mediadores son capaces de activar a los nociceptores a través de la interacción con sus receptores específicos o modulando la función de otros receptores a través de segundos mensajeros o vías de señalización. Dichas vías involucran cinasas como la proteína cinasa C (PKC), proteína cinasa A (PKA), fosfoinositol 3-cinasa (PI3K), proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), proteína cinasa activada por señales extracelulares (ERK), la cinasa C-jun N-terminal (JNK), entre otras. La activación de estas vías de señalización induce cambios transcripcionales aumentando los niveles del ARNm de genes blanco como el receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1) o los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav 1.7, 1.8 y 1.9), entre otros. Además, el daño a los nervios induce cambios en el estado de fosforilación de los diferentes canales y receptores. Lo anterior modifica el umbral y cinética de activación de estas proteínas aumentando la actividad eléctrica de los nociceptores. De tal manera que, ahora un estímulo nocivo induce un número mayor de potenciales de acción (Basbaum et al., 2009; Costigan y Woolf, 2000; Stein et al., 2009; Woolf y Ma, 2007).

Por otra parte, el daño a los nervios espinales incrementa la liberación de neurotrofinas como el factor de crecimiento neuronal (NGF). La unión de esta neurotrofina con su receptor tirosina cinasa A (TrkA), en mastocitos, induce la liberación de histamina, serotonina (5-HT), proteasas, TNF- $\alpha$ , entre otros. Además, la unión del NGF con su receptor, en neuronas peptidérgicas, modula la expresión y activación de algunos receptores y canales iónicos, como el receptor a bradicinina y los canales sensibles a ácido (ASIC) (Shu y Mendell, 1999; Siniscalco et al., 2011). La rápida modificación de estos receptores en las terminales periféricas contribuye al mantenimiento de la sensibilización periférica.

La propagación de los potenciales de acción hacia la terminal periférica de la aferente primaria lleva a la liberación de SP y CGRP. La interacción de estos péptidos con sus receptores induce una respuesta de relajación en el músculo liso vascular que induce la extravasación de células del sistema inmune al sitio de la lesión. La extravasación favorece al reclutamiento de células inmunes, como neutrófilos, macrófagos, linfocitos T y células dendríticas que contribuyen a perpetuar la inflamación y la hiperexcitabilidad (Costigan y Woolf, 2000; Marchand et al., 2005) (Figura 4). Finalmente, todos los procesos mencionados anteriormente inducen un aumento de la transmisión nociceptiva en las terminales periféricas, lo que contribuye de manera importante al desarrollo de sensibilidad en las terminales centrales de las aferentes primarias.

#### **1.4.2. Actividad ectópica**

Una característica muy importante del dolor neuropático es la presencia de dolor en ausencia de un estímulo nocivo identificable, lo que se ha denominado dolor espontáneo. El dolor espontáneo resulta de la generación de potenciales de acción ectópicos dentro de la vía nociceptiva que no son originados en respuesta a un estímulo nocivo (Costigan et al., 2009). Teóricamente, la generación de actividad ectópica podría tener origen en cualquier área de la vía nociceptiva incluyendo áreas cerebrales relacionadas con el procesamiento nociceptivo. Sin embargo, algunos estudios demuestran que la generación de potenciales de acción aberrantes se originan en el sitio del daño (neuroma), en el soma de las neuronas lesionadas, en neuronas no lesionadas adyacentes al sitio del daño e incluso la actividad ectópica puede ser generada por la actividad de las neuronas de bajo umbral (Amir et al., 2005; Campbell et al., 1988; Wu et al., 2002).



**Figura 4. Sensibilización periférica.** El daño al tejido induce un proceso inflamatorio a través de la extravasación e infiltración de células del sistema inmune como macrófagos, linfocitos T, neutrófilos y mastocitos al sitio de la lesión. Las células infiltradas y las células residentes liberan al espacio extracelular mediadores inflamatorios como bradicinina, prostaglandinas (PG), iones hidrogeno ( $H^+$ ), factores tróficos, adenosín trifosfato (ATP) y citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ) e Interleucinas (IL). Los nociceptores expresan diversos receptores a través de los cuales actúan estos mediadores inflamatorios. Estos receptores incluyen receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y receptores tirosina-cinasa que después de su activación generan segundos mensajeros como el calcio ( $Ca^{2+}$ ) y el adenosín monofosfato cíclico (cAMP); los cuales activan diversas cinasas como la proteína cinasa C (PKC), la proteína cinasa A (PKA), la cinasa calcio-calmodulina II (CaMK), la fosfoinositol-3-cinasa (PI3K) y diversas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Estas cinasas inducen hipersensibilidad e hiperexcitabilidad en los nociceptores a través de la modulación de canales iónicos como los receptores de potencial transitorio (TRPA1 y TRPV1), canales de sodio dependientes de voltaje (Nav), entre otros. Los nociceptores también expresan receptores tipo Toll (TLRs) que se activan por ligandos endógenos y exógenos. Finalmente, la activación de los nociceptores produce la liberación de sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), los cuales están involucrados en la generación de inflamación neurogénica. Imagen realizada utilizando BioRender.com.

Las fibras sensoriales están conformadas de un gran número de canales iónicos que son importantes en la excitabilidad neuronal. Sin embargo, cuando existe una lesión a los nervios, el patrón de expresión y la densidad de los canales iónicos se afecta, lo cual contribuye a la generación de descargas ectópicas. Los canales de potasio participan de manera importante en el potencial de membrana en reposo. En este sentido, los canales de potasio de dos poros (TREK-1) se encuentran abundantemente expresados en neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal y, la lesión a los nervios espinales aumenta la expresión de dicho canal (Alloui et al., 2006; Han et al., 2016; Shi et al., 2018). Asimismo, los canales de potasio de bajo umbral (KCNQ) también sufren cambios durante el dolor neuropático (Smith, 2020; Wang et al., 2021). Estos cambios en la función de los canales de potasio no solo involucra modificaciones en la expresión y función de la subunidad formadora del poro del canal, sino que el dolor neuropático induce cambios en las subunidades reguladoras de estos canales (Alles y Smith, 2018). Recientemente, se ha demostrado que las subunidades reguladoras de los canales de potasio, KChIP1, KChIP2 y DPP10 se ven afectadas después del daño a los nervios espinales (Kuo et al., 2017). Además, la administración de oligonucleótidos anti-sentido para dichas subunidades induce el desarrollo de conductas nociceptivas en animales intactos (Kuo et al., 2017).

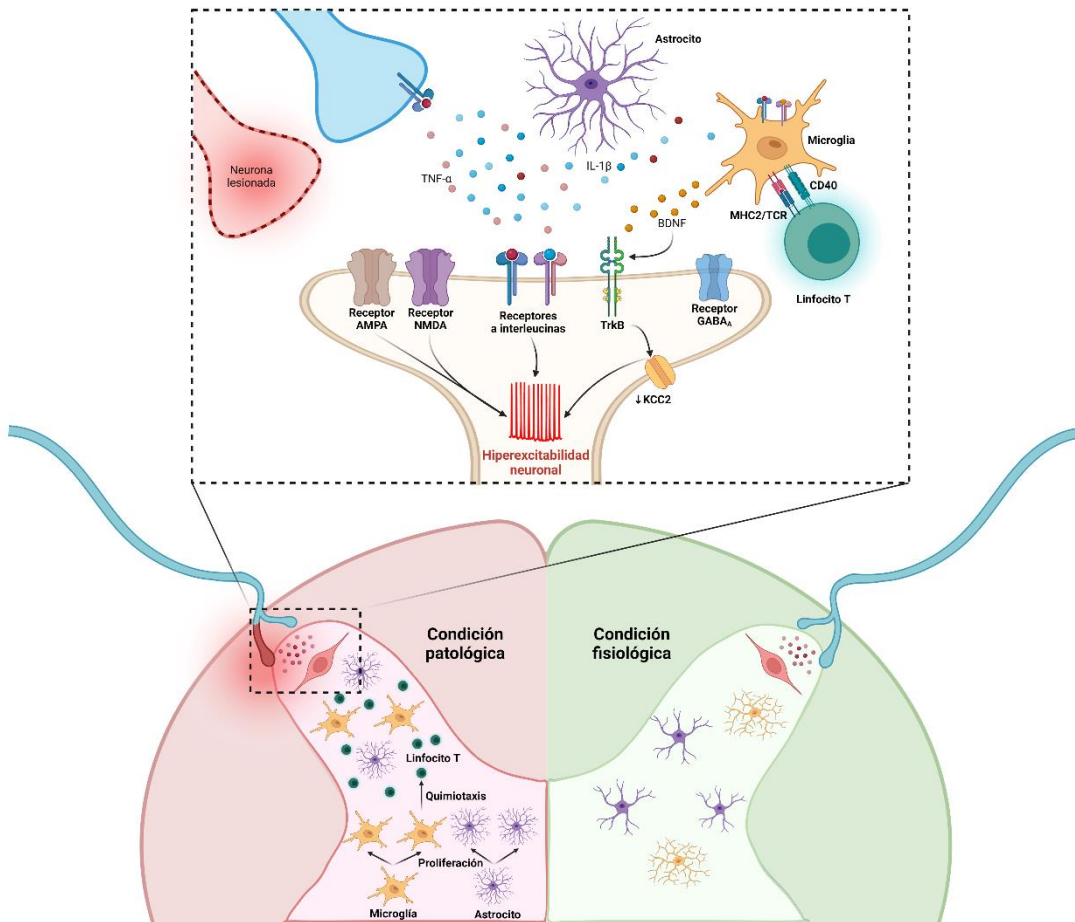
Por otra parte, los canales de sodio dependientes de voltaje tienen un papel importante en la generación de descargas ectópicas. Las neuronas sensoriales del GRD expresan diversos canales de sodio (Devor, 2006). A la fecha se desconoce que canales son los responsables de la generación de las descargas ectópicas durante el dolor neuropático (Fukuoka et al., 2008). Estudios utilizando aproximaciones farmacológicas y genéticas sugieren que el canal Nav1.8 es el responsable de la generación de descargas ectópicas (Dong et al., 2007; Ekberg et al., 2006; Gold et al., 2003; Jarvis et al., 2007).

Lo anterior concuerda con estudios en humanos donde se demuestra que los canales de sodio Nav1.7, 1.8 y 1.9 participan de manera importante en el desarrollo de neuropatías periféricas (Dib-Hajj et al., 2012; Sexton et al., 2018; Yekkirala et al., 2017).

Finalmente el dolor neuropático aumenta la sensibilidad de las neuronas lesionadas a estímulos endógenos contribuyendo a la aparición de transducción ectópica (Costigan et al., 2009). Por ejemplo, las terminales libres de las aferentes primarias tienen la capacidad de detectar estímulos térmicos nocivos (45 °C). Sin embargo, el umbral térmico de los nociceptores se reduce (~36 °C) después de una lesión nerviosa, lo que contribuye a la generación de actividad ectópica espontánea (Biggs et al., 2008).

#### **1.4.3. Sensibilización central**

La sensibilización central se refiere al aumento de la excitabilidad a nivel espinal como consecuencia de alteraciones en el balance excitación-inhibición (Basbaum et al., 2009). De manera fisiológica, las fibras aferentes primarias de bajo umbral producen en las neuronas e interneuronas espinales potenciales excitadores de baja intensidad, es decir, tienen una fuerza sináptica débil para inducir la aparición de potenciales de acción. Sin embargo, la sensibilización central permite la entrada de estímulos inocuos a la médula espinal que activan a las neuronas que procesan la información nociceptiva (Latremliere y Woolf, 2010). Diversos mecanismos han sido implicados en el desarrollo de la sensibilización central, entre los que se encuentran: (1) la hiperexcitabilidad mediada por glutamato, (2) la pérdida del control inhibitorio mediado por GABA, y (3) la neuroinflamación inducida por la activación de células gliales. En conjunto todos estos mecanismos contribuyen al desarrollo y mantenimiento de este fenómeno (Figura 5).



**Figura 5. Sensibilización central.** La sensibilización central resulta de la potenciación sináptica entre las terminales centrales de las fibras sensoriales y las neuronas de segundo orden. Los mecanismos pre-sinápticos aumentan la liberación de neurotransmisores y mediadores pronociceptivos que actúan en las neuronas de segundo orden o en las células gliales residentes de la médula espinal. Por ejemplo, el glutamato activa a sus receptores AMPA y NMDA en las neuronas de segundo orden; lo cual incrementa la entrada de calcio aumentando la excitabilidad neuronal. Además, la sensibilización central es facilitada por la liberación de mediadores pronociceptivos de las células gliales (astrocitos y microglía), entre los que destacan las interleucinas (IL), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), el factor de neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y factores quimioatrayentes; los cuales contribuye a mantener un estado de neuroinflamación en la médula espinal. En conjunto, todos estos eventos contribuyen a amplificar las señales dolorosas antes de ser enviadas a centro supra-espinales. Imagen realizada utilizando BioRender.com.



#### **1.4.3.1. Sensibilización central mediada por glutamato**

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en la vía nociceptiva y ejerce sus efectos a través de 4 receptores principales: AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpiónico), NMDA (N-metil-D-aspartato), kainato y receptores metabotrópicos a glutamato (mGluR) (Bleakman et al., 2006). En condiciones fisiológicas, el receptor NMDA se encuentra inactivo debido al bloqueo del ion  $Mg^{2+}$ . Sin embargo, dicho bloqueo se elimina después de un cambio en el potencial de membrana consecuencia de la activación de las neuronas aferentes primarias. Por lo tanto, la activación del receptor NMDA incrementa la fuerza sináptica e induce la entrada de calcio ( $Ca^{2+}$ ) en las neuronas postsinápticas; lo cual activa vías de señalización intracelulares que inician y mantienen la sensibilización central (Bleakman et al., 2006; Ji et al., 2003). El daño al nervio incrementa la expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA en las neuronas sensoriales de la médula espinal (Liu et al., 2008). Además, el dolor neuropático induce un funcionamiento aberrante de la proteína  $\beta$ -arrestina (Chen et al., 2016). De manera interesante, la actividad y expresión de la subunidad NR2B en el asta dorsal de la médula espinal está regulada por la proteína  $\beta$ -arrestina. Por lo tanto, el resultado es el aumento de la expresión de la subunidad NR2B en la médula espinal induciendo la hiperactividad del receptor NMDA y contribuyendo a perpetuar el dolor neuropático (Chen et al., 2016; Liu et al., 2008).

Por otra parte, el dolor neuropático aumenta el tráfico de los receptores AMPA a la membrana plasmática de las neuronas e interneuronas que procesan la información sensorial (Tao, 2012). Debido a que los receptores AMPA también desempeñan un papel importante en la transmisión sináptica excitadora a nivel espinal, estos receptores pueden estar contribuyendo a mantener la sensibilización central.

Diversos estudios han demostrado que el daño a los nervios induce la regulación a la baja del transportador de aminoácidos excitadores 2 (EAAT2); lo que correlaciona con el desarrollo de conductas nociceptivas (Cata et al., 2006; Sung et al., 2003; Weng et al., 2006). La disminución de la remoción del glutamato extracelular por parte del EAAT2 provoca un aumento de glutamato y, por consecuencia, la activación constante del receptor NMDA. Lo anterior incrementa la excitabilidad neuronal a nivel espinal. Finalmente, la activación de los receptores metabotrópicos a glutamato (mGluR) induce la activación de diferentes cinasas como la cinasa ERK que inhibe a los canales Kv4.2; lo anterior modifica el potencial de membrana en reposo permitiendo a la neurona responder de manera rápida ante estímulos de baja intensidad (Hu y Gereau, 2011; Karim et al., 2001).

#### **1.4.3.2. Sensibilización central mediada por la interacción neuro-inmune**

Además de la importante función que desempeñan las neuronas sensoriales y la aceptada participación de la microglía en los mecanismos que subyacen al dolor neuropático (Beggs y Salter, 2013; Beggs et al., 2012; Coull et al., 2005; Lu et al., 2009), es necesario considerar la participación de otras células inmunocompetentes en el dolor neuropático tales como astrocitos, células endoteliales, macrófagos, linfocitos T y células satelitales del GRD (Beggs et al., 2010; Calvo et al., 2012; DeLeo et al., 2007; Dodds et al., 2016; Grace et al., 2014; Mikuzuki et al., 2017; Vicuña et al., 2015). Lo anterior debido que las células inmunes expresan una amplia gama de receptores y pueden activar diversos mecanismos transducciones después de una lesión nerviosa (Chiu et al., 2012).

La participación del sistema inmune en la fisiopatología del dolor crónico surge por la presencia de malestar, letargo, depresión y ansiedad (signos clásicos de las enfermedades sistémicas) en pacientes con dolor neuropático. Lo

anterior se confirmó con los niveles elevados de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) en los nervios periféricos (Grace et al., 2014). Además de los efectos proinflamatorios de la IL-1 $\beta$ , se ha demostrado que dicha citocina activa directamente las neuronas sensoriales induciendo la generación de potenciales de acción (Stemkowski et al., 2017). Otro mecanismo propuesto de la IL-1 $\beta$  es el incremento de la expresión de los canales Cav 3.2 en el GRD, lo que aumenta la excitabilidad neuronal y contribuye al desarrollo de conductas nociceptivas (Binshtok et al., 2008; Stemkowski y Smith, 2012).

Después de un daño al sistema somatosensorial, las terminales centrales de las aferentes primarias liberan ATP y quimiocinas, que al unirse a sus receptores expresados en la microglía inducen cambios morfológicos, modificaciones en la expresión de genes o receptores membranales y, alteran la síntesis de mediadores pro- y anti-inflamatorios (Gao y Ji, 2010). La activación del receptor purinérgico P2X<sub>4</sub> induce la liberación de BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) de la microglía, que al unirse a su receptor TrkB (receptor de tirosina cina B) altera la homeostasis del cloruro intracelular y, con ello, contribuye a mantener un estado de hiperexcitabilidad a nivel espinal (Coull et al., 2005). Es importante mencionar que las interacciones neuroinmunes en el dolor crónico son bidireccionales. Es decir, las células inmunes liberan citocinas, lípidos, factores de crecimiento, entre otras sustancias, que tienen sus sitios de acción en las neuronas sensoriales tanto a nivel periférico como central y, en consecuencia, los nociceptores liberan neuropéptidos que modulan la actividad de las células inmunes (Chiu et al., 2012).

#### **1.4.3.3. Sensibilización central mediada por GABA**

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central (Burt y Kamatchi, 1991). Bajo condiciones fisiológicas, las interneuronas GABAérgicas de la médula espinal

liberan GABA al espacio sináptico, que al interactuar con sus receptores GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> o GABA<sub>C</sub> inducen una corriente hiperpolarizante, lo que atenúa el estímulo doloroso (Burt y Kamatchi, 1991; Zeilhofer et al., 2012). Sin embargo, después de una lesión a los nervios espinales existe una pérdida del control inhibitorio GABAérgico, consecuencia de cambios en la expresión y función de los receptores a GABA o cambios en las concentraciones intracelulares de cloruro debido a un funcionamiento inadecuado de los cotransportadores de cloruro (Price et al., 2005; Vinay y Jean-Xavier, 2008).

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Neurotransmisión GABAérgica**

El GABA es un aminoácido no proteico que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. De manera particular, el GABA está presente en concentraciones elevadas en diferentes áreas del cerebro (Kleppner y Tobin, 2002). Además, el GABA también se ha encontrado en varios alimentos como el té verde, la soja y el germinado de arroz, entre otros (Ngo y Vo, 2019). El GABA, en su mayoría, se obtiene a partir de la descarboxilación del glutamato por acción de la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) (Martin y Rinvall, 1993). Existen dos isoformas de esta enzima, la enzima GAD<sub>65</sub>, con un peso molecular de 65 kDa, y GAD<sub>67</sub> con peso molecular de 67 kDa. De manera interesante, las neuronas del sistema nervioso expresan ambas enzimas. Sin embargo, la localización subcelular de estas enzimas es diferente. La enzima GAD<sub>67</sub> está presente en el soma de las neuronas. El GABA sintetizado por esta enzima participa en procesos de sinaptogénesis debido a que cumple un papel de factor trófico durante el desarrollo neuronal (Chattopadhyaya et al., 2007; Lamigeon et al., 2001). Por su parte, la enzima GAD<sub>65</sub> se expresa principalmente en las terminales axónicas de las neuronas, por lo que el GABA sintetizado por dicha enzima se ha implicado en los procesos de comunicación neuronal (Martin y Rinvall, 1993; Mitoma et al., 2017). El GABA sintetizado se almacena en vesículas a través del transportador vesicular de GABA (VGAT) (Kleppner y Tobin, 2002). Posteriormente, el GABA se libera al espacio sináptico donde difunde para activar a sus receptores blanco, localizados sobre las neuronas postsinápticas. Después de que el GABA se libera en la hendidura sináptica, se recaptura por los transportadores de GABA (GAT-1 y GAT-3); los cuales se encuentran expresados en neuronas y astrocitos, respectivamente (Jin et al., 2011; Kleppner y Tobin, 2002). Finalmente, el catabolismo del GABA se lleva a cabo

---

a través de la enzima GABA transaminasa (GABA-T). Esta enzima emplea GABA y  $\alpha$ -ketoglutarato como sustratos y genera ácido glutámico y semialdehído succínico (SSA). El SSA puede ser metabolizado en ácido  $\gamma$ -hidroxibutírico y modular a los receptores GABA<sub>B</sub> o incorporarse al ciclo de Krebs participando en procesos metabólicos (Kleppner y Tobin, 2002; Waagepetersen y Schousboe, 2015).

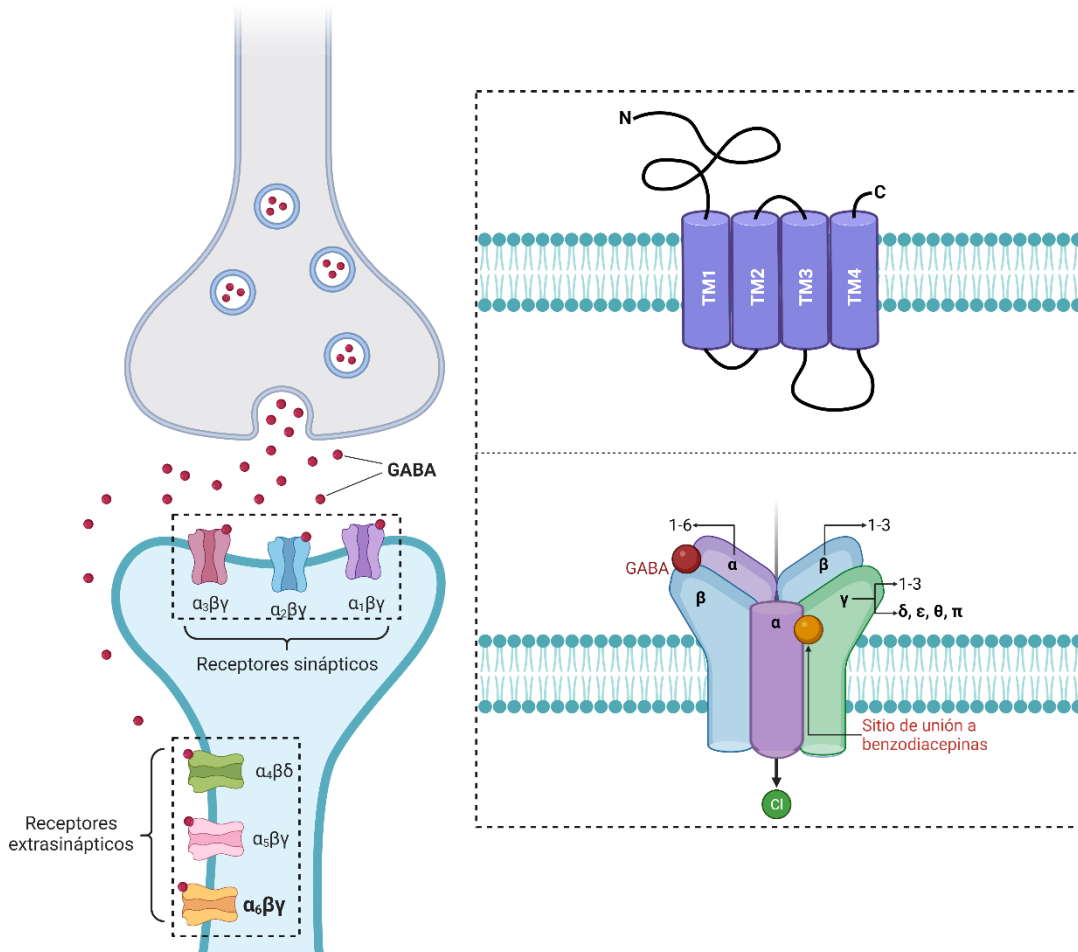
## 2.2. Receptores GABA<sub>A</sub>

Como se mencionó en la sección anterior, el GABA ejerce su función inhibitoria mediante la activación de tres distintos receptores: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>C</sub>. Los receptores GABA<sub>A</sub> son canales heteropentaméricos dependientes de ligando permeables al ion cloruro (Cl<sup>-</sup>), y en menor medida, al ion bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Macdonald y Botzolakis, 2009). Los receptores GABA<sub>A</sub> pertenecen a la superfamilia de canales iónicos dependientes de ligando, junto con los receptores nicotínicos de acetilcolina, los receptores glicinérgicos, los receptores 5-HT<sub>3</sub> y los canales activados por zinc (Olsen y Tobin, 1990; Schofield et al., 1988). En la actualidad se han identificado 19 subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> que incluyen: 6 subunidades  $\alpha$ , 3  $\beta$ , 3  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ ,  $\rho$  (Olsen y Sieghart, 2008) (Figura 6). La diversidad en la combinación de las distintas subunidades, debido al *splicing* alternativo, genera una gran variedad de receptores GABA<sub>A</sub> con distintas propiedades farmacológicas (D'Hulst et al., 2009; Möhler, 2015). La composición estequiométrica más abundante de los receptores GABA<sub>A</sub>, en el SNC, está conformada por: dos subunidades  $\alpha$ , dos subunidades  $\beta$  y una subunidad  $\gamma$ , la cual puede ser reemplazada por la subunidad  $\delta$  (Möhler et al., 2002; Olsen y Sieghart, 2008).

Desde el punto de vista fisiológico, los receptores GABA<sub>A</sub> se pueden clasificar de acuerdo con su localización sináptica en receptores GABA<sub>A</sub> sinápticos y receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos (Figura 6). La activación de los receptores

GABA<sub>A</sub> sinápticos, en el SNC maduro, induce una corriente post-sináptica inhibitoria (IPSC) rápida (~100  $\mu$ s) que se genera debido a la entrada masiva de iones Cl<sup>-</sup> a las neuronas post-sinápticas (Delgado-Lezama et al., 2013; Farrant y Nusser, 2005). En contraste, en el SNC inmaduro, y en las neuronas nociceptivas del GRD, la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> provoca una despolarización sub-umbral cuyo efecto es reducir la propagación de los potenciales de acción provenientes de la periferia (Álvarez-Leefmans y Delpire, 2009; Price et al., 2009; Price y Prescott, 2015).

Por otra parte, los receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos se encuentran localizados en las membranas axónicas y dendríticas, pero no cerca de la hendidura sináptica. Estos receptores tienen una afinidad alta por el GABA, además de ser activados por el GABA ambiental liberado de células gliales, como los astrocitos. Los receptores extrasinápticos producen una inhibición tónica de largo plazo que no depende del control sináptico directo (Belelli y Lambert, 2005; Farrant y Nusser, 2005; Semyanov et al., 2004). Los receptores GABA<sub>A</sub> que contienen las subunidades  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$  y  $\alpha_6$  en combinación con la subunidad  $\gamma_2$  o la subunidad  $\delta$  son predominantemente receptores de tipo extrasináptico. La inhibición tónica mediada por dichos receptores tiene un papel importante en la regulación de la excitabilidad neuronal y en el desarrollo neuronal o cognitivo (Semyanov et al., 2004; Wu y Sun, 2015). Las funciones que desempeñan los receptores GABA<sub>A</sub> puede ser modificadas por una gran variedad de moduladores alostéricos entre los que destacan las benzodiazepinas, flavonoides, esteroides, anestésicos, barbitúricos y neuroesteroides (Möhler, 2015; Olsen, 2015).



**Figura 6. Estructura y localización de los receptores GABA<sub>A</sub>.** Los receptores GABA<sub>A</sub> pertenecen a la familia de receptores Cys-Loop debido a su estructura heteropentamérica. Cada subunidad está conformada de 4 segmentos transmembranales (TM1-4), un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal intracelular. La estequiometría de los receptores GABA<sub>A</sub> se diversifica al poder estar constituida por 6 subunidades  $\alpha$ , 3 subunidades  $\beta$ , 3 subunidades  $\gamma$  que puede ser remplazada por la subunidad  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ . El sitio de unión del GABA se localiza en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ; mientras que el sitio de unión a las benzodiazepinas se encuentra entre la subunidad  $\alpha$  y  $\gamma$ . De acuerdo con su localización sináptica los receptores GABA<sub>A</sub> se dividen en sinápticos (GABA<sub>A</sub>- $\alpha_{1-3}$ ) y extrasinápticos (GABA<sub>A</sub>- $\alpha_{4-6}$ ). Imagen realizada utilizando BioRender.com.

### 2.3. Control inhibitorio GABAérgico

La modulación de la información nociceptiva en el sistema nervioso depende de la transmisión inhibitoria GABAérgica (Zeilhofer et al., 2012). La importancia



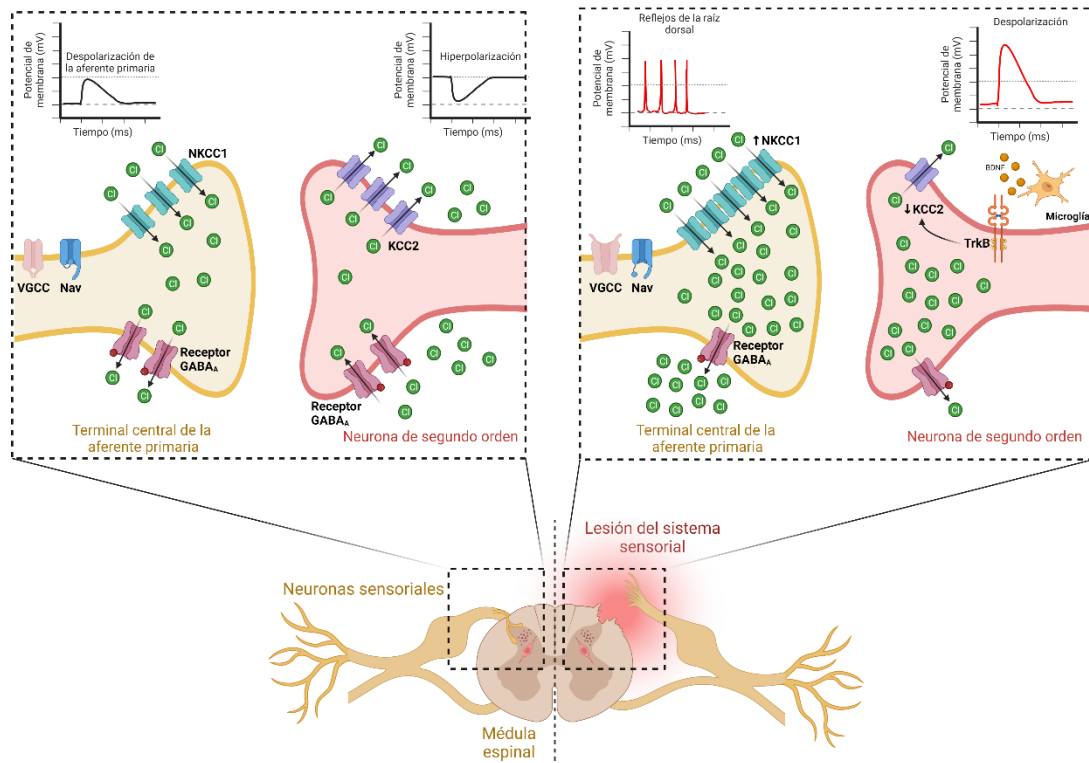
de la inhibición GABAérgica en el procesamiento del dolor se remonta a la “teoría del control de la compuerta” (Melzack y Wall, 1965). Dicha teoría establece que las neuronas de segundo orden del asta dorsal de la médula espinal están bajo el control de las fibras sensoriales de diámetro grande (fibras A), lo que reduce la transmisión de los estímulos nocivos. Sin embargo, en condiciones de dolor, las neuronas de diámetro pequeño (fibras C) aumentan su actividad y la entrada de estímulos nocivos a la médula espinal (Melzack y Wall, 1965; Price et al., 2009). La teoría propone que la información nociceptiva está regulada por mecanismos pre- y post-sinápticos inhibidores en el asta dorsal de la médula espinal (Chen et al., 2014; Melzack y Wall, 1965).

La inhibición GABAérgica desempeña un papel importante en el procesamiento de la información nociceptiva (Prescott, 2015). Existen dos tipos de inhibición sináptica dentro del sistema nervioso central, una fásica y otra tónica, que dependen de receptores GABA<sub>A</sub> específicos. La inhibición fásica tiene un papel importante en la transmisión de la información nociceptiva en centros superiores (Farrant y Nusser, 2005) y ocurre por la activación de los receptores a GABA y glicina localizados en la membrana post-sináptica (Ataka y Gu, 2006). Por su parte, la inhibición tónica ocurre cuando concentraciones bajas de GABA activan a los receptores GABA<sub>A</sub> de alta afinidad localizados en sitios lejanos a la hendidura sináptica y, de esta manera, producen una corriente inhibitoria tónica (Ataka y Gu, 2006; Farrant y Nusser, 2005; Semyanov et al., 2004). Tanto la inhibición fásica como tónica están determinadas por la actividad de las interneuronas inhibitorias locales y las fibras descendentes que modulan la información nociceptiva antes de ser enviada a centros supra-espinales y otras regiones de la médula espinal (Zeilhofer et al., 2012). Se ha demostrado que el bloqueo farmacológico de los receptores GABA<sub>A</sub> reproduce las características del dolor crónico (alodinia

mecánica, hiperalgesia y dolor espontáneo) en animales intactos (Price y Prescott, 2015; Zeilhofer et al., 2012). Además, hay evidencia que la inhibición sináptica GABAérgica disminuye bajo condiciones de dolor crónico (Coull et al., 2003; Keller et al., 2007) e inflamación (Müller et al., 2003; Zeilhofer, 2008). Lo anterior sugiere que la pérdida de la inhibición sináptica y extrasináptica ayuda a establecer y perpetuar el dolor (Coull et al., 2003; Keller et al., 2007; Prescott, 2015) (Figura 7).

### **2.3.1. Inhibición periférica**

La inhibición pre-sináptica se lleva a cabo en las conexiones axo-axónicas de las neuronas sensoriales (Zeilhofer et al., 2012). Las neuronas sensoriales del GRD tienen una expresión de co-transportadores de cloruro diferente a las neuronas de segundo orden de la médula espinal. En este sentido, las neuronas del GRD tienen una expresión alta del co-transportador sodio-potasio-cloruro (NKCC1) que transporta iones cloruro hacia el interior de la neurona. Dichas neuronas carecen de la expresión del co-transportador potasio-cloruro (KCC2), que transporta iones  $\text{Cl}^-$  hacia el exterior de la neurona (Álvarez-Leefmans et al., 2001; Price et al., 2009; Zeilhofer et al., 2012).



**Figura 7. Pérdida del control GABAérgico.** En las neuronas sensoriales periféricas, la concentración intracelular de cloruro  $[Cl^-]_i$  está por el co-transportador sodio-potasio-cloruro (NKCC1); este co-transportador mantiene las  $[Cl^-]_i$  altas en las neuronas del GRD en condiciones fisiológicas. Por tal motivo, la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> permite la salida de  $Cl^-$  de la neurona, lo que genera una corriente despolarizante conocida como despolarización de aferente primaria (PAD) que inhibe la transmisión de la información nociceptiva. En contraste, en las neuronas de proyección de la médula espinal hay una  $[Cl^-]_i$  baja debido a la expresión del co-transportador potasio-cloruro (KCC2) que transporta el  $Cl^-$  hacia el exterior de la neurona en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, la activación del receptor GABA<sub>A</sub> permite la entrada de  $Cl^-$  hacia la neurona, lo cual induce una corriente hiperpolarizante que tiene como efecto final reducir la transmisión de la información nociceptiva. Sin embargo, después del daño al nervio, la activación y expresión de NKCC1 incrementa; lo anterior contribuye a elevar las  $[Cl^-]_i$  en las neuronas sensoriales periféricas. En este sentido, la activación del receptor GABA<sub>A</sub> induce una corriente despolarizante de gran magnitud generando la aparición de potenciales de acción conocidos como reflejos de la raíz dorsal (RRD). Por su parte, las neuronas de la médula espinal tienen  $[Cl^-]_i$  altas debido a la expresión reducida de KCC2. Por lo tanto, la activación del receptor GABA<sub>A</sub> permite ahora la salida de  $Cl^-$  de la neurona generando una corriente despolarizante que favorece la transmisión de la información nociceptiva. Imagen realizada utilizando BioRender.com.

---

La unión del GABA con el receptor GABA<sub>A</sub> conduce a la apertura del poro de canal permitiendo la salida de Cl<sup>-</sup> de las neuronas; lo cual genera una corriente despolarizante sub-umbral que provoca un corto circuito en las neuronas sensoriales, y que se conoce como despolarización de la aferente primaria (DAP) (Álvarez-Leefmans y Delpire, 2009; Rocha-Gonzalez et al., 2008). La DAP se genera en las fibras aferentes que inervan el músculo, en mecanorreceptores cutáneos y en las fibras C y A, y se ha propuesto como el mecanismo que da origen a la inhibición pre-sináptica (Álvarez-Leefmans et al., 1988; Cervero et al., 2003; Price et al., 2009). Los mecanismos implicados en el fenómeno de inhibición pre-sináptica mediada por la DAP son: 1) inactivación de canales de sodio dependientes de voltaje, lo cual interrumpe la propagación del potencial de acción proveniente de la periferia; 2) reducción de la amplitud de los potenciales de acción a través de aumentar la conductancia de la membrana (*shunting*) consecuencia de la apertura de canales de Cl<sup>-</sup>; y 3) inactivación de los canales de calcio dependientes de voltaje localizados en las terminales centrales, lo cual disminuye la entrada de calcio en la neurona presináptica disminuyendo la liberación de neurotransmisores excitadores (Cervero et al., 2003; Price et al., 2005, 2009; Zeilhofer et al., 2012).

Después de un daño al tejido, las fibras no nociceptivas sensibilizadas estimulan de manera sostenida a las interneuronas GABAérgicas espinales. Además, la expresión y actividad de NKCC1 incrementa, lo que provoca un incremento en las concentraciones intracelulares de Cl<sup>-</sup> ([Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>). Por lo tanto, el GABA liberado de las interneuronas al unirse a los receptores GABA<sub>A</sub> presinápticos de las neuronas sensoriales permite la salida de cloruro. La salida de Cl<sup>-</sup> de la neurona sensorial genera una DAP intensa que alcanza el umbral de disparo de potenciales de acción, y que se conoce como reflejos de la raíz dorsal (RRD) (Álvarez-Leefmans y Delpire, 2009; Cervero y Laird, 1996;

Cervero et al., 2003; Loeza-Alcocer et al., 2013; Price et al., 2009). Los RRD se transmiten de manera antidrómica a la terminal periférica de las fibras sensoriales induciendo la liberación de neuropéptidos, como SP y CGRP. Además, los RRD se conducen de manera ortodrómica sobre-estimulando a las neuronas de la médula espinal y contribuyendo al desarrollo de las conductas nociceptivas (Cervero y Laird, 1996; Cervero et al., 2003; Garcia-Nicas et al., 2006; Loeza-Alcocer et al., 2013; Price et al., 2005).

### **2.3.2. Inhibición espinal**

En el sistema nervioso central, las neuronas de segundo orden del asta dorsal de la médula espinal tienen una concentración de cloruro intracelular menor comparada con la extracelular (Price y Prescott, 2015). En condiciones fisiológicas, la activación del receptor GABA<sub>A</sub> permite la entrada de Cl<sup>-</sup> al interior de la neurona, lo que genera a una corriente hiperpolarizante. La baja concentración de Cl<sup>-</sup> en las neuronas de la médula espinal es consecuencia de la presencia del co-transportador KCC2 y la ausencia del cotransportador NKCC1 (Price et al., 2009; Price y Prescott, 2015). Si el potencial de equilibrio del Cl<sup>-</sup> se encuentra cercano al potencial de membrana en reposo, la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> induce un corto circuito llamado *shunting*, el cual disminuye la excitabilidad neuronal (Doyon et al., 2011; Farrant y Kaila, 2007; Prescott, 2015). En contraste, si el potencial de equilibrio del Cl<sup>-</sup> es más positivo que el potencial de membrana en reposo, la actividad de los receptores GABA<sub>A</sub> se vuelve despolarizante (Ben-ari, 2007; Doyon et al., 2011; Prescott et al., 2006).

Bajo condiciones normales, el KCC2 transporta iones Cl<sup>-</sup> hacia el exterior de la neurona con el propósito de mantener concentraciones bajas de este ion en el SNC (Ben-Ari, 2002). Por su parte, las neuronas inmaduras tienen una expresión baja del KCC2. Durante el neurodesarrollo el GABA desempeña un papel excitador, lo cual es fundamental en la formación de sinapsis y la

migración neuronal (Payne et al., 2003; Watanabe y Fukuda, 2015). Sin embargo, después de la tercer semana postnatal hay un incremento de la expresión del KCC2 y las  $[Cl^-]_i$  se reducen, en ratas y ratones, lo cual contribuye a la función inhibitoria de los receptores GABA<sub>A</sub> (Ben-Ari, 2002; Watanabe y Fukuda, 2015).

Después de una lesión al tejido nervioso, la expresión del KCC2 disminuye y el  $Cl^-$  se acumula (Kahle et al., 2008; Price y Prescott, 2015). En consecuencia, la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> induce la salida del  $Cl^-$ , lo que genera una corriente despolarizante en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Coull et al., 2003). El cambio en la dirección del flujo de iones  $Cl^-$  reduce la función inhibitoria de los receptores GABA<sub>A</sub> e incluso produce excitabilidad (Bonin y De Koninck, 2013; Price et al., 2009). Se ha propuesto que la activación de la microglía en la médula espinal y la subsecuente liberación de BDNF después del daño al tejido están implicados en la reducción en la expresión y función del KCC2 (Bonin y De Koninck, 2013). Otro mecanismo que disminuye la inhibición espinal es la reducción en la actividad del receptor a glicina a través de la fosforilación dependiente de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Zeilhofer, 2008). Finalmente, la pérdida de la inhibición espinal permite la fosforilación de los receptores NMDA aumentando su actividad, lo cual aumenta la excitabilidad neuronal (Abe et al., 2005).

#### **2.4. El receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$**

El receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  fue clonado por primera vez, en 1990, a partir del cerebelo de ratas (Lüddens et al., 1990). Estudios de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica han demostrado que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  se encuentra localizado principalmente en las células granulares del cerebelo (Gutierrez et al., 1996; Laurie et al., 1992; Persohn et al., 1992; Pirker et al., 2000). Su localización y secuencia proteica se encuentra altamente conservada entre humanos, ratas, ratones, peces y pollos; lo que sugiere que este receptor

---

GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  desempeña una función importante dentro del cerebelo (Bahn et al., 1996). Además, el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  también ha sido identificado en otros tejidos neuronales y no-neuronales, tales como la médula espinal, el ganglio del trigémino, hígado, pulmón, entre otros (Sieghart et al., 2022).

En el cerebelo de la rata, el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  presenta la siguiente composición estequiométrica: 32% ( $\alpha_6\beta\gamma_2$ ), 37% ( $\alpha_1\alpha_6\beta\gamma_2$ ) y 29% ( $\alpha_1\alpha_6\beta\delta$ ) (Jechlinger et al., 1998; Pörtl et al., 2003). La subunidad  $\alpha_6$  le confiere a los receptores GABA<sub>A</sub> características electrofisiológicas particulares. Por ejemplo, los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  tienen una cinética de activación lenta acompañada de un tiempo de decaimiento largo en comparación con otros receptores GABA<sub>A</sub> (Bianchi et al., 2002). Acorde con lo anterior, los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  tienen una función importante en la regulación de la actividad neuronal.

Por otra parte, los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ , en particular los  $\alpha_6\beta_3\delta$ , son altamente modulados por neuroesteroides (Bianchi y Macdonald, 2003). Además, los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ , al igual que los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_4$ , son insensibles a benzodiazepinas o fármacos que ejerzan sus efectos a través del sitio de unión a éstas (Lüddens et al., 1990; Sieghart, 1995). Los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  pueden ser modulados positivamente por fármacos de la familia de las imidazo-benzodiazepinas (Ro 15-4513 y Ro 15-1788) (Korpi et al., 2007; Ramerstorfer et al., 2010), así como por algunas  $\beta$ -carbolinas (Ramerstorfer et al., 2011; Sieghart, 1995) o por la flavona hispidulina (Chiou et al., 2018; Kavvadias et al., 2004). Además, otros moduladores alostéricos positivos (MAPs) del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  como loreclezol y etomidato son capaces de modular la función de este receptor. Sin embargo, estos fármacos presentan afinidad por otros receptores GABA<sub>A</sub> como  $\alpha_1\beta\gamma_2$  y  $\alpha_5\beta\gamma_2$  (Belelli et al., 1997; Wafford et al., 1994). Recientemente, las pirazoloquinolinonas como PZ-II-029, LAU159, LAU463 han mostrado una afinidad alta por el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  actuando entre las subunidades  $\alpha_6^+$  y  $\beta_{2/3}^-$  del receptor GABA<sub>A</sub> (Sieghart et al.,

---

2022). Asimismo, existen antagonistas para el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  como los diuréticos de asa amilorida (Fisher, 2002) y furosemida (Hadingham et al., 1996; Korpi y Lüddens, 1997; Korpi et al., 1995).

## 2.5. Función del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ en el sistema nervioso

El receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  está expresado en las células granulares del cerebelo y desempeña una inhibición tónica (Gutierrez et al., 1996; Laurie et al., 1992; Persohn et al., 1992; Pirker et al., 2000). La inhibición tónica que ejercen los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  reduce la actividad de las células granulares. El funcionamiento correcto de los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en el cerebelo es esencial, debido a que la sobreestimulación en esta área provoca la desincronización de las células granulares que induce alteraciones en la coordinación motora (D'Mello y Stoodley, 2015). Las alteraciones estructurales y funcionales que ocurren en el cerebelo se han asociado con diversas patologías como el desorden del espectro autista, esquizofrenia y dislexia, entre otras (Parker et al., 2013; Person y Raman, 2012; Peters et al., 2016; Shevelkin et al., 2014). La participación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en estas patologías se puede delimitar fácilmente, debido que los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  desempeñan un papel importante en la función cerebelar. Por lo tanto, el funcionamiento inadecuado del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  no solo resulta en problemas motores sino también en el desarrollo de desórdenes neuropsiquiátricos. En este sentido, la disminución de la corriente tónica mediada por el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  aumentó la frecuencia de disparo de las neuronas de Purkinje en un modelo de síndrome de Angelman, el cual es un desorden del neurodesarrollo causado por la pérdida de la función del gen UBE3A y caracterizado por disfunción motora (Egawa et al., 2012). Además, la activación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  mediante la administración de THIP (gabaxol) redujo el tremor (sincronización rítmica de los potenciales de acción) inducido por la neurotoxina harmalina. De manera interesante, la



---

administración intracerebroventricular de furosemida (antagonista GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ ) previno el efecto del THIP sobre la conducta de tremor en ratones (Handforth et al., 2018; Huang et al., 2021). Por otra parte, la administración de PZ-II-029 (MAP del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ ) redujo el desorden motor que se presenta en diferentes patologías como el síndrome de Tourette. Asimismo, el silenciamiento de la subunidad  $\alpha_6$  redujo la inhibición tónica e incrementó la excitabilidad neuronal en áreas cerebrales relacionadas con procesos cognitivos, de ansiedad, déficit social y la respuesta al estrés (Rudolph et al., 2020).

Finalmente, la activación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  a través de la administración de PZ-II-029 restauró la inhibición prepulso que se pierde en un modelo de esquizofrenia; efecto que se previno por la administración de furosemida. Lo anterior sugiere que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  puede ser un blanco terapéutico para tratar la esquizofrenia (Chiou et al., 2018). En conjunto, todos estos trabajos muestran que los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  desempeñan un papel importante dentro del SNC a través de reducir la excitabilidad neuronal presente en diversas patológicas.

## **2.6. Participación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ en la nocicepción**

El sistema GABAérgico desempeña un papel importante en el procesamiento de la información nociceptiva. Además, después de un insulto al sistema sensorial hay una disminución en el control inhibitorio mediado por los receptores GABA<sub>A</sub>. Diversos estudios han demostrado que los receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos participan de manera importante durante el dolor crónico (De la Luz-Cuellar et al., 2019; Fan et al., 2018; Farrant y Nusser, 2005; Franco-Enzástiga et al., 2021; Hernández-Reyes et al., 2019; Iura et al., 2016; Loeza-Alcocer et al., 2013; Tzeng et al., 2021). Lo anterior abre la posibilidad de considerar a los receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos como un blanco farmacológico para el tratamiento del dolor crónico. Sin embargo, los únicos

---

estudios que han reportado la participación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en el dolor se han realizado en el sistema del nervio trigémino. En este sentido, la administración de un ARN de interferencia pequeño (siRNA, por sus siglas en inglés) contra el gen *Gabra6* incrementó las conductas nociceptivas inducidas por la ligadura del tendón masetero superficial y CFA (Kramer y Bellinger, 2014). Asimismo, la reducción en la expresión y función de los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  incrementó la expresión de p-ERK, un marcador de excitabilidad neuronal, lo que se correlacionó con el aumento de la excitabilidad de las neuronas sensoriales del ganglio del trigémino (Kramer y Bellinger, 2013; Puri et al., 2012). Por otra parte, se ha reportado que la administración de PZ-II-029 (MAP del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ ) redujo las conductas nociceptivas inducidas por la constricción crónica del nervio infraorbital en ratas (Vasović et al., 2019). Además, la administración de DK-I-56-1, un MAP del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ , redujo las conductas de dolor espontáneo que se presentan después del daño al nervio del trigémino (Tzeng et al., 2021). Recientemente, datos de nuestro laboratorio han demostrado que la activación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  redujo la alodinia táctil observada en un modelo de dolor tipo fibromialgia en ratas hembra (Gutiérrez-Agredano, 2022). Todos los estudios mencionados anteriormente sugieren que los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  son necesarios para inhibir la excitabilidad presente en las fibras sensoriales del sistema trigeminal después de un daño al tejido.

Hasta el momento no se ha estudiado si los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  pueden tener una participación importante en el procesamiento de la información nociceptiva a nivel espinal o en los ganglios de la raíz dorsal. Se ha reportado que la expresión de los receptores GABA<sub>A</sub> que contienen la subunidad  $\delta$  disminuye después de la constricción crónica del nervio ciático (Iura et al., 2016); lo anterior permite sugerir que la corriente tónica mediada por los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  pudiera estar reducida bajo condiciones de dolor crónico.

## **2.7. La influencia del sexo en la percepción del dolor**

Diversos estudios muestran que las mujeres tienen una mayor sensibilidad a los estímulos nocivos como la presión mecánica, los estímulos térmicos y eléctricos comparado con los hombres (Fillingim et al., 2009; Greenspan et al., 2007; Lautenbacher y Rollman, 1993; Moulton et al., 2006; Patil y Belugin et al., 2019; Paulson et al., 1998), lo que está directamente relacionado con un menor umbral de dolor en las mujeres (Riley et al., 1998; Rolke et al., 2006). La aplicación de un estímulo nocivo, en mujeres, indujo la activación de la corteza cerebral; mientras que el mismo estímulo, en hombres, activó la corteza anterior del cíngulo (Moulton et al., 2006; Paulson et al., 1998). Estos estudios muestran que la percepción del dolor involucra áreas cerebrales diferentes en hombres y mujeres.

Algunos padecimientos de dolor crónico como el dolor de espalda baja, el dolor musculoesquelético (fibromialgia), el dolor neuropático, el dolor osteo-articular y la migraña tienen una mayor prevalencia en mujeres que en hombres (Bartley y Fillingim, 2013; Fillingim et al., 2009; Mogil y Bailey, 2010; Tsang et al., 2008). En este sentido, la migraña y el síndrome temporomandibular se presentan principalmente en la pubertad y disminuyen durante la menopausia, lo que sugiere que las hormonas sexuales femeninas tienen una participación importante en la fisiopatología de estas enfermedades (Avona et al., 2019; Boerner y Keogh, 2021). A pesar que, los factores anatómicos, genéticos, psicológicos y sociales son importantes en las diferencias sexuales durante la percepción del dolor, los principales mecanismos que se han propuesto que subyacen a estas diferencias son: 1) la participación de células del sistema inmune y 2) la acción de las hormonas gonadales (Aloisi, 2003; Pieretti et al., 2016; Sorge et al., 2015).

Se ha descrito que la hipersensibilidad mecánica en ratones hembra y macho está determinada por distintos tipos de células inmunes (Sorge et al., 2011,

2015). La activación de la microglía, a través del receptor TLR4, induce el desarrollo de alodinia mecánica en ratones macho, pero no en hembras (Sorge et al., 2011). Además, la administración de minociclina redujo la alodinia táctil en ratones macho a través de reducir la liberación de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) y factores tróficos como BDNF derivados de la microglía (Kuzanwinska et al., 2014). En contraste, en los ratones hembra el desarrollo de alodinia táctil esta mediado por la activación de los linfocitos T (Sorge et al., 2015). Un estudio clínico demostró un aumento en el número de linfocitos T y B en mujeres, pero no en hombres (Abdullah et al., 2012). Por su parte, el daño a los nervios espinales aumentó la proliferación de células gliales durante los primeros días después la lesión en ratas macho, pero no en ratas hembra (Vacca et al., 2016).

A pesar que todas las hormonas gonadales están presentes en ambos sexos, los andrógenos son un grupo de hormonas consideradas masculinas; mientras que los estrógenos y progestágenos son consideradas hormonas femeninas (Maurer et al., 2016). Las hormonas gonadales son moléculas esteroideas sintetizadas principalmente en los órganos reproductivos y en la glándula adrenal a partir del colesterol (Maurer et al., 2016; Vardanyan y Hruby, 2016). Las hormonas gonadales tienen un papel importante en el desarrollo intrauterino, posnatal, neonatal, infantil y juvenil, así como en la fertilidad de ambos sexos (Maurer et al., 2016; Vardanyan y Hruby, 2016). A pesar que el mecanismo de acción canónico de las hormonas esteroideas es nuclear; estas hormonas pueden regular diferentes sistemas incluyendo el sistema nervioso central y periférico (Brinton y Nilsen, 2001; Chen et al., 2021)

El estradiol tiene efectos inhibitorios y excitadores dentro del SNC (McEwen et al., 1995; Woolley y Schwartzkroin, 1998). Se sabe que, el estradiol puede modular la vía del dolor a través de su interacción con el sistema GABAérgico (Kelly et al., 1992; Saleh y Saleh, 2001; Shughrue y Merchenthaler, 2000). En

este sentido, el estradiol aumentó la liberación de GABA a través de incrementar la actividad de la enzima GAD en neuronas del núcleo parabraquial (Saleh y Saleh, 2001). Además, la administración exógena de estradiol aumentó la expresión y afinidad de los receptores GABA en neuronas del hipocampo (Kelly et al., 1992; Shughrue y Merchenthaler, 2000). A nivel periférico, los cambios en las concentraciones plasmáticas de estrógenos están acompañados por cambios en las concentraciones de algunos neurotransmisores como la 5-HT, la acetilcolina, la dopamina y las  $\beta$ -endorfinas, los cuales tienen una participación importante en el procesamiento del dolor (Aloisi, 2003; Marcus, 1995; Silberstein, 2001).

Finalmente, se ha demostrado que los estímulos nocivos se perciben con mayor intensidad en mujeres con baja concentración de estrógenos o durante la menopausia, etapa que se caracteriza por una disminución en la producción de las hormonas esteroideas (LeResche et al., 2003; Riley et al., 1999). A nivel preclínico, la reducción de las hormonas sexuales femeninas, mediante ovariectomía, disminuyó en mayor medida el umbral mecánico y térmico de ratas hembra comparado ratas hembras sin ovariectomía (DeLeo y Rutkowski, 2000; Garrido-Suárez et al., 2015; Hernández-León et al., 2018; Li et al., 2014; Pajot et al., 2003; Vacca et al., 2016). Además, el efecto analgésico de los opioides o los antiinflamatorios no-esteroides fue mayor en ratones macho comparado con hembras en modelos de dolor inflamatorio y visceral (Sorge et al., 2011; Wang et al., 2016). Lo anterior se relaciona con reportes que demuestran que las mujeres requieren una dosis mayor de morfina para aliviar el dolor crónico (Bijur et al., 2008; Cepeda y Carr, 2003).



### 3. Justificación

El dolor neuropático es una patología que afecta a millones de personas alrededor del mundo. Actualmente, el tratamiento farmacológico para el dolor neuropático no es efectivo debido a la alta prevalencia de efectos adversos. Es ampliamente reconocido que el dolor neuropático afecta el sistema GABAérgico, es decir su capacidad para reducir el dolor se ve disminuida. Particularmente, los receptores GABA<sub>A</sub> tienen un papel importante en la modulación de las conductas nociceptivas que se observan en modelos de dolor neuropático. Recientemente, los receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos han surgido como un blanco importante para tratar los síntomas de alodinia e hiperalgesia que se presentan después del daño al sistema sensorial. Sin embargo, se desconoce si el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  está involucrado en el desarrollo y mantenimiento de las conductas nociceptivas en el dolor neuropático. Por tal motivo, demostrar la participación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en el dolor neuropático podría representar una nueva alternativa terapéutica para tratar este padecimiento que aqueja a la población mundial.

#### 4. Hipótesis

El receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  localizado en las terminales centrales de las aferentes primarias y en las neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal desempeña un papel antinociceptivo durante el dolor neuropático.

#### 5. Objetivo general

Investigar la participación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en condiciones fisiológicas y en un modelo de dolor neuropático.

#### 6. Objetivos particulares

- ❖ Determinar la participación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en el procesamiento de la información nociceptiva en condiciones fisiológicas en ratas hembra y macho.
- ❖ Determinar la localización celular de los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en sitios relevantes para el procesamiento de la información nociceptiva en ratas hembra y macho.
- ❖ Determinar si el daño a los nervios espinales induce cambios en la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en ratas hembra.
- ❖ Evaluar, mediante MAPs, la participación de los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en las conductas nociceptivas inducidas por el daño a los nervios espinales en la rata hembra.
- ❖ Determinar si el efecto antinociceptivo de los MAPs del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  depende de la especie y el sexo.
- ❖ Evaluar el efecto de la restitución proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en las conductas nociceptivas inducidas por el daño a los nervios espinales en la rata.



- ❖ Determinar la localización celular de los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en sitios relevantes para el procesamiento de la información nociceptiva en tejido de humanos.



## **7. Materiales y métodos**

### **7.1. Animales**

Se utilizaron ratas Wistar macho y hembra de 6 a 7 semanas de edad con un peso corporal inicial de 140-160 g y, ratones Swiss Webster macho y hembra de 10 semanas de edad con un peso corporal inicial de 25-30 g. Todos los animales se alojaron en cajas de acrílico (44 cm ancho x 33 cm largo x 20 cm alto) bajo condiciones de temperatura (22 °C) y humedad relativa controladas (50% humedad) con ciclos de luz-oscuridad 12:12 horas con libre acceso a agua y alimento. Los animales fueron proporcionados por nuestras instalaciones o por los laboratorios Charles River. Los animales proporcionados por los laboratorios Charles River se utilizaron 1 semana después de arribar a las instalaciones de la Universidad de Texas en Dallas. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con lo establecido por la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-069-ZOO-1999). La guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América (NIH, por sus siglas en inglés) y siguiendo los lineamientos sobre aspectos éticos para la investigación de dolor experimental en animales (Zimmermann, 1983). El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Cinvestav (CICUAL, protocolo No. 0042-13) y la Universidad de Texas en Dallas. Cada animal se utilizó dos veces y se sacrificó en una cámara saturada con CO<sub>2</sub> al final de cada experimento.

### **7.2. Neuropatía periférica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6**

Para la inducción de la neuropatía periférica, los animales se prepararon de acuerdo con lo previamente descrito por Kim y Chung en 1992. De manera breve, los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (50 mg/kg,

i.p.) y xilacina (10 mg/kg, i.p.). Posteriormente, los nervios espinales izquierdos L5-L6 (para la rata) y L4-L5 (para el ratón) fueron expuestos y ligados con sutura de seda de 6-0 en una región distal al ganglio de la raíz dorsal (GRD). Para los animales falsamente operados (*Sham*), los nervios espinales fueron expuestos, pero no ligados. Los animales que presentaron alguna deficiencia motora fueron descartados del estudio (Kim y Chung, 1992).

### **7.3. Evaluación de las conductas nociceptivas**

#### **7.3.1. Evaluación del umbral de retiro de la pata**

Los animales se colocaron de forma individual en cajas de acrílico transparente sobre una malla metálica durante 25 min (para la rata) o 40 min (para el ratón). Los animales se estimularon en la parte media de la pata posterior con los filamentos de von Frey (Stoeling co, IL). El 50% del umbral de retiro se determinó empleando el método de *up-down* (Chaplan et al., 1994). La prueba consistió en estimular durante 5-8 segundos la parte media de la superficie plantar. Una respuesta positiva se consideró cuando el animal retiró la pata y se registró con "X"; mientras que una respuesta negativa consistió cuando el animal no retiró la pata y se registró con "0". A partir del primer cambio en la respuesta, se realizaron 4 o 3 evaluaciones adicionales para obtener seis o cinco mediciones registradas, para la rata o el ratón, respectivamente. Con estos valores y el valor del último filamento utilizado se calculó el 50% del umbral de retiro empleando la siguiente fórmula:

$$50\% \text{ Threshold (g)} = (10^{[X_f + k\delta]})/10,000$$

Donde  $X_f$  es el valor del último filamento de von Frey utilizado (unidades logarítmicas);  $k$  es el factor de corrección basado en los patrones de respuesta de la tabla de calibración y el valor tabulado con base al número de respuestas positivas y negativas; y  $\delta$  se refiere a las diferencias de promedio entre estímulos (unidades logarítmicas) (Chaplan et al., 1994; Dixon, 1980). En animales naïve, el 50% del umbral de retiro se encuentra entre 11.98-15 g

(para la rata) y 1.2-1.5 g (para el ratón). La presencia de alodinia táctil se consideró cuando el 50% del umbral del retiro fue menor a 4 g (para la rata) o 0.2 g (para el ratón).

### **7.3.2. Evaluación del umbral de presión muscular**

El umbral de presión muscular se determinó de acuerdo a lo reportado previamente (De la Luz-Cuellar et al., 2019). De manera breve, las ratas se inmovilizaron y la pata posterior izquierda se colocó en el equipo de Randall-Sellito para aplicar una fuerza mecánica que incrementó de manera lineal (máximo 250 g) sobre el músculo gastrocnemio. La respuesta se midió como la presión en gramos necesaria para que la rata retirara la extremidad o vocalizara. Cada prueba se repitió tres veces con intervalos de 1 minuto entre cada estímulo. El promedio del umbral de presión muscular se calculó con base en las tres mediciones realizadas.

## **7.4. Evaluación de las conductas nociceptivas espontáneas**

### **7.4.1. Sacudidas espontáneas y levantamientos verticales**

Las conductas nociceptivas espontáneas en las ratas con dolor neuropático experimental se evaluaron sin intervención del experimentador. De manera general, los animales se colocaron de forma individual en cilindros de acrílico sin previa habituación. Durante los primeros 5 minutos se contabilizó el número de levantamientos verticales que realizó cada animal. Se consideró un levantamiento vertical positivo cuando el animal colocó ambas patas posteriores de manera similar sobre el piso del cilindro, mientras que un levantamiento vertical negativo consistió cuando el animal no colocó las patas traseras de manera similar. Posteriormente, se contabilizó el número de movimientos espontáneos (sacudidas) en la extremidad posterior lesionada durante 30 minutos (Alsalem et al., 2020; Mogil et al., 2010).

### **7.5. Determinación de la expresión del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ por *Western blot***

Los animales se anestesiaron con isoflurano, se sacrificaron por decapitación y se extrajo la parte lumbar dorsal de la médula espinal (L1-S1) y los GRD lesionados (L5-L6). El tejido se homogenizó con 400  $\mu$ l de *buffer* de lisis que contenía Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tritón 100-X 1%, desoxicolato de sodio 5%, SDS 0.1% e inhibidores de proteasas (Complete™, Cat. No. 4693132001, Sigma-Aldrich, MO). Posteriormente, el tejido se centrifugó a 1400 rpm a 4 °C durante 10 minutos para remover los restos celulares. El sobrenadante se recolectó y almacenó a -70 °C hasta la cuantificación de las proteínas totales. La concentración de las proteínas totales se determinó por el método de Bradford de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Quick Start Bradford Protein Assay, Cat. No. 5000203, Bio-Rad, CA) (Bradford, 1976). Se tomaron volúmenes equivalentes a 50  $\mu$ g de proteína total y se separaron por electroforesis (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida de dos dimensiones al 10% durante 90 minutos a 120 volts. Las proteínas se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF, Cat. No. IPFL00010, Millipore Sigma, MA) durante 90 minutos a 70 volts. Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche libre en grasa al 3% disuelta en solución amortiguadora de Tris (TBS) que contenía Tween-20 al 0.1% durante 80 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 2 veces con TBS-T durante 5 minutos antes de la incubación con el anticuerpo primario anti-GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  (1:300, Cat. No. G5544, Sigma Aldrich, MO). El anticuerpo anti-GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  se incubó durante toda la noche a 4 °C. Para la inmunodetección del anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a una peroxidasa de rábano (anti-rabbit, 1:5000, Cat. No. 11-035-033, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., PA). La señal de la proteína se detectó utilizando *Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate* (Cat. No. WBKLS0500, Sigma-Aldrich, MO) y se obtuvo una imagen fotográfica utilizando el ChemiDoc™

XRS+ ImagingSystem (Bio-Rad, CA). Las membranas se colocaron en el *buffer de stripping* (Restore Western Blot Stripping buffer, Cat. No. 21059, ThermoFisher Scientific, MA) y se reincubaron con anticuerpo anti- $\beta$ -actina (1:10000, Cat. No. GT5512, GeneTex, CA). La  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga interno para normalizar los niveles de expresión de la proteína del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha$ <sub>6</sub>. El análisis densitométrico de las bandas se realizó utilizando el software Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad, CA). La especificidad del anti-GABA<sub>A</sub>- $\alpha$ <sub>6</sub> se determinó empleando un ARN de interferencia pequeño (siRNA, por sus siglas en inglés), adicionando un anticuerpo inmunizante (Cat No. Ab171870, Abcam, UK) o la remoción del anticuerpo primario. Todos los análisis de *western blot* se realizaron en grupos independientes de animales.

## **7.6. Inmunohistoquímica**

Los animales se anestesiaron con isoflurano y se sacrificaron por decapitación. La parte lumbar dorsal de la médula espinal y los GRD se disectaron y sumergieron en crio-moldes que contenían medio de congelación (O.C.T. Tissue-Teck, Cat. No. 4583, Sakura Finetek Inc., CA). Posteriormente, el tejido se colocó sobre hielo seco hasta su congelamiento. Los protocolos para el manejo y obtención del tejido de humano fueron aprobados por la junta de revisión institucional de la Universidad de Texas en Dallas en colaboración con el *Southwest Transplant Alliance*. La médula espinal lumbar de humano se obtuvo de donadores de órganos o pacientes con diagnóstico de muerte cerebral dentro de las primeras 4 horas después del fallecimiento. Los datos demográficos de los donadores se proporcionan en la Tabla 4. El tejido de humano se recolectó, congeló y almacenó a -80 °C hasta su uso. El tejido de humano se embebió gradualmente aplicando volúmenes pequeños de medio de congelación para evitar el daño al tejido. Los tejidos se seccionaron de manera aleatoria con ayuda de un criostato (Leica CM1950, Leica Biosystems, Alemania). Las secciones se recolectaron en laminillas de vidrio cargadas positivamente, las cuales permanecieron a -20 °C durante toda la sesión de

recolección de tejido. Posteriormente, los tejidos se colocaron en formalina al 10%, a un pH 7.4, durante 15 minutos y se deshidrataron a través de un gradiente de alcohol etílico (50%, 5 minutos; 70%, 5 minutos y 100% 10 minutos) a temperatura ambiente. Los tejidos se secaron a temperatura ambiente y el área de interés se delimitó con ayuda de un plumón hidrofóbico (PAP pen Cat. No. H-400, Vector Labs, CA). Los tejidos se incubaron en solución de bloqueo (suero normal de cabra al 3%, Tritón 100-X al 0.003% disuelto en buffer de fosfatos (PB) al 0.1M) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después, los tejidos se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C en condiciones de luz y humedad controladas (Tabla 5). Al día siguiente se realizaron tres lavados de 5 minutos con PB al 0.1M y los tejidos se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios (1:2000) más DAPI (1:5000, Cat. No. 14285, Cayman Chemical, MI), ver Tabla 5, diluidos en solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. El tejido de humano se cubrió con *TrueBlack* durante 1 minuto (disuelto en etanol al 70%, Cat. No. 23014, Biotium, CA), con el propósito de evitar la autofluorescencia de la lipofuscina. Transcurrido el tiempo todas las laminillas se lavaron con PB al 0.1M. Finalmente, los tejidos se cubrieron con medio de montaje ProLong Gold Antifade (Cat. No. P36930, ThermoFisher Scientific, MA).

**Tabla 4. Información demográfica de los donadores**

Donante	Médula espinal	Sexo	Edad	Causa de muerte	Historia médica
1	Lumbar	Masculino	19	Hipoxia/sobredosis	Ansiedad y depresión
2	Lumbar	Masculino	27	Hemorragia intracerebral; tumor cerebral	Dolores de cabeza y convulsiones; Glioblastoma
3	Lumbar	Femenino	29	Hipoxia/sobredosis	Convulsiones, Trastorno bipolar y depresión



**Tabla 5. Lista de anticuerpos utilizados para los ensayos de inmunohistoquímica**

Anticuerpo	Proveedor	Cat. No.	Dilution/Conc.
Mouse-anti-CGRP	Novus Biologicals	NBP2-88945	1:100
Mouse-anti-GFAP	NeuroMab	75-240	2.5 µg/ml
Mouse-anti-IB4 conjugated Alexa 568	ThermoFisher	I21412	1:500
Mouse-anti-NeuN	Millipore	MAB377	10 µg/ml
Mouse-anti-P2X3	Santa Cruz	sc-390572	5 µg/ml
Rabbit-anti- $\alpha_6$ -GABA <sub>A</sub> R	Sigma-Aldrich	G5544	5 µg/ml
Guinea Pig-anti-TRPV1	Neuromics	GP14100	1:500
Goat-anti-guinea pig H&L 568	ThermoFisher	A11075	1:2000
Goat-anti-mouse IgG1 488	ThermoFisher	A21121	1:2000
Goat-anti-rabbit H&L 555	ThermoFisher	A21428	1:2000
Goat-anti-rabbit H&L 647	ThermoFisher	A21245	1:2000

CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina; Conc (concentración); GFAP (proteína ácida fibrilar glial); IB4 (isolectina B4); NeuN (proteína nuclear neuronal); P2X<sub>3</sub> (receptor purinérgico X<sub>3</sub>); TRPV1 (receptor de potencial transitorio V1).

### 7.7. Análisis de imágenes confocal

Todas las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal (FluoView 1200, Olympus, Japan) con los objetivos de 10x y 20x. Se adquirió una imagen XY de la parte lumbar dorsal de la médula espinal, 3-4 secciones fueron analizadas por animal (~12 imágenes por experimento para una n=3). Las secciones que presentaron algún plegamiento o daño en el tejido fueron descartadas del estudio. Todas las imágenes fueron adquiridas siguiendo los

parámetros de adquisición proporcionados por Olympus: ganancia predeterminada, 1 Hz, HV  $\leq$  600, *offset* = 4, la potencia del láser  $\leq$  10% y la apertura de la lente predeterminada. La intensidad de fluorescencia entre los grupos experimentales se determinó mediante el método de fluorescencia celular total corregida (CTCF, por sus siglas en inglés) utilizando el *software Image J*. Los parámetros de densidad integrada, área total seleccionada y el ruido de fondo fueron adquiridos y empleados para calcular el CTCF: densidad integrada – (área seleccionada x promedio del ruido de fondo). Los valores de CTCF de cada grupo experimental se normalizaron contra el grupo *Sham* y expresado como CTCF normalizado. El porcentaje de colocación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  se cuantificó a través del coeficiente de Mander. Todas las imágenes se contrastaron utilizando el *software Olympus CellSens* (v1.18).

### **7.8. Administración intratecal *in vivo***

La administración intratecal se realizó en ratas y ratones anestesiados con isoflurano al 2.5%. Los animales se colocaron en posición de prono y una jeringa conectada a una aguja calibre 30 G (0.30 mm de diámetro) se colocó entre las vértebras L4-L5. El acceso al espacio subaracnoideo se confirmó por la presencia del reflejo de sacudida de la cola. Las ratas recibieron un volumen total de 10  $\mu$ l, mientras que los ratones un volumen total de 5  $\mu$ l.

### **7.9. Silenciamiento del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$**

El silenciamiento del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  se realizó a través de la administración intratecal de un ARN de interferencia pequeño (siRNA, por sus siglas en inglés) dirigido contra el gen *Gabra6*. El esquema de administración se basó en trabajos previos (Njoo et al., 2014; Salinas-Abarca et al., 2018). La preparación del siRNA se llevó a cabo inmediatamente antes de su administración de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El siRNA *Gabra6* (ID de ensayo: s132065, ThermoFisher Scientific, MA) y el siRNA control (Cat. No. 4390846, ThermoFisher Scientific, MA) se reconstituyeron en

agua libre de RNAsas bajo condiciones estériles. Posteriormente, los siRNAs se mezclaron con reactivo de transfección (Cat. No. 11668019, ThermoFisher Scientific, MA) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, los siRNAs se administraron vía intratecal en un volumen de 10  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ $\mu$ l de siRNA). El procedimiento se repitió hasta obtener un esquema de 1  $\mu$ g de siRNA cada 24 horas durante 3 días consecutivos. La expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha$ <sub>6</sub> se evaluó al día 3 y 6 después de la primera administración del siRNA con el objetivo de correlacionar la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha$ <sub>6</sub> con las conductas nociceptivas.

#### **7.10. Transfección del plásmido *Gabra6* in vivo**

Para la amplificación del plásmido se transformaron bacterias *E. Coli* con 10 ng del plásmido *Gabra6* (Cat. No. RR207696, OriGene, MD) o el plásmido control *cDNA3* (Cat. No. V79020, ThermoFisher Scientific, MA) a través de choque térmico. Posteriormente, las bacterias se re-suspendieron en medio SOC (Cat. No. 15544034, Invitrogen, MA) a 37 °C con agitación constante durante 1 hora. Las bacterias se cultivaron en placas de agar con medio Luria-Bertani suplementado con kanamicina 25  $\mu$ g/ml (para el gen *Gabra6*) o ampicilina 100  $\mu$ g/ml (para el gen *cDNA3*) durante 24 horas a 37 °C. Al día siguiente, dos colonias de bacterias transformadas fueron aisladas y crecidas en medio Luria-Bertani durante 16 horas a 37 °C. Los plásmidos fueron aislados y purificados utilizando el método *maxiprep* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza y la concentración de los plásmidos se determinaron mediante espectrofotometría utilizando un NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, MA). La expresión transitoria del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha$ <sub>6</sub> *in vivo* se realizó de acuerdo a lo previamente descrito (García et al., 2021). De manera breve, se mezclaron 5  $\mu$ g del plásmido *Gabra6* o *cDNA3* con lipofectamina 2000 (Cat. No. 11668019, Invitrogene, MA) y administraron vía intratecal cada 24 horas durante 3 días consecutivos. La eficacia del plásmido

*Gabra6* se determinó a través de la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  24 horas después de la última administración.

### 7.11. Fármacos

Ro 15-4513 (Cat. No. 6192) y PZ-II-029 (Cat. No. 1997), moduladores alostéricos positivos del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  fueron obtenidos de *Tocris Bioscience* (Bristol, ING). Los fármacos se disolvieron en 30% de dimetil sulfoxido (DMSO 30%). La furosemida, antagonista del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  se obtuvo de Sigma Aldrich (St. Louis, MO) y se disolvió en DMSO. Los anestésicos ketamina y xilacina se obtuvieron de PiSA Farmacéutica (Guadalajara, Jal). Las dosis de los fármacos utilizados en este estudio se eligieron a partir de ensayos preliminares realizados en nuestro laboratorio.

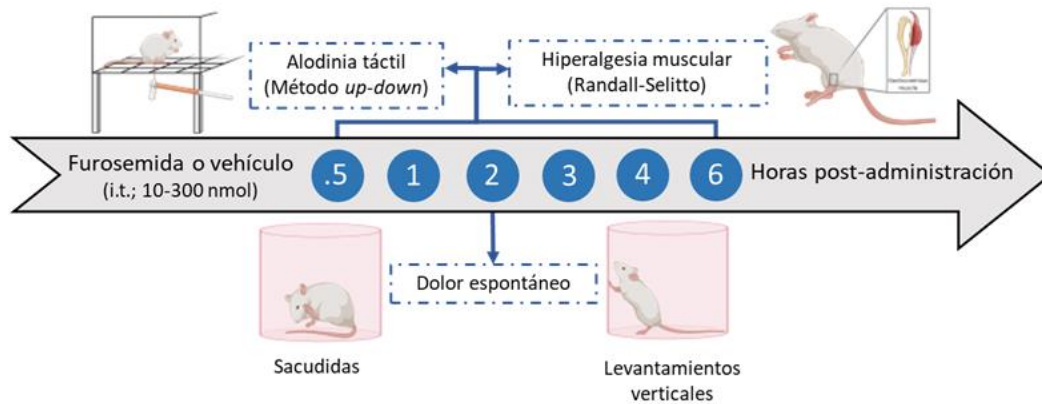
### 7.12. Análisis estadístico

Todos los ensayos farmacológicos se realizaron a ciego simple. Los resultados se muestran como diagramas XY o de cajas (donde se muestra la media, los cuartiles y los valores mínimos y máximos dentro del grupo). Los resultados obtenidos mediante *western blot* se muestran como la media  $\pm$  el error estándar de la media. Para las conductas nociceptivas de alodinia táctil e hiperalgesia muscular, las diferencias entre grupos experimentales se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido de una prueba *post-hoc* de Tukey. Las conductas de dolor espontáneo (levantamientos verticales y sacudidas espontáneas) y los análisis de *western blot* e inmunohistoquímica se analizaron mediante una ANOVA de una vía seguido, de una prueba *post-hoc* de Dunnett. Las diferencias entre sexos se analizaron mediante una ANOVA de tres vías seguido de una prueba *post-hoc* de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *software* SigmaPlot v12.0 (Systat Software Inc, IL); mientras que los gráficos fueron obtenidos empleando el *software* GraphPad Prims 8 (GraphPad Software Inc, CA). Una  $P < 0.05$  se consideró como diferencia significativa.

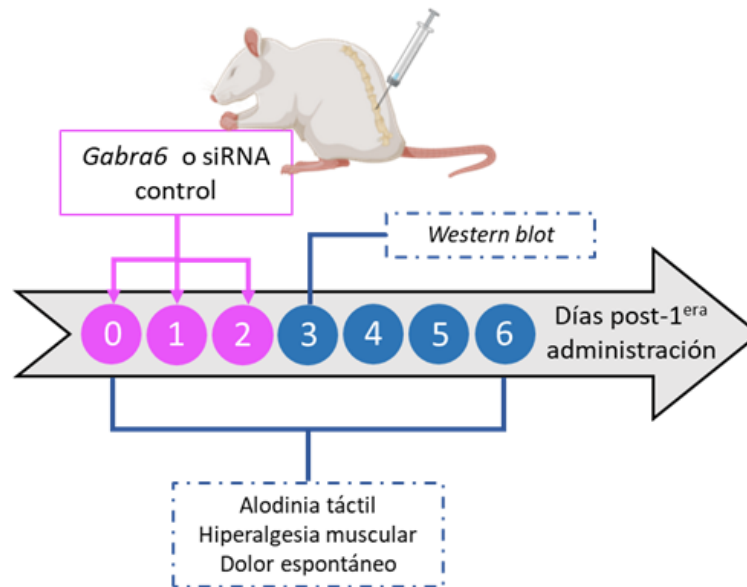
## 8. Diseño experimental

### 8.1. Participación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ en condiciones fisiológicas

Para conocer el papel que desempeña el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en condiciones fisiológicas, se utilizaron ratas hembra naïve que fueron administradas vía intratecal con furosemida (10-300 nmoles), antagonista del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  (Figura 8). El efecto de la furosemida se evaluó sobre el umbral de retiro de la pata y presión muscular, así como las conductas de dolor espontáneo (Figura 8). Con el objetivo de conocer si el efecto pronociceptivo de la furosemida depende del sexo. Grupos independientes de ratas hembra y macho fueron administrados con furosemida (300 nmoles) y se determinó su efecto sobre el umbral de retiro de la pata (Figura 8). Con el propósito de confirmar nuestra aproximación farmacológica, se administró un ARN de interferencia pequeño (siRNA) dirigido contra el gen *Gabra6* vía intratecal durante 3 días consecutivos únicamente en ratas hembra. El efecto del siRNA se evaluó sobre el umbral de retiro de la pata, presión muscular y conductas de dolor espontáneo durante un periodo de 6 días (Figura 9). El silenciamiento del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  se confirmó a través de *western blot* en un grupo independiente de animales 24 horas después de la última administración del siRNA (Figura 9).



**Figura 8. Diseño experimental de la participación del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  en condiciones fisiológicas.** La administración de la furosemida (10-300 nmol) o su vehículo se realizó vía intratecal en ratas hembra intactas. Posteriormente, se determinó el efecto de la furosemida o su vehículo sobre las conductas nociceptivas: 1) umbral de retiro de la pata, 2) umbral de presión muscular y 3) dolor espontáneo (sacudidas y levantamientos verticales) durante 6 horas post-administración. i.t: Administración intratecal.

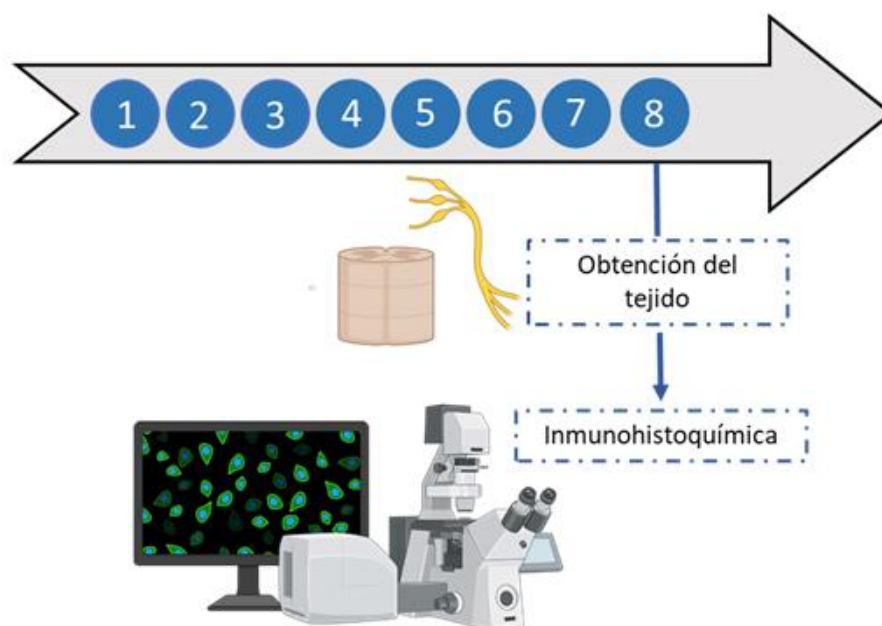


**Figura 9. Diseño experimental del silenciamiento *in vivo* del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  en ratas hembra intactas.** La administración del siRNA *Gabra6* o su siRNA control se realizó vía intratecal en ratas hembras intactas durante 3 días consecutivos. La eficacia del tratamiento con el siRNA *Gabra6* se determinó a través de la medición de la expresión de la subunidad  $\alpha_6$

mediante la técnica de *western blot* 24 horas después de la última administración del siRNA *Gabra6*. Posteriormente, se determinó el efecto de la furosemida o su vehículo sobre las conductas nociceptivas: 1) umbral de retiro de la pata, 2) umbral de presión muscular, y 3) dolor espontáneo (sacudidas y levantamientos verticales) durante 6 días.

## 8.2. Localización celular del receptor $GABA_A-\alpha_6$ en la médula espinal y los ganglios de la raíz dorsal

Con el propósito de conocer la localización celular y distribución del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  en sitios relevantes para el procesamiento de la información nociceptiva, se utilizaron secciones de la médula espinal lumbar y los GRD de ratas naïve hembra y macho y mediante ensayos de inmunohistoquímica se analizó la expresión del receptor  $GABA_A-\alpha_6$ . La localización y distribución celular del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  se determinó a través del uso de diferentes marcadores celulares (Figura 10).



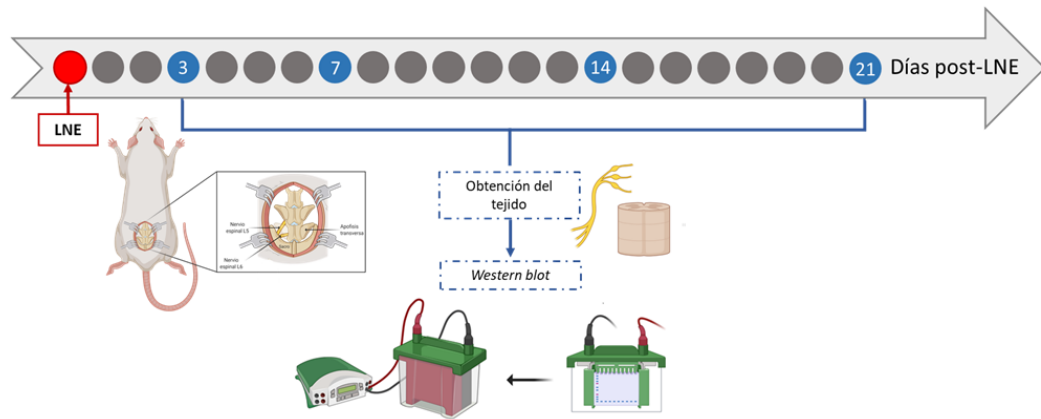
**Figura 10. Diseño experimental del análisis de la expresión proteica del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  mediante microscopía confocal.** Los ensayos de inmunohistoquímica se realizaron en la médula espinal dorsal y en los ganglios de la raíz dorsal de ratas intactas. Posteriormente, los tejidos se procesaron e incubaron con el anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\alpha_6$  del receptor  $GABA_A$  o con anticuerpos específicos para: 1) neuronas peptidérgicas (CGRP), 2) neuronas no peptidérgicas (IB4) y 3) astrocitos (GFAP). Todos los

tejidos se analizaron mediante microscopia confocal. CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina; IB4: isolectina B4; GFAP: proteína ácida fibrilar glial.

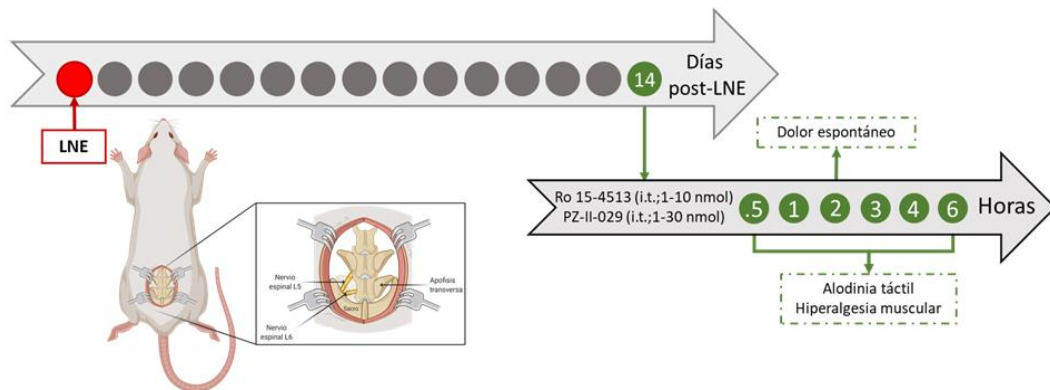
### **8.3. Participación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ en condiciones patológicas**

Una vez elucidada la participación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en condiciones fisiológicas, se evaluó la participación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en condiciones de dolor neuropático. Primeramente, se determinó si el daño a los nervios espinales inducía cambios en la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en la médula espinal dorsal lumbar y en los GRD de animales con dolor neuropático experimental (Figura 11). Posteriormente, se evaluó el efecto de la administración intratecal de diferentes concentraciones de Ro 15-4513 (1-10 nmoles) ó PZ-II-029 (1-30 nmoles) sobre la alodinia táctil, la hiperalgesia muscular y el dolor espontáneo 14 días después del daño a los nervios (Figura 12). Para confirmar la participación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en el efecto antialodínico, se determinó el efecto de la furosemida (antagonista del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ ) sobre el efecto antialodínico de PZ-II-029 (Figura 13). Asimismo, se evaluó el efecto de la administración repetida de PZ-II-029 cada 6 horas durante un periodo de 24 horas. Al término del esquema de administraciones repetidas, los animales fueron sacrificados para determinar el efecto del fármaco sobre la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  (Figura 14).

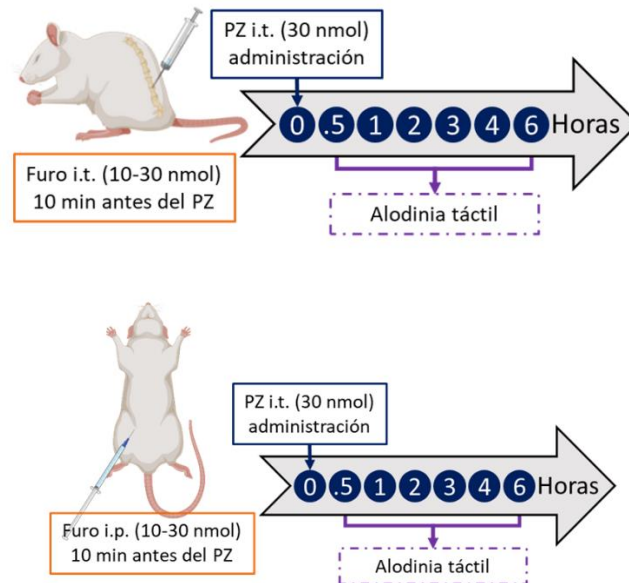




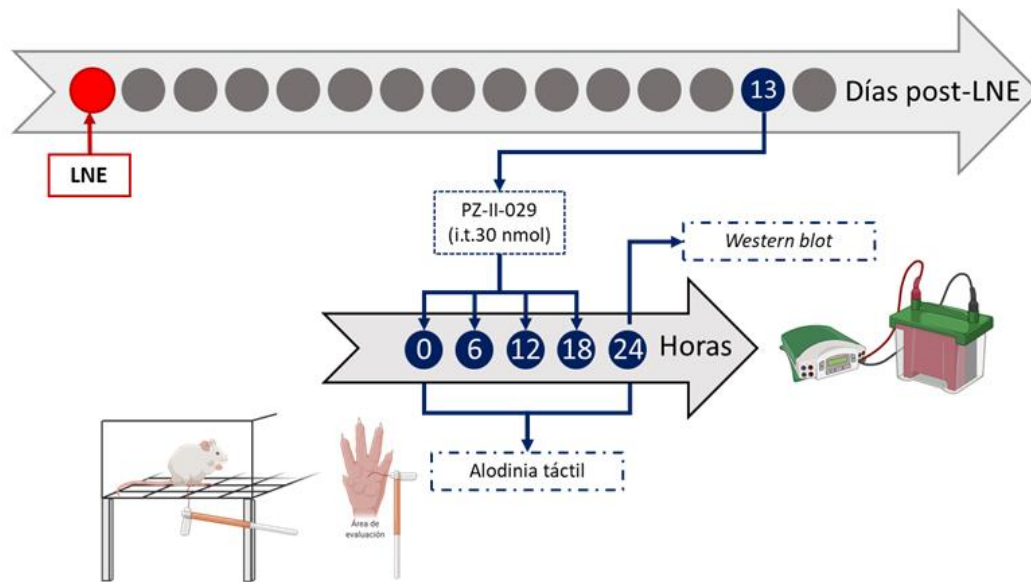
**Figura 11. Diseño experimental del efecto de la lesión a los nervios espinales (LNE) sobre la expresión proteica del receptor  $GABA_A-\alpha_6$ .** El dolor neuropático experimental se indujo mediante la lesión de los nervios espinales L5 y L6. Posteriormente, se realizó un curso temporal de la expresión proteica del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  en los 3, 7 y 14 días post-lesión a los nervios espinales mediante la técnica de western blot. LNE: ligadura de los nervios espinales.



**Figura 12. Diseño experimental del efecto de los moduladores alostéricos positivos del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  en ratas hembra con dolor neuropático.** La administración de los moduladores alostéricos positivos (PZ-II-029 y Ro 15-4513) o sus vehículos se realizó vía intratecal en ratas hembra con dolor neuropático. Posteriormente, se determinó el efecto de PZ-II-029 (1-30 nmol) y Ro 15-4513 (1-10 nmol) o sus vehículos sobre las conductas nociceptivas: 1) umbral de retiro de la pata, 2) umbral de presión muscular y 3) dolor espontáneo (sacudidas y levantamientos verticales) durante 6 horas post-administración. i.t.: Intratecal.



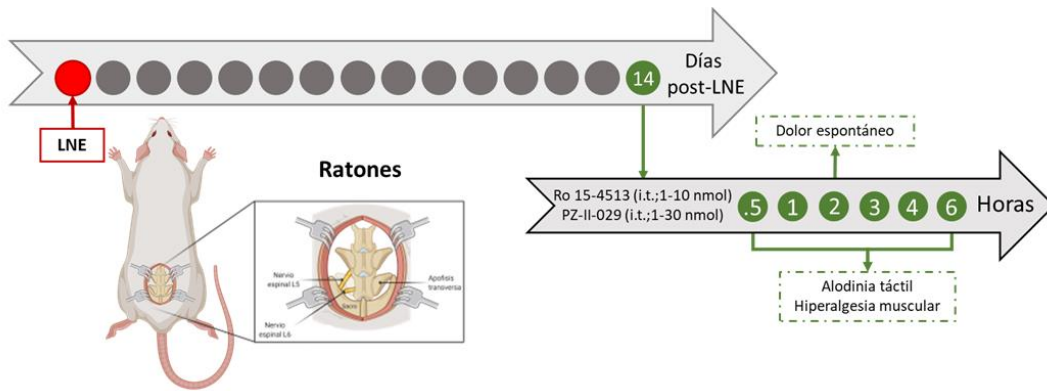
**Figura 13. Diseño experimental del efecto de furosemida sobre el efecto anti-alodínico de PZ-II-029 en ratas hembra con dolor neuropático.** La administración de la furosemida o su vehículo se realizó vía intratecal o intraperitoneal en ratas hembra con dolor neuropático. La administración de la furosemida (30 nmol, i.t. o 10 -30 nmol, i.p.) o su vehículo se realizó 10 minutos antes de la administración intratecal de PZ-II-029 (30 nmol). Posteriormente, se determinó el efecto de la furosemida sobre el efecto antialodínico de PZ-II-029 durante 6 horas post-administración. Furo: Furosemida; i.p.: intraperitoneal; i.t.: Intratecal; PZ: PZ-II-029.



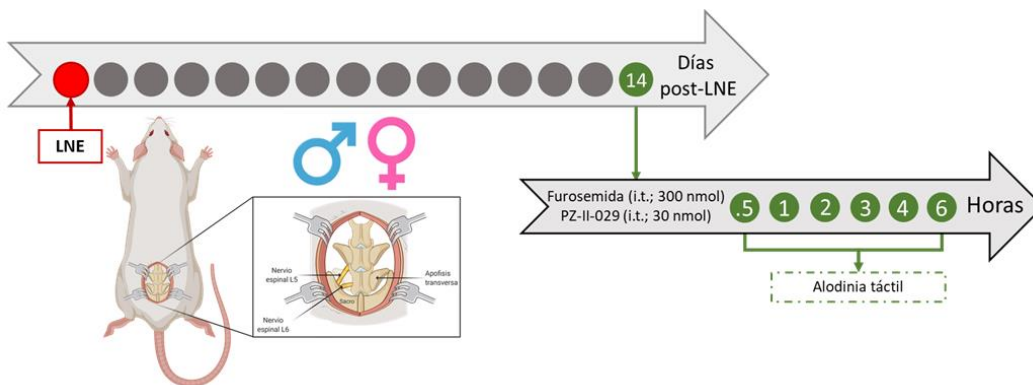
**Figura 14. Diseño experimental de la administración repetida de PZ-II-029 en ratas hembra con dolor neuropático.** La administración de PZ-II-029 o su vehículo se realizó vía intratecal en ratas hembra con dolor neuropático. La administración intratecal repetida de PZ-II-029 (30 nmol) o su vehículo se realizó cada 6 horas durante 24 horas. El efecto antinociceptivo de PZ-II-029 se evaluó 10 minutos antes de cada administración de PZ-II-029. La expresión proteica de la subunidad  $\alpha_6$  del receptor  $GABA_A$  se determinó 6 horas después de la última administración PZ-II-029. i.t.: intratecal; PZ: PZ-II-029.

#### **8.4. Influencia del sexo y especie de los animales en el efecto antinociceptivo de los MAPs del receptor $GABA_A-\alpha_6$**

Con el objetivo de conocer si el efecto antinociceptivo de los moduladores alostéricos positivos del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  depende de la especie, se determinó el efecto de Ro 15-4513 (1-10 nmol, i.t.) y PZ-II-029 (3-30 nmol, i.t.) en ratones con dolor neuropático experimental (Figura 15). Para abordar si el receptor  $GABA_A-\alpha_6$  podría tener una participación dependiente del sexo, se determinó el efecto de la administración intratecal de los moduladores alostéricos positivos (MAPs) del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  en ratas y ratones con dolor neuropático experimental de ambos sexos (Figura 16).



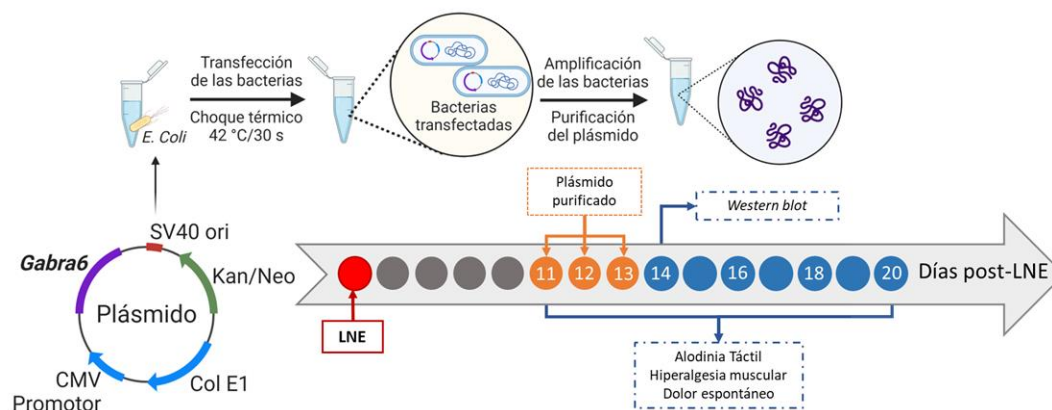
**Figura 15. Diseño experimental del efecto de los moduladores alostéricos positivos del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  en ratones hembra con dolor neuropático.** La administración de los moduladores alostéricos positivos (PZ-II-029 y Ro 15-4513) o sus vehículos se realizó vía intratecal en ratones hembra con dolor neuropático. Posteriormente, se determinó el efecto de PZ-II-029 (3-30 nmol) y Ro 15-4513 (1-10 nmol) o sus vehículos sobre el umbral de retiro de la pata durante 6 horas post-administración. i.t: Intratecal; LNE: Ligadura de los nervios espinales.



**Figura 16. Diseño experimental de la participación diferencial del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  en animales macho y hembra.** La administración de los moduladores alostéricos positivos (PZ-II-029 y Ro 15-4513) o sus vehículos se realizó vía intratecal en ratas y ratones hembra y macho con dolor neuropático. Posteriormente, se determinó el efecto de PZ-II-029 (30 nmol) y Ro 15-4513 (10 nmol) o sus vehículos sobre el umbral de retiro de la pata durante 6 horas post-administración. i.t: Intratecal, LNE: ligadura de los nervios espinales.

### 8.5. Restitución proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ en animales con dolor neuropático experimental

Para alcanzar nuestro objetivo, se administró vía intratecal el plásmido *Gabra6* durante 3 días consecutivos en animales de 11 días post-ligadura de los nervios espinales. La restitución proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  se confirmó mediante *western blot* 24 horas después de la última administración del plásmido *Gabra6*. En un grupo independiente de animales se evaluó el efecto de la restitución proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  sobre la alodinia táctil, la hiperalgesia muscular y el dolor espontáneo (Figura 17).

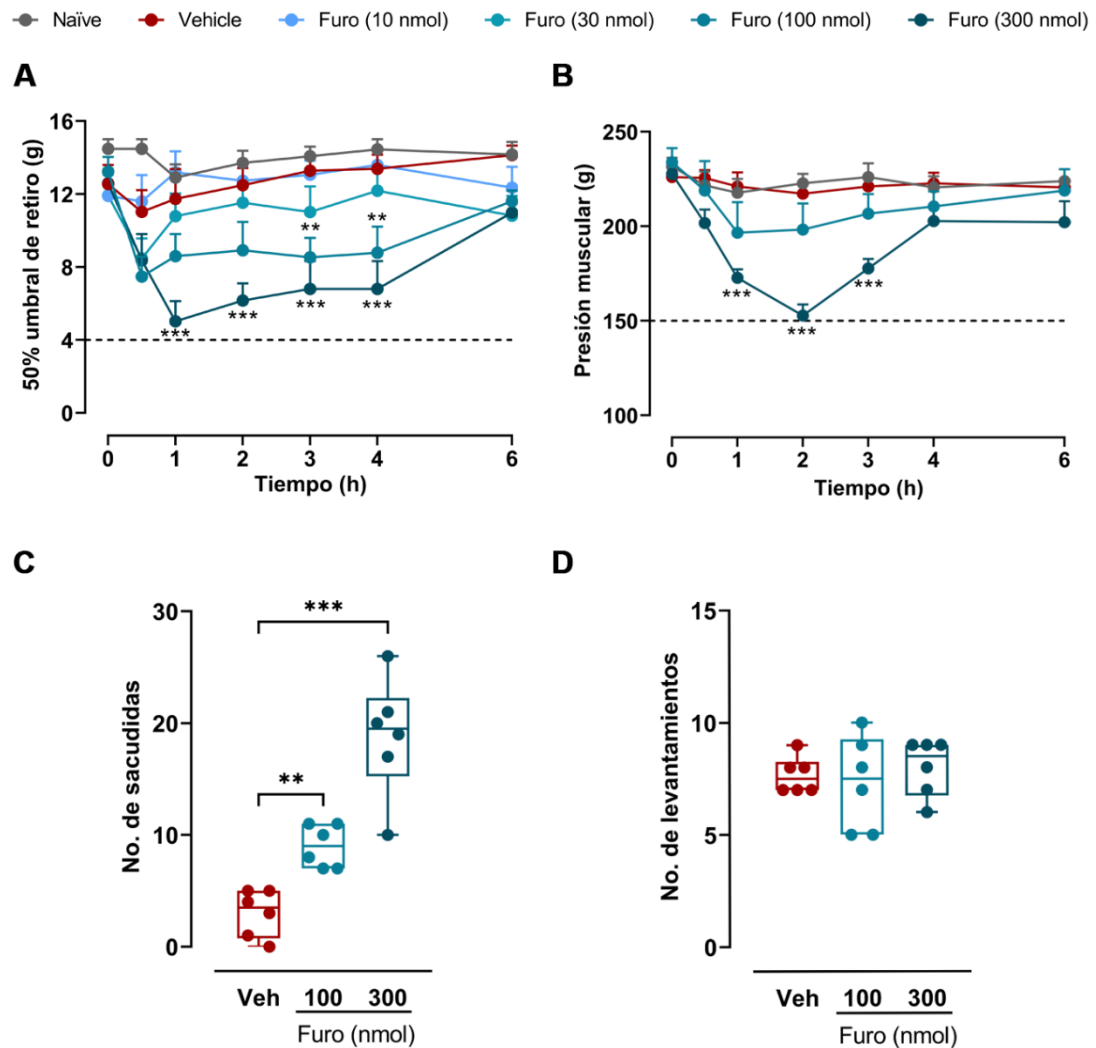


**Figura 17. Diseño experimental de la purificación y efecto del plásmido *Gabra6* en ratas hembra con dolor neuropático.** El plásmido *Gabra6* o el plásmido control se incorporaron en bacterias *E. coli* a través de un choque térmico. Las bacterias que incorporaron el plásmido *Gabra6* o el plásmido control se amplificaron durante 16 horas. El plásmido *Gabra6* o el plásmido control se purificó mediante el método de maxiprep. La administración del plásmido *Gabra6* o su plásmido control se realizó vía intratecal en ratas hembras con dolor neuropático durante 3 días consecutivos. La eficacia del tratamiento con el plásmido *Gabra6* se determinó a través de la medición de la expresión de la subunidad  $\alpha_6$  del receptor GABA<sub>A</sub> mediante la técnica de *western blot* 24 horas después de la última administración del plásmido *Gabra6*. Posteriormente, se determinó el efecto del plásmido *Gabra6* o el plásmido control sobre las conductas nociceptivas: 1) umbral de retiro de la pata, 2) umbral de presión muscular, y 3) dolor espontáneo (sacudidas y levantamientos verticales) durante 10 días. CMV: Citomegalovirus; Col E1: Colicina E1; Kan: Kanamicina; LNE: ligadura de los nervios espinales; Neo: Neomicina; SV40 ori: Promotor del virus vacuolado del simio 40.

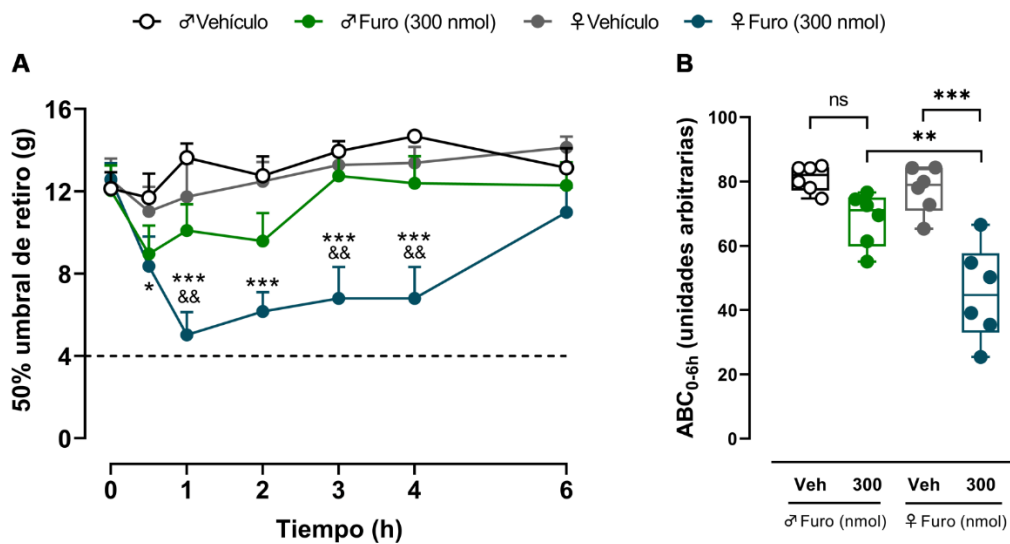
## 9. Resultados

### 9.1. El receptor $GABA_A-\alpha_6$ desempeña un papel antinociceptivo en condiciones fisiológicas

Para determinar la función que desempeña el receptor  $GABA_A-\alpha_6$  en el procesamiento de la información nociceptiva en condiciones fisiológicas, se utilizaron ratas hembra las cuales recibieron una administración intratecal de furosemida (10-300 nmoles; antagonista del receptor  $GABA_A-\alpha_6$ ). La furosemida, pero no el vehículo, redujo el umbral de retiro de la pata y presión muscular de manera dependiente de la concentración (Figura 18A-B). Además, la administración de furosemida aumentó el número de sacudidas espontáneas en la pata trasera de los animales, pero no modificó el número de levantamientos verticales realizados por el animal (Figura 18C-D). De manera interesante, la administración intratecal de furosemida (300 nmoles) redujo en menor medida el umbral de retiro de la pata en ratas macho, comparado con ratas hembra (Figura 19).



**Figura 18. La administración de furosemida induce conductas nociceptivas en ratas hembra.** Efecto de la administración i.t. de furosemida sobre A) el umbral de retiro de la pata, B) el umbral de presión muscular, C) el número de sacudidas espontáneas y D) el número de levantamientos verticales. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EE ( $n=6$  animales por grupo). En A y B:  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  furosemida vs vehículo, determinado por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. En C y D:  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ , determinado por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Furo: Furosemida; Veh: Vehículo. La línea punteada negra representa el umbral de alodinia táctil.

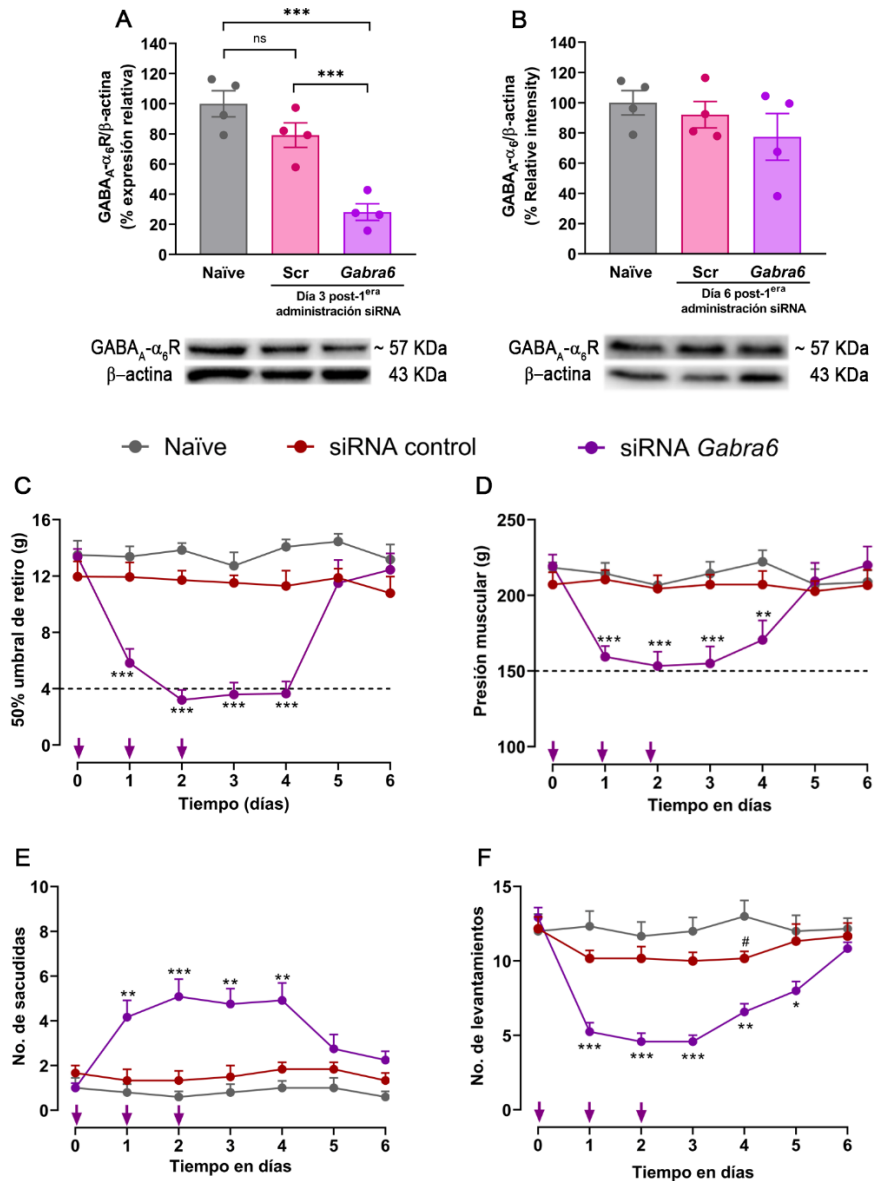


**Figura 19. La administración de furosemida induce un efecto pronociceptivo mayor en hembras que en machos.** **A)** Efecto de la administración i.t. de furosemida en ratas hembra y macho. **B)** Área bajo la curva de los cursos temporales del efecto de furosemida en ratas hembra y macho. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EE (n= 6 animales por grupo). En A: \*P< 0.05, \*\*P< 0.01, \*\*\*P< 0.001 furosemida hembras vs vehículo en hembras. &&P< 0.01 furosemida hembras vs furosemida machos, determinado por ANOVA de tres vías seguido de la prueba de Tukey. En B: \*\*P< 0.01, \*\*\*P< 0.001, determinado por ANOVA de una vía seguido de la prueba de tukey. Furo: Furosemida; Veh: Vehículo. La línea punteada negra representa el umbral de alodinia táctil.

Para confirmar la participación del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  en el procesamiento de la información nociceptiva, se realizó el silenciamiento transitorio del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  en ratas hembra sin ligadura de los nervios espinales (naïve). La administración intratecal del siRNA dirigido contra el gen *Gabra6* redujo la expresión proteica del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  en la médula espinal al día 3, pero no al día 6 después de la última administración del siRNA (Figura 20A-B). Además, la administración repetida del siRNA disminuyó el umbral de retiro de la pata y presión muscular por alrededor de 4 días (Figura 20C-D). Asimismo, el silenciamiento del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  indujo la aparición de conductas de dolor espontáneo en ratas hembra intactas (Figura 20E-F). Nuestros resultados sugieren que el receptor  $GABA_A-\alpha_6$  desempeña un papel



antinociceptivo en condiciones fisiológicas en ratas hembra y en menor medida en ratas macho.



**Figura 20. El silenciamiento del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> induce conductas nociceptivas en ratas hembra.** Efecto del silenciamiento transitorio del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> sobre la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> en la médula espinal lumbar dorsal de ratas hembras **A**) en el día 3 y **B**) en el día 6 después de la primera administración del siRNA. Efecto del silenciamiento transitorio del receptor sobre **C**) umbral de retiro de la pata, **D**) umbral de presión muscular, **E**) número de sacudidas espontáneas y **F**) número de levantamientos verticales en ratas hembra intactas. Los datos se presentan como la media ± EE (n= 6 animales por grupo para las pruebas conductuales), (n=4 para las pruebas de *western blot*). En A y B: \*\*\*P< 0.001

---

determinado por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. En C-F: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  siRNA *Gabra6* vs siRNA ctrl, determinado por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. En F: # $P < 0.05$  naïve vs siRNA ctrl, determinado por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. ctrl: control; ns: no significativo. La línea punteada negra representa el umbral de alodinia táctil.

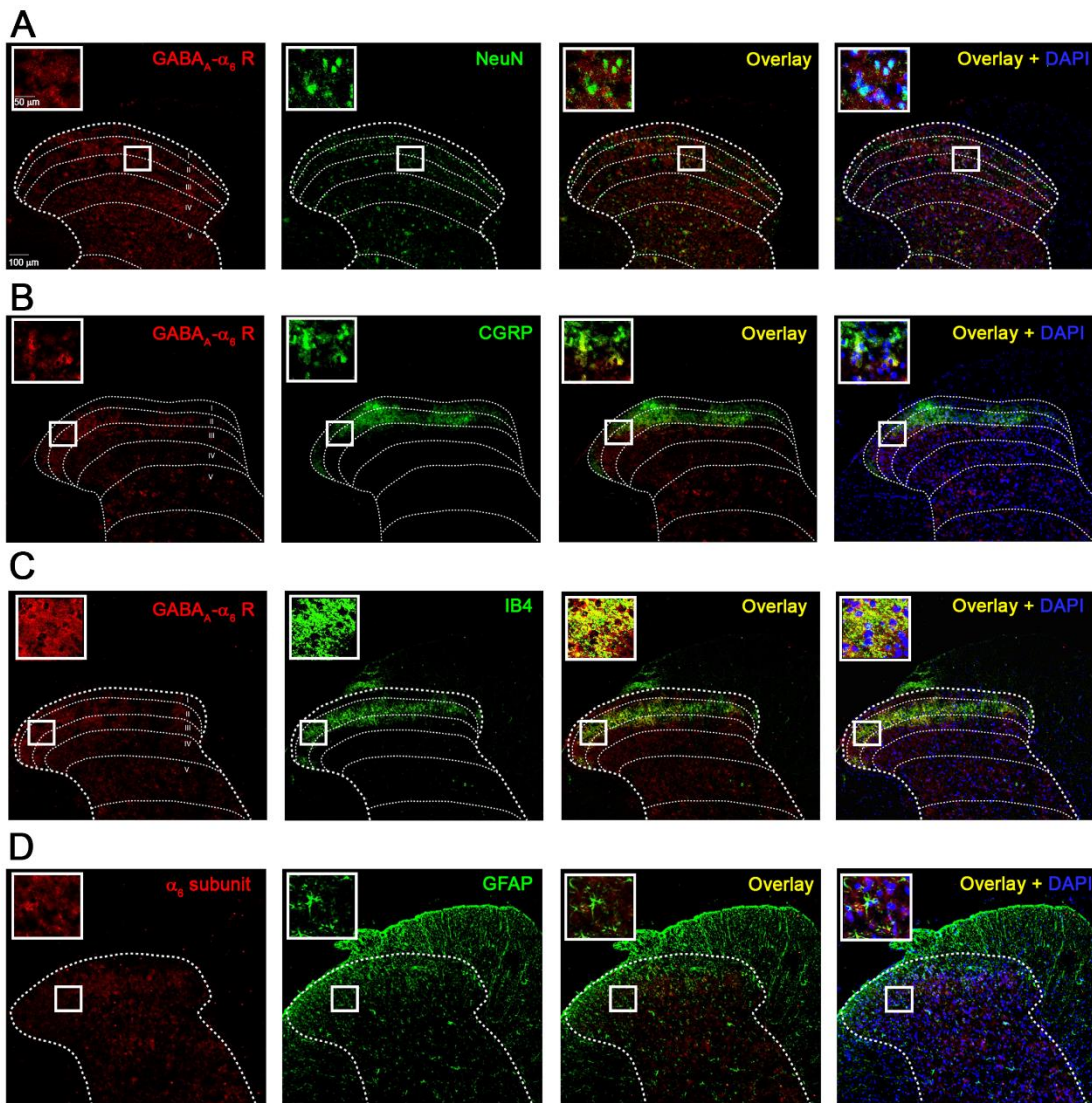
## 9.2. Localización celular del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ en animales intactos

Estos resultados en animales intactos demuestran la participación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, se determinó la localización celular de dicho receptor en tejidos relevantes para el procesamiento de la información nociceptiva. Para tal propósito, los ensayos de inmunohistoquímica se realizaron en la médula espinal lumbar y en los GRD de ratas hembra intactas. El receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  colocalizó con el marcador de núcleos neuronales (NeuN)  $3.22 \pm 0.05\%$  (Figura 21A), lo que sugiere que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  está expresado en neuronas de la médula espinal. La distribución del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  dentro de la médula espinal se determinó mediante marcadores celulares (CGRP e IB4). Los resultados muestran que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  está expresado, principalmente, en neuronas no peptidérgicas ( $33.51 \pm 3.58\%$  IB4<sup>+</sup>, Figura 21B), comparado con neuronas peptidérgicas ( $16.50 \pm 1.27\%$  CGRP<sup>+</sup>, Figura 21C). Además, el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  no se encuentra expresado en astrocitos (GFAP) (Figura 21D). Adicionalmente, el análisis de microscopía confocal mostró que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  está distribuido de la lámina 2 a la lámina 5 de la médula espinal (Figura 21).

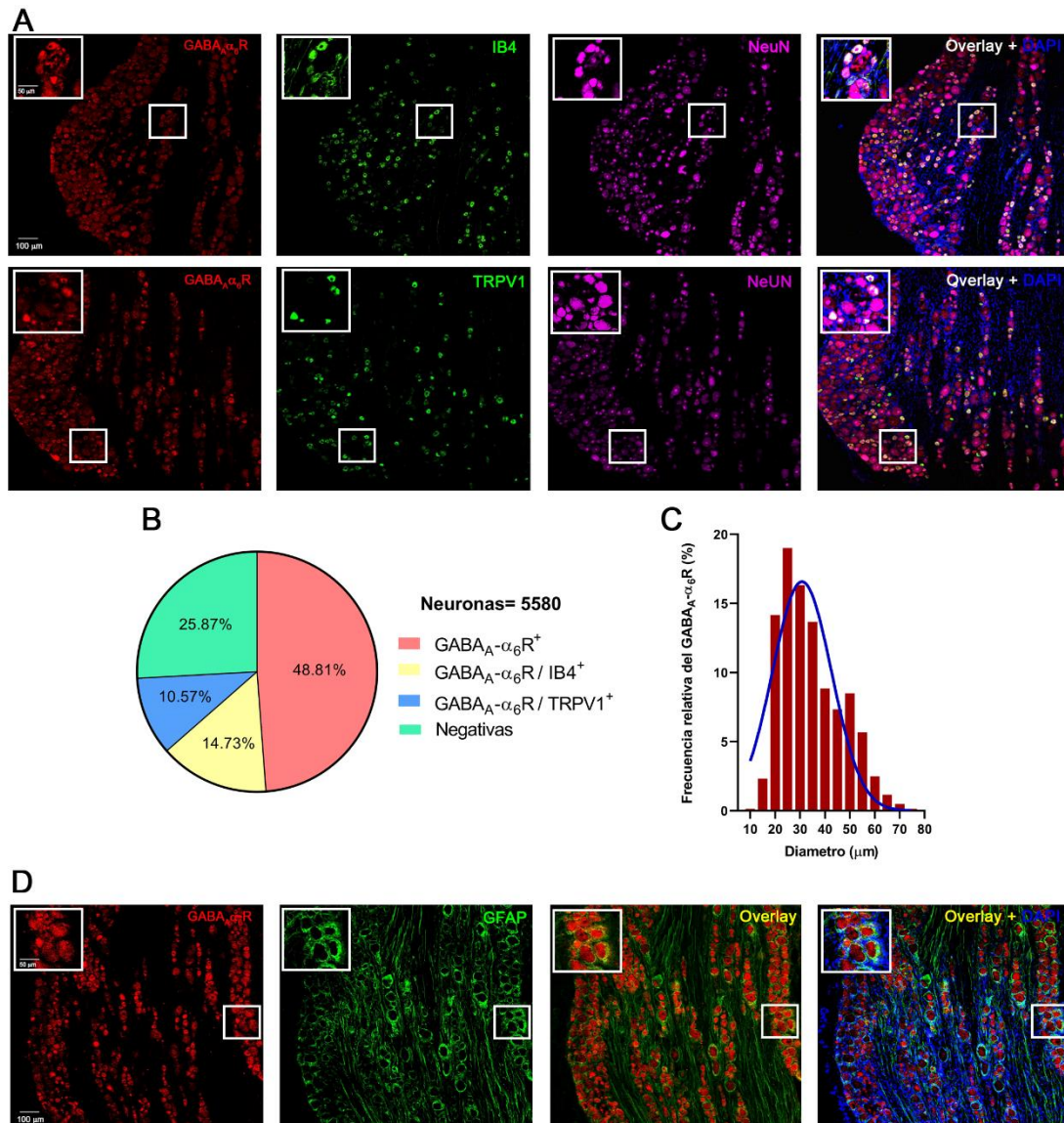
Debido a que las terminales pre- y post-sinápticas están muy cercanas una de la otra dentro de la médula espinal, el análisis correcto de ellas es difícil de realizar. Por lo tanto, se determinó la localización celular del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en los GRD. Los ensayos de inmunohistoquímica muestran que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  está expresado en neuronas sensoriales (74.11%) del GRD (Figura 22A-B). De esas, el 15% son neuronas IB4<sup>+</sup> y el 11% neuronas TRPV1<sup>+</sup> (Figura 22A-B). Además, el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  está expresado, principalmente, en

neuronas de diámetro mediano (Figura 22C). Lo anterior sugiere que el receptor  $GABA_A-\alpha_6$  está localizado en neuronas relacionadas con el procesamiento de la información nociceptiva. De manera sorprendente, el receptor  $GABA_A-\alpha_6$  está expresado en células satelitales del GRD (Figura 22D).

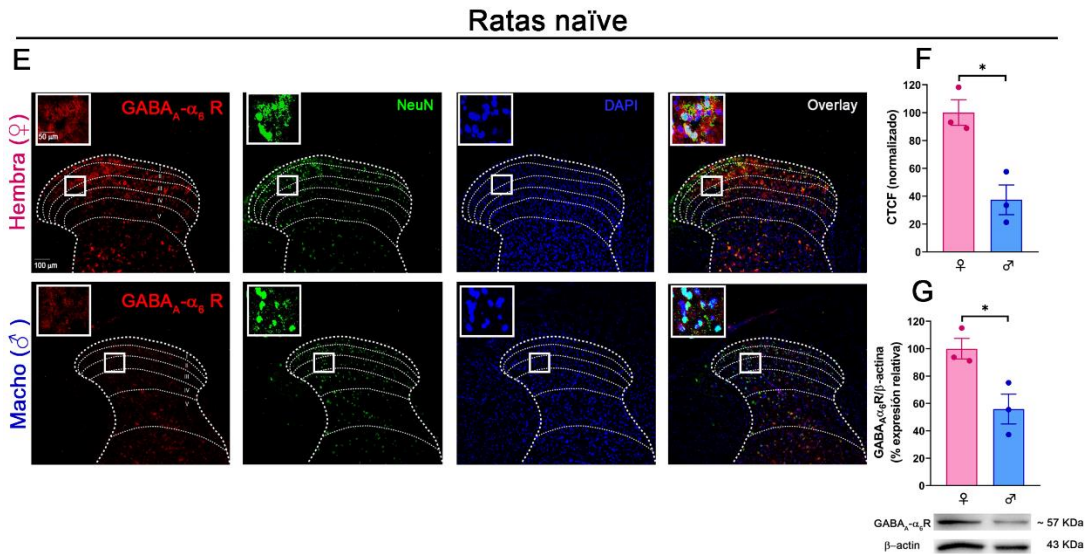
Con el propósito de conocer si la expresión del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  depende del sexo de los animales. Se determinó la expresión del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  en ratas hembra y machos sin ligadura de los nervios espinales. De manera interesante, los análisis de inmunohistoquímica y *western blot* muestran que el receptor  $GABA_A-\alpha_6$  se encuentra expresado en menor medida en la médula espinal de ratas macho intactas, comparado con ratas hembra (Figura 23A-C). En conjunto, estos datos demuestran que el receptor  $GABA_A-\alpha_6$  está expresado en las terminales centrales de las aferentes primarias y en los cuerpos celulares de las neuronas del GRD y se encuentra expresado en mayor medida en la médula espinal de ratas hembra comparado con machos.



**Figura 21. Expresión del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  en la médula espinal de ratas hembra intactas.** Determinación de la localización celular del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  en las diferentes poblaciones de neuronas de la médula espinal **A)** marcado de núcleos neuronales (NeuN), **B)** neuronas peptidérgicas (CGRP), **C)** neuronas no-peptidérgicas (IB4) y **D)** astrocitos (GFAP). Escala 50  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ .



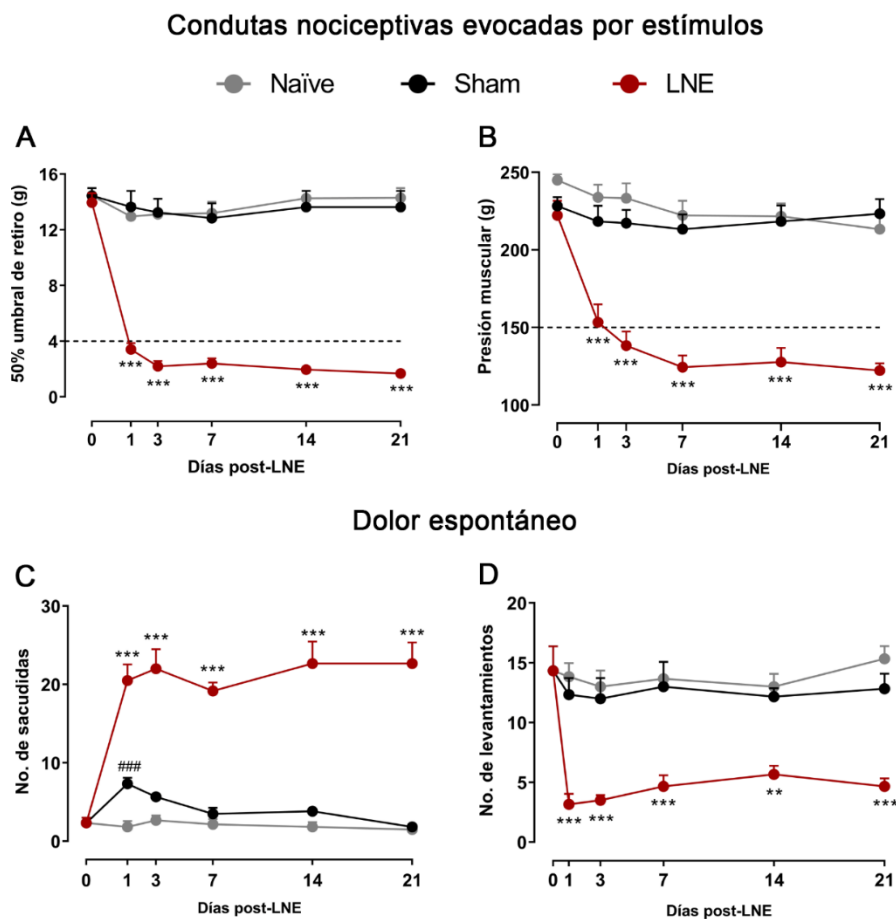
**Figura 22. Expresión del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> en las neuronas sensoriales del GRD en ratas hembra intactas. A)** determinación de la localización celular del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> en los diferentes tipos de neuronas sensoriales, **B)** análisis del porcentaje de *overlay* del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> con IB4 y TRPV1 y **D)** histograma con el perfil de tamaño de las neuronas positivas para el GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub>.



**Figura 23.** El receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> tienen un expresión proteica diferencial en ratas hembra y macho. **A)** Imágenes representativas de inmunohistoquímica de la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> en la médula espinal lumbar en ratas hembra y macho, **B)** análisis de fluorescencia total corregida y **C)** análisis de *western blot* en la médula espinal dorsal de ratas hembra y macho. CTCF: Fluorescencia total corregida.

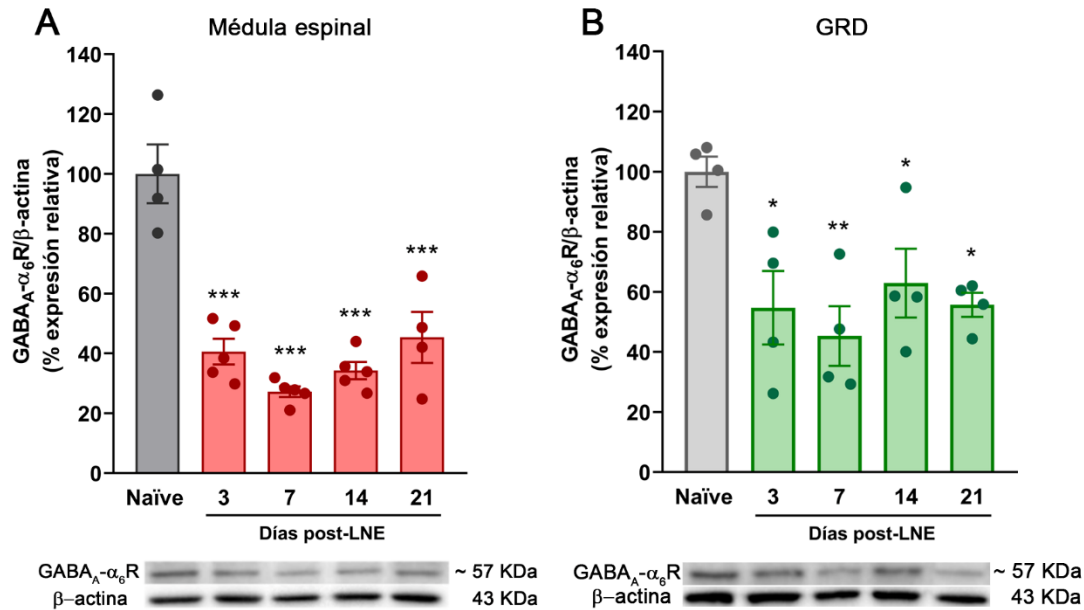
### 9.3. La participación del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> en el dolor neuropático experimental

Posteriormente, se exploró si el daño a los nervios espinales es capaz de inducir conductas nociceptivas y cambios en la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub>. El daño a los nervios espinales indujo la aparición de alodinia táctil, hiperalgesia muscular y dolor espontáneo en ratas hembra durante 21 días post-daño a los nervios espinales (Figura 24).



**Figura 24. El daño a los nervios espinales induce conductas nociceptivas en ratas.** Curso temporal del desarrollo de **A)** alodinia táctil, **B)** hiperalgesia muscular, **C)** sacudidas espontáneas y **D)** levantamientos verticales en ratas hembra con dolor neuropático. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EE (n= 6 animales por grupo). \*\*\*P< 0.001 LNE vs sham; ###P< 0.001 sham vs naïve, determinado por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. LNE: ligadura de los nervios espinales. La línea punteada negra representa el umbral de alodinia táctil.

Además del desarrollo de conductas nociceptivas, la lesión a los nervios espinales redujo la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en la médula espinal lumbar y en los GRD a partir del día 3 y hasta el día 21 post-lesión (Figura 25). Estos datos demuestran que la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  disminuyó después del daño a los nervios espinales. Lo anterior puede contribuir a la pérdida de la inhibición GABAérgica que se presenta en el dolor neuropático.



**Figura 25. El daño a los nervios espinales reduce la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> en ratas hembra.** Curso temporal de la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> en **A)** médula espinal y **B)** GRD. Los datos se presentan como la media ± EE (n= 4-5 animales por grupo). \*P< 0.05, \*\*P< 0.1, \*\*\*P< 0.001, determinado por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. GRD: Ganglio de la raíz dorsal; LNE: Ligadura de los nervios espinales.

#### 9.4. La activación del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> reduce las conductas nociceptivas inducidas por el daño a los nervios espinales

Con base en los resultados anteriores, se evaluó el efecto de la administración intratecal de moduladores alostéricos positivos del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> en ratas hembra con dolor neuropático experimental. La administración intratecal de Ro 15-4513 (1-10 nmol), pero no el vehículo, redujo la alodinia táctil por alrededor de 8 horas post-administración de manera dependiente de la concentración (Figura 26A). Además de la alodinia táctil, el dolor neuropático también induce hiperalgesia muscular (Kim et al., 2016; Seol et al., 2017). En este sentido, la inyección intratecal de Ro 15-4513 (10 nmol) redujo, parcialmente, la hiperalgesia muscular por alrededor de 2 horas post-administración (Figura 26B). El dolor espontáneo es uno de los síntomas que más experimentan las personas que padecen dolor neuropático (Jensen et al., 2001). Con base en



lo anterior, se determinó el efecto de Ro 15-4513 sobre las conductas de sacudidas de la pata y levantamientos verticales 2 horas después de la administración intratecal del fármaco (Figura 26C-D). De manera interesante, la administración intratecal de Ro 15-4513 disminuyó el número de sacudidas espontáneas en la pata ipsilateral al daño y aumentó el número de levantamientos verticales en ratas hembra con dolor neuropático.

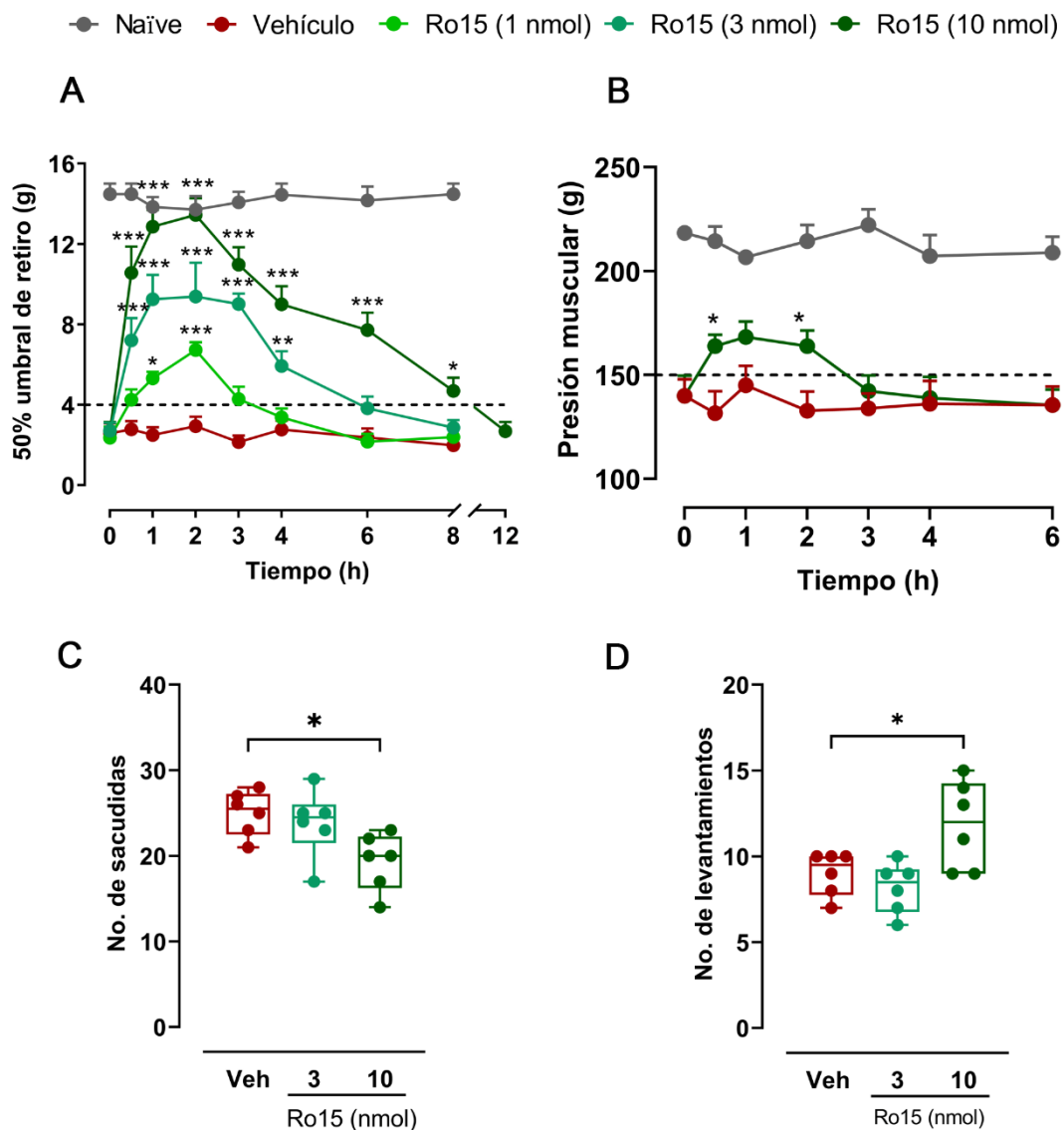


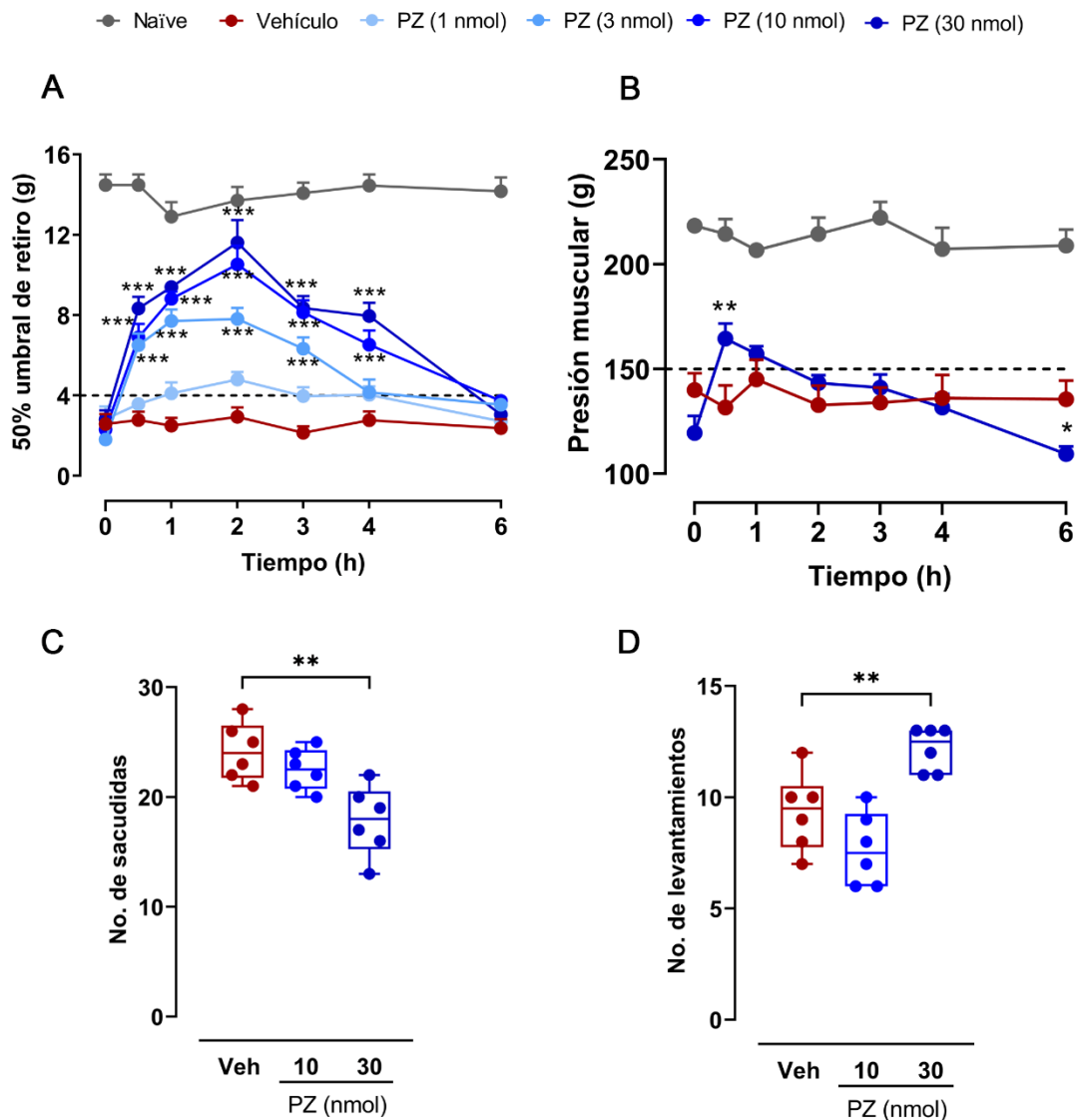
Figura 26. La administración de Ro 15-4513 reduce las conductas nociceptivas inducidas por el daño a los nervios en ratas hembra. Efecto de la administración intratecal

---

de Ro 15-4513 sobre **A**) la alodinia táctil, **B**) la hiperalgesia muscular, **C**) el número de sacudidas espontáneas y **D**) el número de levantamientos verticales en ratas hembra con dolor neuropático experimental. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EE (n= 6 animales por grupo). En A y B: \*P< 0.05, \*\*P< 0.01, \*\*\*P< 0.001, determinado por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. En C-D: \*P< 0.05 determinado por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. Ro15: Ro 15-4513, Veh: Vehículo. La línea punteada negra representa el umbral de alodinia táctil.

Es importante mencionar que el Ro 15-4513 es un MAP de la subunidad  $\alpha_4$  y  $\alpha_6$  de los receptores GABA<sub>A</sub> (Hadingham et al., 1996; Whittemore et al., 1996; You et al., 2010). Por lo tanto, los datos empleando el Ro 15-4513 podrían ser el resultado de la activación de ambas subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>. Con el objetivo de evitar este problema, se utilizó el PZ-II-029 (un MAP con alta selectividad por el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ ) (Varagic et al., 2013). La administración intratecal de PZ-II-029 (1-30 nmol) aumentó de manera dependiente de la concentración el umbral de retiro de la pata de ratas neuropáticas durante 6 horas (Figura 27A). En contraste, el PZ-II-029 (30 nmol) no redujo la hiperalgesia muscular inducida por la lesión a los nervios espinales (Figura 27B). Asimismo, la inyección intratecal de PZ-II-029 redujo el número de sacudidas espontáneas y aumentó el número de levantamientos verticales 2 horas post-administración del fármaco (Figura 27D-C). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la activación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  redujo las conductas nociceptivas que se presentan durante el dolor neuropático. Para confirmar la participación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en dichos efectos se evaluó el efecto de PZ-II-029 en presencia de furosemida. El antagonista del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  (furosemida) redujo el efecto anti-alodínico de PZ-II-029 de manera dependiente de la concentración (10-30 nmol, i.t.) en ratas hembra con dolor neuropático (Figura 28A-B). Debido a que la furosemida no atraviesa la barrera hematoencefálica (Seelig et al., 1994), se determinó el papel del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  periférico a través de la administración sistémica de furosemida. La administración intraperitoneal de furosemida (20 mg/kg) revirtió parcialmente el efecto anti-alodínico inducido por PZ-II-029 (30 nmol, i.t.) (Figura 28C-D).

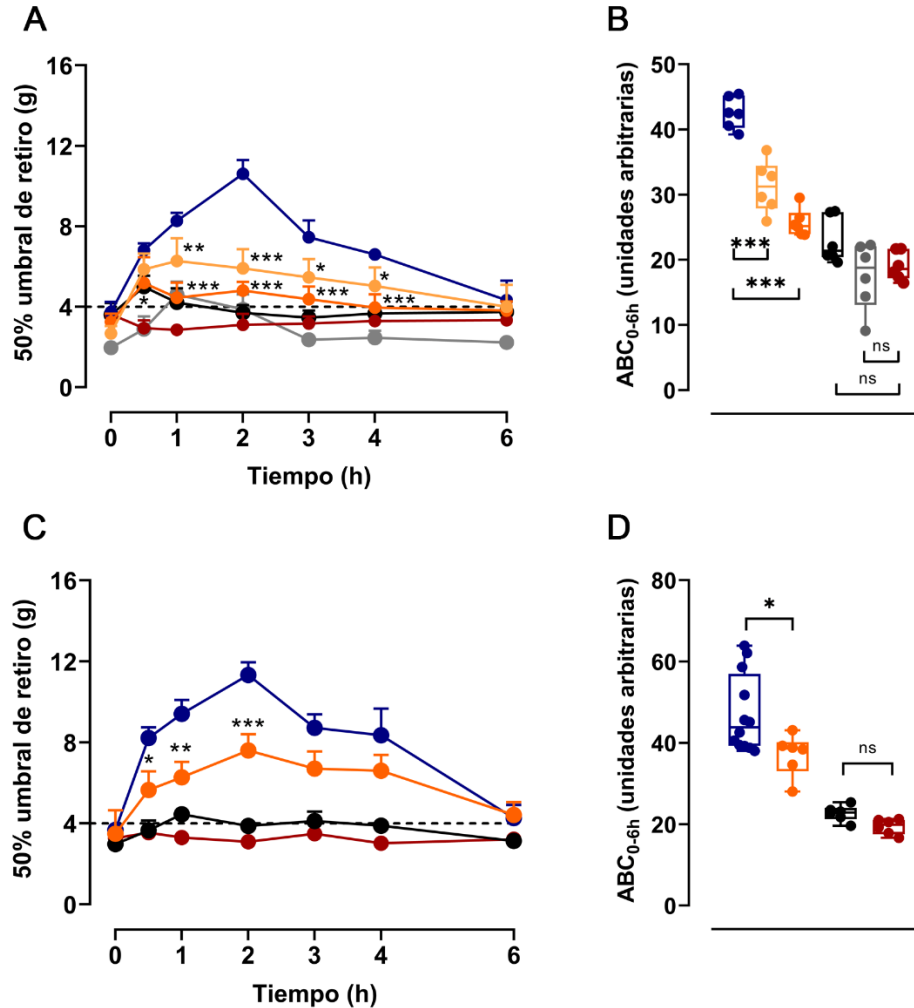
Por su parte, la administración *per se* de furosemida (10-30 nmol, i.t. o 20 mg/kg, i.p.) no modificó el umbral de retiro de la pata, comparado contra el vehículo (Figura 28B-D). En conjunto, estos resultados permiten sugerir que el efecto antinociceptivo de PZ-II-029 está mediado por mecanismos locales en la médula espinal y en los GRD.



**Figura 27. La administración de PZ-II-029 reduce las conductas nociceptivas inducidas por el daño a los nervios en ratas hembra.** Efecto de la administración intratecal de PZ-II-029 sobre **A)** la alodinia táctil, **B)** la hiperalgesia muscular, **C)** el número de sacudidas

espontáneas y **D**) el número de levantamientos verticales en ratas hembra con dolor neuropático experimental. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EE (n= 6 animales por grupo). En A y B: \*\*P< 0.01, \*\*\*P< 0.001, determinado por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. En C-D: \*\*P< 0.01, determinado por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. PZ: PZ-II-029; Veh: Vehículo. La línea punteada negra representa el umbral de alodinia táctil.

● Veh Furo + PZ (30 nmol)      ● Furo (10 nmol) + PZ (30 nmol)      ● Furo (30 nmol) + PZ (30 nmol)  
 ● Furo (10 nmol) + Veh PZ      ● Furo (30 nmol) + Veh PZ      ● Veh Furo + Veh PZ

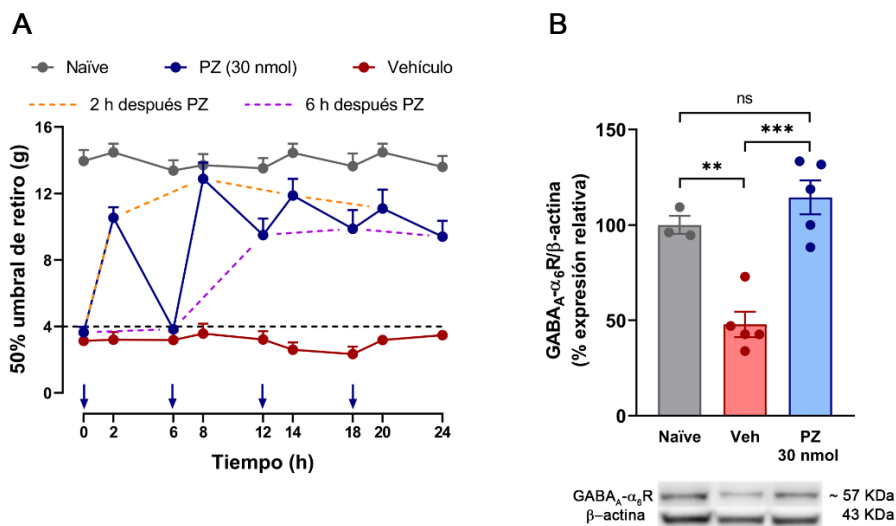


**Figura 28. El bloqueo del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  reduce el efecto antinociceptivo de PZ-II-029.** **A)** efecto de la administración intratecal de furosemida sobre el efecto antinociceptivo inducido por PZ-II-029 en ratas hembras con dolor neuropático, **B)** área bajo la curva del efecto antagónico de la administración intratecal de furosemida en ratas hembra con daño a los nervios espinales, **C)** efecto de la administración intraperitoneal de furosemida sobre el efecto anti-alodínico inducido por PZ-II-029 en ratas con dolor neuropático, **D)** área bajo la curva del efecto antagónico de la administración intraperitoneal de furosemida en ratas hembra con

daño a los nervios espinales. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EE (n= 6 animales por grupo). En A y C: \*P< 0.05, \*\*P< 0.01, \*\*\*P< 0.001 vs Veh Furo + PZ (30 nmol), determinado por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. En B y D: \*P< 0.05, \*\*\*P< 0.001, determinado por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. Furo: Furosemdia; ns: no significativo; PZ: PZ-II-029; Veh: Vehículo. La línea punteada negra representa el umbral de alodinia táctil.

### 9.5. La administración repetida de PZ-II-029 reduce la alodinia táctil a través de restaurar la expresión proteica del receptor

Con la idea de ampliar nuestros datos farmacológicos, se exploró si la administración repetida de PZ-II-029 cada 6 horas es capaz de reducir la alodinia táctil e inducir cambios en la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en ratas hembra con dolor neuropático. La administración intratecal repetida de PZ-II-029 (30 nmol) indujo un efecto antialodínico sostenido durante las 24 horas de evaluación, excepto 6 horas después de la primera administración (Figura 29A). Además, la administración repetida de PZ-II-029 restauró la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en la médula espinal de ratas hembra neuropáticas (Figura 29B). En conjunto, los resultados sugieren que el PZ-II-029 reduce la alodinia táctil a través de un mecanismo que implica la activación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  y la restauración de la expresión proteica del mismo receptor.



---

**Figura 29. La administración repetida de PZ-II-029 restaura la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ .** Efecto de la administración intratecal repetida de PZ-II-029 sobre **A)** la alodinia táctil y **B)** la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en ratas hembra con dolor neuropático. El umbral de retiro de la pata se evaluó 2 y 6 horas después de cada administración de PZ-II-029. La línea azul continua representa el curso temporal de PZ-II-029 durante 24 horas; la línea punteada naranja representa el curso temporal de las 2 horas después de la administración de PZ-II-029 y la línea punteada morada representa el curso temporal de las 6 horas después de la administración de PZ-II-029. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EE (n= 6 animales por grupo). PZ: PZ-II-029; Veh: Vehículo. La línea punteada negra representa el umbral de alodinia táctil.

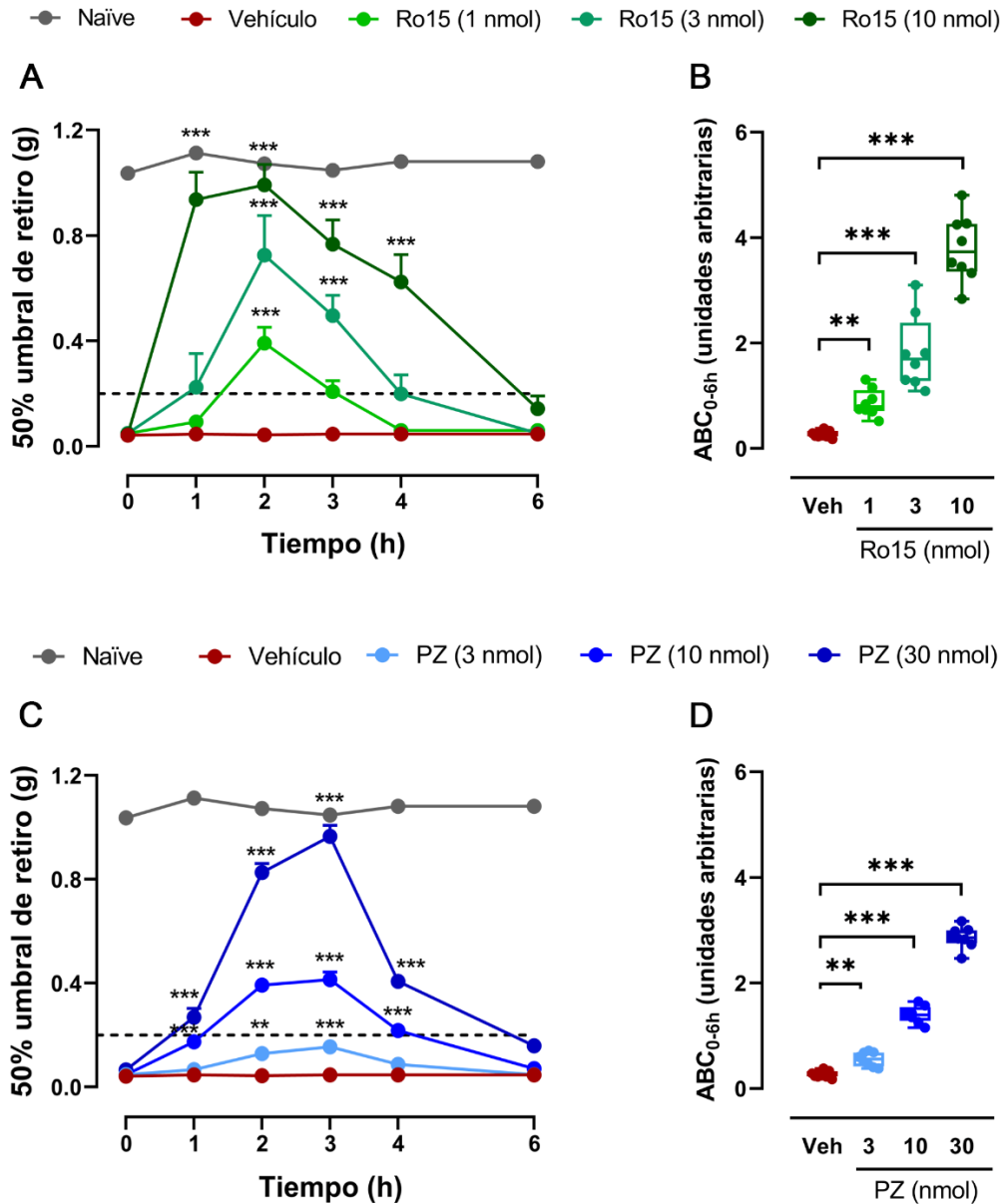
### **9.6. La activación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ reduce las conductas nociceptivas en ratones con dolor neuropático**

Debido a que se ha demostrado que la expresión de diferentes receptores involucrados en la vía del dolor es diferente entre especies (Shiers et al., 2020; Tavares-Ferreira et al., 2022), se determinó si el efecto de ambos fármacos depende de la especie. Se estudió el efecto de Ro 15-4513 (1-10 nmol, i.t.) y PZ-II-029 (3-30 nmol, i.t.) en ratones con dolor neuropático experimental. El daño a los nervios espinales indujo el desarrollo de alodinia táctil que fue atenuada por la administración intratecal de ambos fármacos de manera dependiente de la concentración (Figura 30). Por lo tanto, nuestros datos demuestran que la activación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  disminuye la alodinia mecánica en ratas y en ratones con dolor neuropático experimental.

### **9.7. La activación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ no reduce las conductas nociceptivas en roedores macho con dolor neuropático**

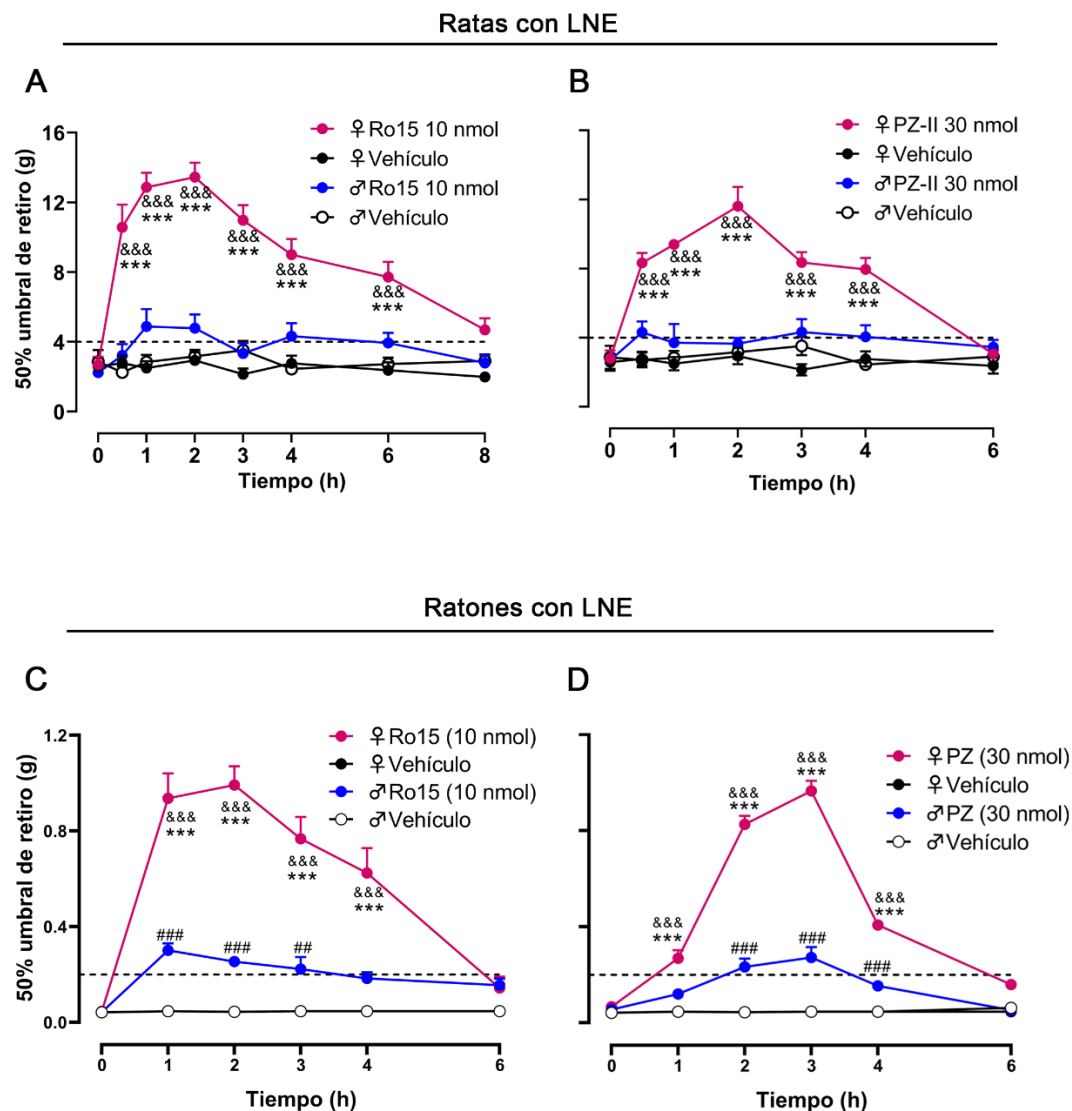
Previamente se reportó que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_5$  tiene un efecto anti-alodínico dependiente del sexo en ratas y ratones con dolor neuropático (Franco-Enzástiga et al., 2021; Lee y Lim, 2010). Adicionalmente, nuestros datos muestran que la administración de furosemida (antagonista del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ ) indujo un efecto pronociceptivo mayor en ratas hembra, comparado con ratas macho. Se ha reportado que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  es modulado por hormonas sexuales como el estradiol (Kramer y Bellinger, 2014). Con base en lo anterior, se determinó el efecto de los MAP en ratas y ratones neuropáticos

macho y hembra. La administración intratecal de Ro 15-4513 (10 nmol) y PZ-II-029 (30 nmol) redujo la alodinia táctil en ratas y ratones hembra pero no en macho (Figura 32). En conjunto, los resultados sugieren que la falta de efecto de los MAPs del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ , en machos, se puede explicar por la expresión diferencial del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en sitios relacionados con el procesamiento de la información nociceptiva.



**Figura 30. Los MAPs del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  reducen las conductas nociceptivas inducidas por el daño a los nervios espinales en ratones hembra.** **A)** Efecto de la administración intratecal de Ro 15-4513 sobre la alodinia táctil en ratones con dolor neuropático, **B)** área bajo la curva del efecto antinociceptivo inducido por Ro 15-4513, **C)** efecto de la administración intratecal de PZ-II-029 sobre la alodinia táctil inducida por la lesión a los nervios espinales y **D)** área bajo la curva del efecto antinociceptivo de PZ-II-029. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EE ( $n = 8$  animales por grupo). En A y C: \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs vehículo determinado por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. En B y D: \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , determinado por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. ns: no significativo; Ro15: Ro 15-4513; PZ: PZ-II-029; Veh: Vehículo. La línea punteada negra representa el umbral de alodinia táctil.

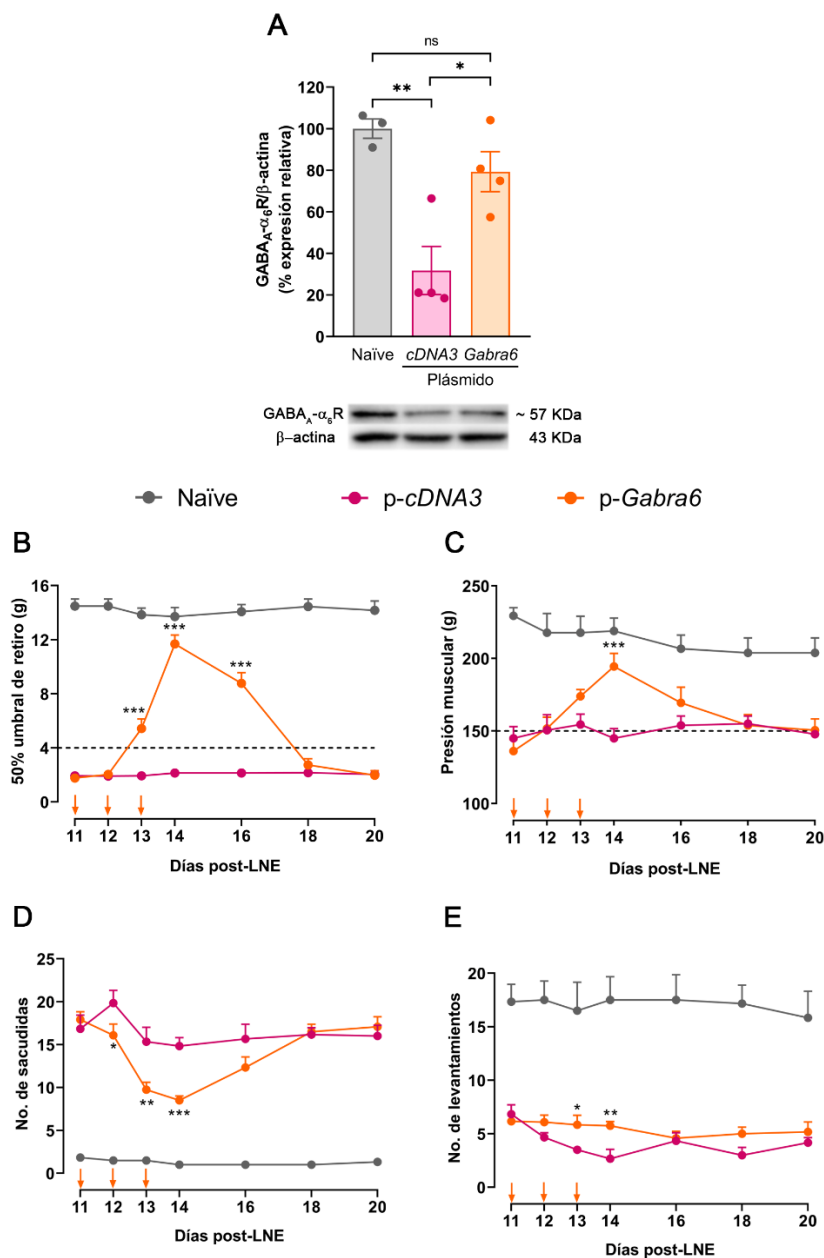




**Figura 31. La activación del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  induce un efecto anti-alodínico mayor en roedores hembra comparado con roedores macho. Efecto de la administración intratecal de Ro 15-4513 sobre la alodinia táctil en A) ratas y B) ratones hembra y macho. Efecto de la administración intratecal de PZ-II-029 sobre la alodinia táctil en C) ratas y D) ratones hembra y macho. LNE: Ligadura de los nervios espinales; PZ: PZ-II-029; Ro15: Ro 15-4513.**

### **9.8. La restitución proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ reduce las conductas nociceptivas inducidas por el daño a los nervios espinales**

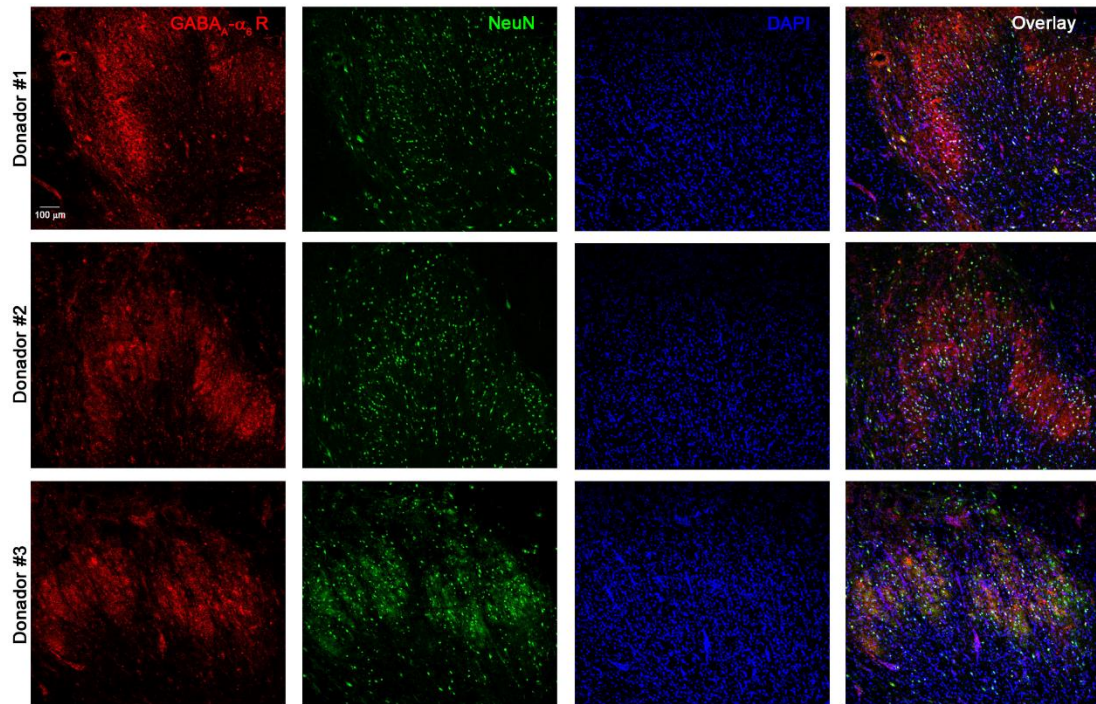
Los resultados muestran que la lesión a los nervios espinales reduce la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ , lo que podría estar contribuyendo al desarrollo de las conductas nociceptivas. Para abordar esta hipótesis, se evaluó el efecto de la sobreexpresión del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  a través de la administración intratecal repetida (3 días) de un vector no viral en ratas hembra neuropáticas. La administración del plásmido *Gabra6* restauró la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en la médula espinal (Figura 30A). Además, la inyección del plásmido *Gabra6* disminuyó la alodinia táctil, el dolor espontáneo y, en menor medida, la hiperalgesia muscular (Figura 30B-E). Estos resultados confirman que la disminución del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  tiene un papel importante en la alodinia táctil, el dolor espontáneo y la hiperalgesia muscular que se observan después de la lesión a los nervios periféricos.



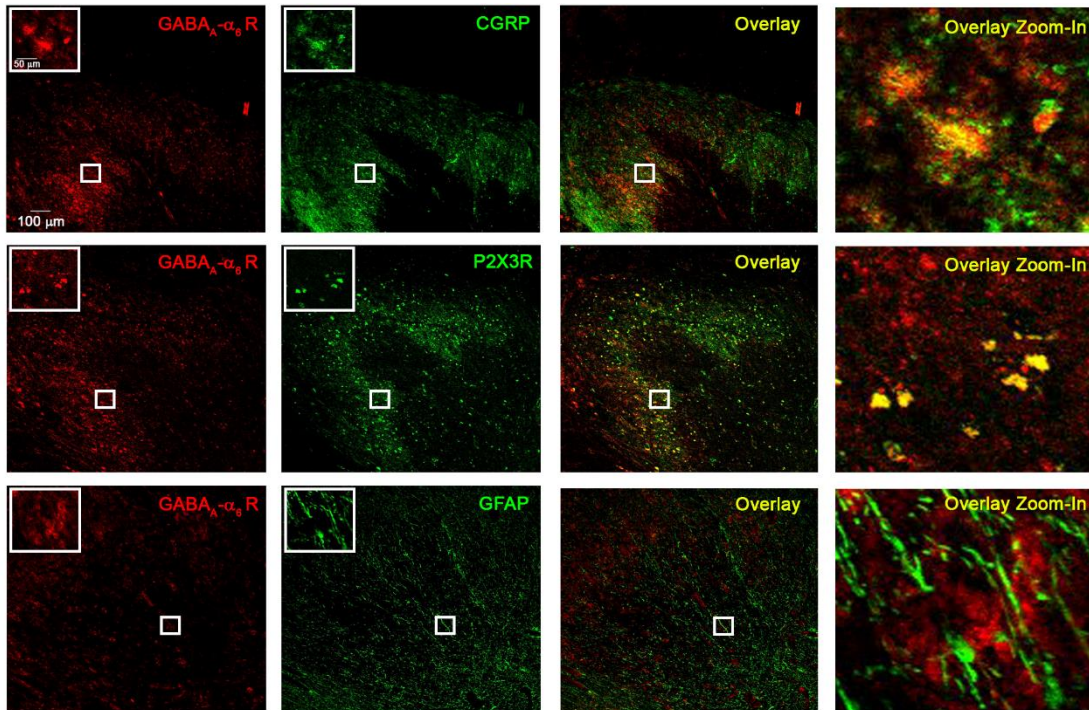
**Figura 32. La administración del plásmido *Gabra6* restaura la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> y reduce las conductas nociceptivas inducidas por el daño a los nervios espinales en ratas hembra.** Efecto de la administración intratecal repetida del plásmido *Gabra6* sobre **A)** la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub>, **B)** la alodinia táctil, **C)** hiperalgesia muscular, **D)** el número de sacudidas espontáneas y **E)** el número de levantamientos verticales en ratas hembra con dolor neuropático. Los datos se presentan como la media ± EE (n= 6 animales por grupo). En A: \*P< 0.05, determinado por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. En B-E: \*P< 0.05, \*\*P< 0.01, \*\*\*P< 0.001, determinado por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. LNE: Ligadura de los nervios espinales; ns: no significativo. La línea punteada negra representa el umbral de alodinia táctil.

### 9.9. El receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ se expresa en la médula espinal de humanos

Se ha demostrado que los receptores expresados en los nociceptores son diferentes entre roedores y humanos; lo que subyace en parte al éxito limitado en la limitar la transaccionalidad de las estrategias analgésicas preclínicas en tratamientos clínicos efectivos (Shiers et al., 2020; Tavares-Ferreira et al., 2022). Por tal motivo, se determinó la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en la médula espinal de tejido de humanos. Los datos demográficos de los donadores se muestran en la Tabla 2. Los ensayos de inmunohistoquímica muestran que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  se expresa en neuronas de la médula espinal de humanos (Figura 33). Además, el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  se expresa principalmente en neuronas CGRP<sup>+</sup> ( $2.65 \pm 0.23\%$  colocalización, neuronas peptidérgicas), comparado con neuronas P2X3<sup>+</sup> ( $1.93 \pm 0.24\%$  colocalización, neuronas no-peptidérgicas); pero no en astrocitos (Figura 34). Es importante destacar que los GRD de humano no fueron considerados debido a la ausencia del ARNm del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en este tejido (Ray et al., 2018).



**Figura 33. Expresión del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> en la médula espinal dorsal de humanos.** Imágenes representativas de inmunohistoquímica de la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>-α<sub>6</sub> en la médula espinal dorsal de humano y su localización con neuronas (NeuN) y núcleos (DAPI). Escala 100 μm.



**Figura 34.** El receptor  $GABA_A-\alpha_6$  se expresa en neuronas peptidérgicas y no-peptidérgicas en la médula espinal dorsal de humanos. Localización celular del receptor  $GABA_A-\alpha_6$  en neuronas peptidérgicas ( $CGRP^+$ ), no peptidérgicas ( $P2X3^+$ ) y astrocitos ( $GFAP$ ) en la médula espinal dorsal de humano. Escala 100  $\mu m$ .

## 10. Discusión

### 10.1. El receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ ejerce un papel anti-nociceptivo en condiciones fisiológicas

Nuestros datos sugieren que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  desempeña un papel antinociceptivo bajo condiciones fisiológicas, debido a que al reducir la actividad del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  mediante herramientas farmacológicas y/o genéticas induce la aparición de conductas nociceptivas en animales intactos. En el presente estudio exploramos la participación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en el dolor neuropático. Primeramente, se demostró que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  tiene una participación importante en el procesamiento de la información nociceptiva a través del uso de furosemida (antagonista del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ ). Algunos estudios han estudiado el efecto antinociceptivo de la administración de furosemida. La furosemida es capaz de reducir la actividad del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  pero también actúa como un inhibidor de los co-transportadores de cloruro NKCC1 y KCC2 (Andres et al., 2014; Delpire et al., 2009; Fan et al., 2018; Granados-Soto et al., 2005; Huang et al., 2016; Tzeng et al., 2021; Zhang et al., 2008). Por tal motivo, se podría sugerir que la administración intratecal de furosemida, bajo nuestras condiciones experimentales, podría inducir conductas nociceptivas en animales intactos a través de un mecanismo que depende del bloqueo de KCC2.

Sin embargo, la furosemida no es capaz de bloquear el co-transportador KCC2 a concentraciones micromolar (Andres et al., 2014). Se ha demostrado que la aplicación de furosemida (100-300  $\mu$ M) no modifica la corriente tónica evocada por la activación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_5$  en interneuronas del asta ventral de la médula espinal (Andres et al., 2014). Lo anterior apoya nuestros resultados sobre la participación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en el control de la información nociceptiva. Adicionalmente, el silenciamiento transitorio del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  a través del uso de un ARN de interferencia pequeño (siRNA) indujo el

desarrollo de conductas nociceptivas en animales intactos. Trabajos previos han demostrado que el *knock down in vitro* del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  aumenta la excitabilidad de las neuronas del ganglio del trigémino (Puri et al., 2011).

Está ampliamente reconocido que los receptores GABA<sub>A</sub>, localizados en la médula espinal, modulan la información sensorial proveniente de la periferia (Delgado-Lezama et al., 2021; Franco-Enzástiga et al., 2021; Hernández-Reyes et al., 2019; Iura et al., 2016; Zeilhofer et al., 2009). Un estudio previo ha demostrado que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  está expresado en la lámina II de la médula espinal (Gutiérrez et al., 1996). Adicionalmente, nuestro trabajo muestra que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  está expresado a lo largo de las diferentes laminas (II-V principalmente) de la médula espinal.

La baja colocalización del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  con NeuN (marcador de núcleos neuronales) sugiere que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  se expresa en sitios pre-sinápticos dentro de la médula espinal, como previamente se ha reportado para otros receptores (Black et al., 2012). En concordancia con lo anterior, se ha demostrado que otros receptores GABA<sub>A</sub> como el GABA<sub>A</sub>- $\alpha_2$  y GABA<sub>A</sub>- $\alpha_5$  se encuentran expresados en la terminal central de las fibras sensoriales (Bravo-Hernández et al., 2016; Hernández-Reyes et al., 2019; Witschi et al., 2011). Además, nuestros resultados muestran que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  se encuentra presente en láminas profundas (III-V) de la médula espinal. Este hallazgo abre la posibilidad de explorar la expresión y función del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en neuronas relevantes para el procesamiento nociceptivo tales como las interneuronas PKC $\gamma$  ó VGluT3 (Artola et al., 2020; Peirs et al., 2015).

Hasta donde sabemos, este trabajo es el primer reporte que demuestra que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  está expresado en neuronas sensoriales del GRD de ratas hembra. En contraste, se reportó que el ARNm del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  no está presente en neuronas sensoriales del ganglio del trigémino (Kogelman et al., 2017). En apoyo a nuestros hallazgos, el análisis de secuenciación masiva de



ARN en los GRD de ratones hembra mostró que el ARNm del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  está presente en este tejido (Ray et al., 2018). Por tal motivo, la discrepancia en la expresión del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ , en los GRD de ratas, podría explicarse por el sexo de los animales empleados. Adicionalmente, nuestros datos muestran que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  tiene una expresión dependiente del sexo en la médula espinal dorsal. En apoyo a nuestro hallazgo, se ha demostrado que la expresión de los receptores GABA<sub>A</sub> pueden ser modulada de manera dependiente del sexo (Carver y Reddy, 2013; De la Luz-Cuellar et al., 2019; Franco-Enzástiga et al., 2021; Kramer y Bellinger, 2014). En conjunto nuestro trabajo muestra que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  está expresado en sitios clave para el procesamiento nociceptivo.

### **10.2. La activación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ reduce las conductas nociceptivas en animales neuropáticos**

El dolor neuropático se ha asociado con cambios en el balance excitación-inhibición dentro de la médula espinal. De hecho, el daño a los nervios espinales reduce la función y expresión proteica del cotransportador KCC2 en las neuronas de la lámina I de la médula espinal, eventos que se han asociado con el desarrollo de conductas nociceptivas (Coull et al., 2003; Kosaka et al., 2020). Nuestros resultados muestran que la lesión a los nervios espinales reduce la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en los GRD y, en la médula espinal al menos 21 días después del daño a los nervios. Lo anterior permite sugerir que el dolor neuropático no solo es el resultado de la disminución en la función y expresión de KCC2, sino también de la reducción en la función del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  localizado en los GRD y en la médula espinal. En apoyo a esta idea, existen reportes que muestran que el silenciamiento del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  induce la aparición de conductas nociceptivas en un modelo de dolor inflamatorio en ratas (Kramer y Bellinger, 2013, 2014).

En contraste, trabajos de nuestro laboratorio reportaron que el daño a los nervios aumenta la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_5$  en la médula espinal. Lo cual estaría relacionado con el desarrollo de conductas nociceptivas (De la Luz-Cuellar et al., 2019; Franco-Enzástiga et al., 2021; Hernández-Reyes et al., 2019). Nuestros datos permiten sugerir que los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_5$  y  $\alpha_6$  son regulados de manera diferencial bajo condiciones patológicas y desempeñan funciones diferentes durante el dolor neuropático.

Nuestros datos sugieren que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  desempeña un papel antinociceptivo en el dolor neuropático. Esta sugerencia se basa en los siguientes hallazgos: *I*) la lesión a los nervios espinales reduce la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ ; *II*) la administración intratecal de los MAPs del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ , Ro 15-4513 y PZ-II-029, reduce la alodinia táctil, la hiperalgesia muscular y el dolor espontáneo en ratas con dolor neuropático; *III*) la administración intratecal de Ro 15-4513 y PZ-II-029 reduce la alodinia táctil en ratones, *IV*) la administración de furosemida reduce el efecto antinociceptivo inducido por PZ-II-029, y *V*) la administración intratecal repetida de PZ-II-029 reduce la alodinia táctil y restaura la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ . Estos hallazgos concuerdan con estudios previos que muestran que la administración sistémica de MAPs selectivos del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  reduce el dolor tipo migraña y las conductas nociceptivas inducidas por el daño al nervio del trigémino (Fan et al., 2018; Tzeng et al., 2021; Vasović et al., 2019). Además, la administración intratecal de PZ-II-029 redujo la alodinia táctil en un modelo de dolor tipo fibromialgia (Gutiérrez-Agredano, 2022). En este sentido, la administración aguda de PZ-II-029 redujo la expresión de cFos (marcador de excitabilidad neuronal) en un modelo de dolor tipo migraña (Fan et al., 2018), mientras que el tratamiento intratecal con un siRNA dirigido contra receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  aumentó la expresión de p-ERK

(marcador de activación neuronal) e indujo el desarrollo de conductas nociceptivas en ratas (Kramer y Bellinger, 2013, 2014).

Es importante mencionar que la pérdida de la inhibición GABAérgica bajo condiciones de dolor neuropático puede estar mediada por los receptores metabotrópicos GABA<sub>B</sub> (Laffray et al., 2012), así como por otros receptores GABA<sub>A</sub>, por ejemplo el receptor GABA<sub>A-α5</sub> (Delgado-Lezama et al., 2021). Los receptores GABA<sub>A-α5</sub> están expresados en neuronas de la lámina I del asta dorsal de la médula espinal generando una corriente inhibitoria tónica en animales intactos (Hernandez-Reyes et al., 2019; Perez-Sanchez et al., 2017). Durante el dolor neuropático, la activación de los receptores GABA<sub>A-α5</sub> podría estar causando una despolarización tónica en las neuronas espinales, lo que contribuye a perpetuar el dolor (Delgado-Lezama et al., 2021; Hernández-Reyes et al., 2019). En contraste, la activación de los receptores GABA<sub>A-α6</sub> en condiciones de dolor crónico reduce las conductas nociceptivas (Chiou et al., 2018; Gutiérrez-Agredano, 2022; Tzeng et al., 2021; Vasović et al., 2019). A pesar que ambos receptores son extrasinápticos desempeñan funciones diferentes en condiciones de dolor crónico. Lo anterior podría explicarse por: *I*) la localización celular de ambos receptores. Se ha demostrado que, el receptor GABA<sub>A-α5</sub> está expresado en la lamina I de la médula espinal (Hernández-Reyes et al., 2019); mientras que nuestros resultados muestran que el receptor GABA<sub>A-α6</sub> está expresado desde la lámina II-V del asta dorsal de la médula espinal y *II*) la concentración intracelular de cloruro. La lesión a los nervios espinales reduce la expresión del cotransportador KCC2 (Coull et al., 2003). Sin embargo, esta reducción en la expresión de KCC2 solo se observó en la lámina I, pero no en laminas internas del asta dorsal de la médula espinal (Lorenzo et al., 2020). Lo anterior apoya nuestro hallazgo que la administración de MAPs del receptor GABA<sub>A-α6</sub> redujo las conductas nociceptivas inducidas por el daño a los nervios espinales. Lo anterior

---

posiblemente a través de generar una corriente inhibición tónica en neuronas localizadas en laminas internas de la médula espinal.

### **10.3. El receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ reduce de manera diferencial la alodinia táctil en ratas neuropáticas**

Las diferencias en los mecanismos que participan en el procesamiento de la información nociceptiva entre machos y hembras en condiciones fisiológicas o patológicas han sido ampliamente documentados (Abraham et al., 2018; De la Luz-Cuellar et al., 2019; Franco-Enzástiga et al., 2021; Mapplebeck et al., 2018; Martin et al., 2019; Patil et al., 2019; Ren et al., 2018; Rodríguez-Palma et al., 2022; Rosen et al., 2017; Sorge et al., 2011, 2015; Tavares-Ferreira et al., 2022; Taves et al., 2016). Nuestros resultados muestran que la proteína del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  es menor en ratas macho comparado con ratas hembra. Además, el efecto antinociceptivo de los MAPs del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  fue mayor en roedores hembra comparado con los animales machos. Se ha reportado que los niveles elevados de estradiol inducen un aumento del ARNm del gene *Gabra6* en neuronas del ganglio del trigémino bajo condiciones fisiológicas y de dolor inflamatorio (Puri et al., 2011). En este sentido, datos de nuestro laboratorio han demostrado que la reducción de las hormonas sexuales femeninas, mediante ovariectomía, disminuyó el efecto antinociceptivo de PZ-II-029 en ratas hembras con dolor tipo fibromialgia. Por su parte, la administración exógena de 17- $\beta$ -estradiol recuperó el efecto antinociceptivo de PZ-II-029 en ratas hembras con ovariectomía (Gutiérrez-Agredano, 2022). Además, la administración exógena de 17- $\beta$ -estradiol es capaz de revertir las conductas nociceptivas, de ansiedad y depresión que se observan en diferentes modelos de dolor crónico (Garrido-Suárez et al., 2015; Hernández-León et al., 2018; Pajot et al., 2003). En conjunto estos trabajos sugieren que las hormonas sexuales (17- $\beta$ -estradiol) tienen un papel importante en la modulación de la información nociceptiva; además de regular la función y expresión del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ . El estradiol ejerce sus efectos

---

biológicos a través de los receptores a estrógenos  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) y  $\beta$  (ER  $\beta$ ) (Chen et al., 2021). Estudios previos han demostrado que el ER $\alpha$  se localiza en neuronas sensoriales del GRD y en neuronas de la lámina 2 del asta dorsal de la médula espinal (Papka et al., 2001; Papka y Storey-Workley, 2002; Taleghany et al., 1999; VanderHorst et al., 2005). Nuestros datos muestran que el receptor GABA $_{A-\alpha 6}$  está expresado en mayor medida en neuronas del GRD y de la médula espinal de ratas hembra comparado con ratas macho. Lo anterior sugiere que el estradiol podría ser el responsable de los cambios moleculares y funcionales del receptor GABA $_{A-\alpha 6}$  en ratas hembras con dolor neuropático. Acorde con esto, se han demostrado que otros receptores GABA $_A$ , como el GABA $_{A-\alpha 5}$ , son regulados de manera dependiente del sexo (De la Luz-Cuellar et al., 2019). Además, el efecto antinociceptivo de L-655,708 (agonista inverso del receptor GABA $_{A-\alpha 5}$ ) en roedores depende del 17- $\beta$ -estradiol y de su receptor ER $\alpha$ , pero no del ER $\beta$  (Franco-Enzástiga et al., 2021).

#### **10.4. La restitución del receptor GABA $_{A-\alpha 6}$ reduce las conductas nociceptivas en animales con dolor neuropático**

. Nuestros datos muestran que el daño a los nervios espinales redujo la expresión proteica del receptor GABA $_{A-\alpha 6}$ . Lo anterior nos llevó a pensar que restaurar la expresión proteica del receptor GABA $_{A-\alpha 6}$  podría reducir las conductas nociceptivas que se presentan durante el dolor neuropático. La administración intratecal repetida del plásmido *Gabra6* redujo la alodinia táctil, la hiperalgesia muscular y el dolor espontáneo inducidos por la lesión a los nervios espinales. Adicionalmente, la inyección espinal del plásmido *Gabra6* restauró la expresión proteica del receptor GABA $_{A-\alpha 6}$  en la médula espinal. Hasta donde sabemos, ésta es la primera vez que se reporta el efecto de la restitución proteica del receptor GABA $_{A-\alpha 6}$  en animales con dolor neuropático. Se ha reportado que los vectores no virales, como el plásmido utilizado en este trabajo, tienen un bajo rendimiento para liberar el material genético (Glover et

al., 2005). Sin embargo, diversos grupos de trabajo han reportado que la administración intratecal de ADN plasmático es una herramienta útil para el tratamiento del dolor neuropático (García et al., 2021; Milligan et al., 2006; Yao et al., 2002). Además, el hecho que el plásmido *Gabra6*, pero no el plásmido control, induce un efecto antinociceptivo en animales neuropáticos sugiere que nuestra estrategia experimental funciona adecuadamente. Es importante resaltar que el receptor  $GABA_A-\alpha_6$  es un receptor extrasináptico y debido a su alta afinidad, el receptor  $GABA_A-\alpha_6$  puede ser activado por concentraciones bajas del neurotransmisor GABA. Por tal motivo, los resultados sugieren que restaurar la inhibición mediada por GABA, a través del aumentar los niveles del receptor  $GABA_A-\alpha_6$ , induce un efecto antinociceptivo bajo condiciones de dolor neuropático, como previamente se ha sugerido con otras aproximaciones experimentales (Juarez-Salinas et al., 2019; Manion et al., 2020).

#### **10.5. El receptor $GABA_A-\alpha_6$ se expresa en neuronas sensoriales de humano**

La falla en la traslación de los datos preclínicos obtenidos con fármacos GABAérgicos para el tratamiento del dolor crónico a la clínica (Gurrell et al., 2018; Zeilhofer et al., 2009), puede estar relacionado con las diferencias biológicas que presentan los nociceptores de roedores y humanos (Shiers et al., 2020; Tavares-Ferreira et al., 2022). Nuestros resultados muestran que el receptor  $GABA_A-\alpha_6$  está expresado en la médula espinal de humanos principalmente en neuronas CGRP<sup>+</sup> y, en menor medida, en neuronas P2X3<sup>+</sup>. Hasta donde sabemos, éste es el primer trabajo que demuestra que el receptor  $GABA_A-\alpha_6$  está expresado en neuronas peptidérgicas y no peptidérgicas en la médula espinal de humanos. Este resultado podría sugerir que el receptor  $GABA_A-\alpha_6$  presenta un patrón de expresión diferente al encontrado de la médula espinal de la rata, fenómeno que se suma a los trabajos que han reportado diferencias inter-especies (Ray et al., 2018; Shiers et al., 2021; Shiers et al., 2020; Tavares-Ferreira et al., 2022). En este sentido, los

receptores a opioides  $\mu$  y  $\delta$  tienen una expresión diferente en ratones y humanos. En ratones, los receptores  $\mu$  y  $\delta$  están expresados en neuronas peptidérgicas (CGRP<sup>+</sup>) y no-peptidérgicas (IB4<sup>+</sup>), respectivamente; mientras que en humanos estos receptores se localizan en neuronas TRPV1<sup>+</sup> (Moy et al., 2020). Además, el receptor mGluR5 está expresado en el GRD de roedores, pero no en humanos (Ray et al., 2018). A pesar que, algunos trabajos muestran diferencias en la expresión de algunos receptores entre especies, los mecanismos de señalización pareciera que se encuentran conservados entre especies (Middleton et al., 2021). En este sentido, nuestros resultados muestran que la activación del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  mediante la administración de PZ-II-029 o Ro15 45-13, en ratones y ratas, reduce la alodinia táctil de manera dependiente de la concentración. Acorde con esto, la activación de los receptores a opioides inhibió la función de los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje en ratones y humanos (Moy et al., 2020). Asimismo, la activación del receptor mGluR2 redujo la excitabilidad neuronal inducida por PGE<sub>2</sub> en ratones y humanos (Davidson et al., 2016). En contraste, la corriente iónica mediada por el receptor a acetilcolina es diferente entre ratas y ratones (Zhang et al., 2019). Lo anterior muestra que las diferencias inter-especies tienen un papel importante en la eficacia de fármacos con potencial aplicación terapéutica.

## 11. Conclusión

El receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  presente en las terminales centrales de las fibras aferentes primarias y en los ganglios de la raíz dorsal tiene un papel antinociceptivo bajo condiciones fisiológicas y patológicas. En conjunto nuestros datos permiten sugerir que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  podría ser un nuevo blanco farmacológico para el tratamiento del dolor neuropático.

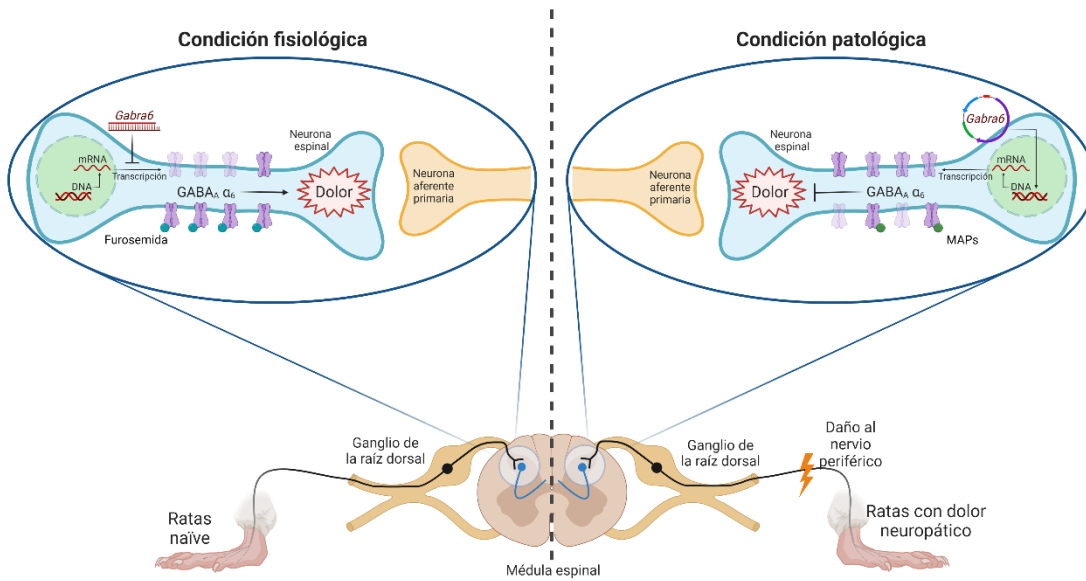


Figura 35. El receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  tiene un papel antinociceptivo en condiciones fisiológicas y patológicas.



## 12. Perspectivas

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo surgen algunas preguntas que deberían ser abordadas con el propósito de ampliar nuestro conocimiento sobre el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en el dolor crónico.

1. Los ensayos de inmunohistoquímica mostraron que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  está expresado en el asta dorsal de la médula espinal. Se sabe que las interneuronas PKC $\gamma$  y VGlut3 desempeñan un papel importante en el desarrollo de la alodinia táctil. Por lo tanto, es importante determinar si el efecto anti-alodínico del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  se debe a la reducción de la excitabilidad de esta población neuronal en particular.
2. Nuestro trabajo demostró que el receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  está expresado en células satelitales del GRD. Se ha descrito que, en condiciones de dolor crónico, las células satelitales liberan citocinas proinflamatorias que aumentan la actividad de los nociceptores. Por lo tanto, es de interés conocer si la activación selectiva del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en las células satelitales puede representar un blanco terapéutico para tratar el dolor crónico.
3. La administración repetida de PZ-II-029 en animales con dolor neuropático indujo un efecto antialodínico de larga duración y restauró la expresión proteica del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ . La actividad de los receptores GABA<sub>A</sub> puede ser aumentada por su inserción en la membrana plasmática a través de mecanismos dependientes de la cinasa PKC. Por lo tanto, sería relevante determinar si el PZ-II-029 podría estar regulando la expresión del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  por promover su inserción en la membrana plasmática, a través de un mecanismo dependiente de la fosforilación de la Ser385.
4. El efecto antialodínico de PZ-II-029 está determinado por el sexo de los animales. Datos previos han reportado que el estradiol modula la función y expresión del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$ . Sería de interés conocer si el estradiol u

otra hormona sexual desempeñan un papel importante en el efecto diferencial de PZ-II-029 en un modelo de dolor neuropático.

5. El silenciamiento de la subunidad  $\alpha_6$  en ratones jóvenes se ha relacionado con el desarrollo de conductas tipo depresión y ansiedad. La reducción en el número de levantamientos verticales (en nuestro trabajo) podría indicar un efecto ansiolítico de PZ-II-029. Por tal motivo, sería de particular interés explorar el potencial efecto antidepresivo o ansiolítico de PZ-II-029 en la depresión y ansiedad presentes en el dolor neuropático.
6. La expresión del receptor  $\text{GABA}_A\text{-}\alpha_6$  en la médula espinal de humano sugiere que dicho receptor puede desempeñar un papel importante en la modulación de la información nociceptiva. Debido a la falta de estudios del receptor  $\text{GABA}_A\text{-}\alpha_6$  en tejido de humanos, es importante analizar la funcionalidad de este receptor mediante técnicas electrofisiológicas en tejido de pacientes con dolor neuropático.
7. La administración de Ro 15-4513 redujo las conductas nociceptivas en animales neuropáticos. Debido a que este fármaco puede activar al receptor  $\text{GABA}_A\text{-}\alpha_4$  y  $\text{GABA}_A\text{-}\alpha_6$ . Por lo tanto, se abre la posibilidad de explorar la participación del receptor  $\text{GABA}_A\text{-}\alpha_4$  en esta forma de dolor crónico.

---

### 13. Referencias

- Abdullah, M., Chai, P. S., Chong, M. Y., Tohit, E. R. M., Ramasamy, R., Pei, C. P., Vidyadaran, S. (2012). Gender effect on in vitro lymphocyte subset levels of healthy individuals. *Cellular Immunology*, 272(2), 214–219.
- Abe, T., Matsumura, S., Katano, T., Mabuchi, T., Takagi, K., Xu, L., Yamamoto, A., Hattori, K., Yagi, T., Watanabe, M., Nakazawa, T., Yamamoto, T., Mishina, M., Nakai, Y., Ito, S. (2005). Fyn kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit at Tyr1472 is essential for maintenance of neuropathic pain. *European Journal of Neuroscience*, 22(6), 1445–1454.
- Abraham, A. D., Schattauer, S. S., Reichard, K. L., Cohen, J. H., Fontaine, H. M., Song, A. J., Johnson, S. D., Land, B. B., Chavkin, C. (2018). Estrogen regulation of GRK2 inactivates kappa opioid receptor signaling mediating analgesia, but not aversion. *The Journal of Neuroscience*, 38(37), 8031.
- Alles, S. R. A., Smith, P. A. (2018). Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. *Pharmacological Reviews*, 70(3), 315–347.
- Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noël, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., Borsotto, M., Romey, G., Heurteaux, C., Reeh, P., Eschalier, A., Lazdunski, M. (2006). TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in polymodal pain perception. *The EMBO Journal*, 25(11), 2368.
- Aloisi, A. (2003). Gonadal hormones and sex differences in pain reactivity : The Clinical Journal of Pain. *The Clinical Journal of Pain*, 19, 168–174.
- Alsalem, M., Haddad, M., Altarifi, A., Aldossary, S., Kalbouneh, H., Abojaradeh, A., El-Salem, K. (2020). Impairment in locomotor activity as

- 
- an objective measure of pain and analgesia in a rat model of osteoarthritis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(6), 1–1.
- Álvarez-Leefmans, F. J., Delpire, E. (2009). *Physiology and pathology of chloride transporters and channels in the nervous system : from molecules to diseases*. Elsevier/Academic.
- Álvarez-Leefmans, F. J., Gamiño, S. M., Giraldez, F., Noguerón, I. (1988). Intracellular chloride regulation in amphibian dorsal root ganglion neurones studied with ion-selective microelectrodes. *The Journal of Physiology*, 406, 225–46.
- Álvarez-Leefmans, F. J., León-Olea, M., Mendoza-Sotelo, J., Álvarez, F. J., Antón, B., Garduo, R. (2001). Immunolocalization of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter in peripheral nervous tissue of vertebrates. *Neuroscience*, 104(2), 569–582.
- Amir, R., Kocsis, J. D., Devor, M. (2005). Multiple interacting sites of ectopic spike electrogenesis in primary sensory neurons. *The Journal of Neuroscience*, 25(10), 2576–2585.
- Andres, C., Aguilar, J., González-Ramírez, R., Elias-Viñas, D., Felix, R., Delgado-Lezama, R. (2014). Extrasynaptic  $\alpha_6$  subunit-containing GABA<sub>A</sub> receptors modulate excitability in turtle spinal motoneurons. *PLoS ONE*, 9(12), e115378.
- Artola, A., Voisin, D., Dallel, R. (2020). PKC $\gamma$  interneurons, a gateway to pathological pain in the dorsal horn. *Journal of Neural Transmission*, 127(4), 527–540.
- Ataka, T., Gu, J. (2006). Relationship between tonic inhibitory currents and phasic inhibitory activity in the spinal cord lamina II region of adult mice.

---

*Molecular Pain*, 2(1), 36.

- Avona, A., Burgos-Ega, C., Burton, M. D., Akopian, A. N., Price, T. J., Dussor, G. (2019). Dural calcitonin gene-related peptide produces female-specific responses in rodent migraine models. *Journal of Neuroscience*, 39(22), 4323–4331.
- Bahn, S., Harvey, R. J., Darlison, M. G., Wisden, W. (1996). Conservation of gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 6 subunit gene expression in cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry*, 66(5), 1810–1818.
- Bartley, E. J., Fillingim, R. B. (2013). Sex differences in pain: a brief review of clinical and experimental findings. *British Journal of Anaesthesia*, 111(1), 52–58.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2), 267–84.
- Beggs, S., Liu, X. J., Kwan, C., Salter, M. W. (2010). Peripheral nerve injury and TRPV1-expressing primary afferent C-fibers cause opening of the blood-brain barrier. *Molecular Pain*, 6(74).
- Beggs, S., Salter, M. W. (2013). The known knowns of microglia-neuronal signalling in neuropathic pain. *Neuroscience Letters*, 557 Pt A, 37–42.
- Beggs, S., Trang, T., Salter, M. W. (2012). P2X4R+ microglia drive neuropathic pain. *Nature Neuroscience*, 15(8), 1068–1073.
- Belelli, D., Lambert, J. J. (2005). Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA<sub>A</sub> receptor. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(7), 565–575.
- Belelli, D., Lambert, J. J., Peters, J. A., Wafford, K., Whiting, P. J. (1997). The

- interaction of the general anesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor is influenced by a single amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), 11031–11036.
- Ben-ari, Y. (2007). Un transmetteur pionnier pour la construction du cerveau. *Medicine Sciences*, 23, 751–755.
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(9), 728–739.
- Berry, P. H., Katz, J. A., Chapman, R., Miaskowski, C., Covington, E., McLean, M., Dahl, J. L. (2001). *Pain: Current understanding of assessment, management, and treatments* (1st ed.). USA: NATIONAL PHARMACEUTICAL COUNCIL, INC.
- Bianchi, M. T., Haas, K. F., Macdonald, R. L. (2002). Alpha1 and alpha6 subunits specify distinct desensitization, deactivation and neurosteroid modulation of GABA<sub>A</sub> receptors containing the delta subunit. *Neuropharmacology*, 43(4), 492–502.
- Bianchi, Matt T., Macdonald, R. L. (2003). Neurosteroids shift partial agonist activation of GABA<sub>A</sub> receptor channels from low- to high-efficacy gating patterns. *Journal of Neuroscience*, 23(34), 10934–10943.
- Biggs, J. E., Yates, J. M., Loescher, A. R., Clayton, N. M., Robinson, P. P., Boissonade, F. M. (2008). Effect of SB-750364, a specific TRPV1 receptor antagonist, on injury-induced ectopic discharge in the lingual nerve. *Neuroscience Letters*, 443(1), 41–45.
- Bijur, P. E., Esses, D., Birnbaum, A., Chang, A. K., Schechter, C., Gallagher, E. J. (2008). Response to morphine in male and female patients:

- analgesia and adverse events. *The Clinical Journal of Pain*, 24(3), 192–198.
- Binshtok, A. M., Wang, H., Zimmermann, K., Amaya, F., Vardeh, D., Shi, L., Brenner, G. J., Ji, R. R., Bean, B. P., Woolf, C. J., Samad, T. A. (2008). Nociceptors Are Interleukin-1 $\beta$  Sensors. *The Journal of Neuroscience*, 28(52), 14062.
- Black, J. A., Frézel, N., Dib-Hajj, S. D., Waxman, S. G. (2012). Expression of Nav1.7 in DRG neurons extends from peripheral terminals in the skin to central preterminal branches and terminals in the dorsal horn. *Molecular Pain* 2012 8:1, 8(1), 1–11.
- Bleakman, D., Alt, A., Nisenbaum, E. S. (2006). Glutamate receptors and pain. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 17(5), 592–604.
- Boerner, K. E., Keogh, E. (2021). The effect of sex and gender on child and adolescent pain. *Oxford Textbook of Pediatric Pain*, 127–135.
- Bonin, R. P., De Koninck, Y. (2013). Restoring ionotropic inhibition as an analgesic strategy. *Neuroscience Letters*, 557, 43–51.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54.
- Bravo-Hernández, M., Corleto, J., Barragán-Iglesias, P., González-Ramírez, R., Pineda-Farias, J., Felix, R., Calcutt, N., Delgado-Lezama, R., Marsala, M., Granados-Soto, V. (2016). The  $\alpha_5$  subunit containing GABA<sub>A</sub> receptors contribute to chronic pain. *Pain*, 157(3), 613–626.
- Brinton, R. D., Nilsen, J. T. (2001). Sex hormones and their brain receptors. In *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences* (pp.

---

13946–13951). Pergamon.

- Burt, D. R., Kamatchi, G. L. (1991). GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB Journal*, 5(14), 2916–23.
- Cain, D. M., Khasabov, S. G., Simone, D. A. (2001). Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study. *Journal of Neurophysiology*, 85(4), 1561–1574.
- Calvo, M., Dawes, J. M., Bennett, D. L. H. (2012). The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. *The Lancet. Neurology*, 11(7), 629–642.
- Campbell, J. N., Raja, S. N., Meyer, R. A., Mackinnon, S. E. (1988). Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain*, 32(1), 89–94.
- Carver, C. M., Reddy, D. S. (2013). Neurosteroid interactions with synaptic and extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors: regulation of subunit plasticity, phasic and tonic inhibition, and neuronal network excitability. *Psychopharmacology*, 230(2), 151–188.
- Cata, J. P., Weng, H. R., Chen, J. H., Dougherty, P. M. (2006). Altered discharges of spinal wide dynamic range neurons and down-regulation of glutamate transporter expression in rats with paclitaxel-induced hyperalgesia. *Neuroscience*, 138(1), 329–338.
- Caterina, M. J., Julius, D. (1999). Sense and specificity: a molecular identity for nociceptors. *Current Opinion in Neurobiology*, 9(5), 525–530.
- Cepeda, M. S., Carr, D. B. (2003). Women experience more pain and require more morphine than men to achieve a similar degree of analgesia. *Anesthesia and Analgesia*, 97(5), 1464–1468.



- 
- Cervero, F., Laird, J. M. (1996). Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): A new model. *Pain*, 68(1), 13–23.
- Cervero, Fernando, Laird, J. M., García-Nicas, E. (2003). Secondary hyperalgesia and presynaptic inhibition: An update. *European Journal of Pain*, 7(4), 345–351.
- Chaplan, S., Bach, F., Pogrel, J., Chung, J., Yaksh, T. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*, 53(1), 55–63.
- Chattopadhyaya, B., Di Cristo, G., Wu, C. Z., Knott, G., Kuhlman, S., Fu, Y., Palmiter, R. D., Huang, Z. J. (2007). GAD67-mediated GABA Synthesis and Signaling Regulate Inhibitory Synaptic Innervation in the Visual Cortex. *Neuron*, 54(6), 889.
- Chen, G., Xie, R. G., Gao, Y. J., Xu, Z. Z., Zhao, L. X., Bang, S., Berta, T., Park, C. K., Lay, M., Chen, W., Ji, R. R. (2016).  $\beta$ -arrestin-2 regulates NMDA receptor function in spinal lamina II neurons and duration of persistent pain. *Nature Communications*, 7, 12531.
- Chen, J. T., Guo, D., Campanelli, D., Frattini, F., Mayer, F., Zhou, L., Kuner, R., Heppenstall, P. A., Knipper, M., Hu, J. (2014). Presynaptic GABAergic inhibition regulated by BDNF contributes to neuropathic pain induction. *Nature Communications*, 5, 5331.
- Chen, Q., Zhang, W., Sadana, N., Chen, X. (2021). Estrogen receptors in pain modulation: cellular signaling. *Biology of Sex Differences* 2021 12:1, 12(1), 1–10.
- Chiou, L. C., Lee, H. J., Ernst, M., Huang, W. J., Chou, J. F., Chen, H. L., Mouri, A., Chen, L. C., Treven, M., Mamiya, T., Fan, P. C., Knutson, D.

- 
- E., Witzigmann, C., Cook, J., Sieghart, W., Nabeshima, T. (2018). Cerebellar  $\alpha_6$ -subunit-containing GABA<sub>A</sub> receptors: a novel therapeutic target for disrupted prepulse inhibition in neuropsychiatric disorders. *British Journal of Pharmacology*, 175(12), 2414–2427.
- Chiu, I. M., Von Hehn, C. A., Woolf, C. J. (2012). Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nature Neuroscience*, 15(8), 1063–1067.
- Cohen, S. P., Vase, L., Hooten, W. M. (2021). Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. *The Lancet*, 397(10289), 2082–2097.
- Costigan, M., Scholz, J., Woolf, C. J. (2009). Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual Review of Neuroscience*, 32(1), 1–32.
- Costigan, M., Woolf, C. J. (2000). Pain: Molecular mechanisms. *The Journal of Pain*, 1(3), 35–44.
- Coull, J., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S. A., Nault, F., SÍk, A., De Koninck, P., 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, JA, Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M. W., De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 438(7070), 1017–1021.
- Covarrubias-Gómez, A., Guevara-López, U., Guitiérrez-Salmerón, C., Betancourt-Sandoval, J. A., Córdova-Domínguez, J. A. (2010).

- 
- Epidemiología del dolor crónico en México. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 33(4), 207–213.
- D’Hulst, C., Atack, J. R., Kooy, R. F. (2009). The complexity of the GABA<sub>A</sub> receptor shapes unique pharmacological profiles. *Drug Discovery Today*, 14(17–18), 866–875.
- D’Mello, A. M., Stoodley, C. J. (2015). Cerebro-cerebellar circuits in autism spectrum disorder. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 408.
- Davidson, S., Golden, J. P., Copits, B. A., Ray, P. R., Vogt, S. K., Valtcheva, M. V., Schmidt, R. E., Ghetti, A., Price, T. J., Gereau, R. W. (2016). Group II mGluRs suppress hyperexcitability in mouse and human nociceptors. *Pain*, 157(9), 2081.
- De la Luz-Cuellar, Y. E., Rodríguez-Palma, E. J., Franco-Enzástiga, Ú., Salinas-Abarca, A. B., Delgado-Lezama, R., Granados-Soto, V. (2019). Blockade of spinal  $\alpha_5$ -GABA<sub>A</sub> receptors differentially reduces reserpine-induced fibromyalgia-type pain in female rats. *European Journal of Pharmacology*, 858.
- DeLeo, J. A., Rutkowski, M. D. (2000). Gender differences in rat neuropathic pain sensitivity is dependent on strain. *Neuroscience Letters*, 282(3), 197–199.
- DeLeo, J., Sorkin, L., Watkins, L. (2007). *Immune and glial regulation of pain*. Seattle, WA.
- Delgado-Lezama, R., Bravo-Hernández, M., Franco-Enzástiga, Ú., De la Luz-Cuellar, Y., Alvarado-Cervantes, N., Raya-Tafolla, G., Martínez-Zaldivar, L., Vargas-Parada, A., Rodríguez-Palma, E., Vidal-Cantú, G., Guzmán-Priego, C., Torres-López, J., Murbartián, J., Felix, R., Granados-Soto, V.

- 
- (2021). The role of spinal cord extrasynaptic  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> receptors in chronic pain. *Physiological Reports*, 9(16), e14984.
- Delgado-Lezama, R., Loeza-Alcocer, E., Andres, C., Aguilar, J., Guertin, P., Felix, R. (2013). Extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors in the brainstem and spinal cord: structure and function. *Current Pharmaceutical Design*, 19(24), 4485–97.
- Delpire, E., Days, E., Lewis, L. M., Mi, D., Kim, K., Lindsley, C. W., Weaver, C. D. (2009). Small-molecule screen identifies inhibitors of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(13), 5383.
- Devor, M. (2006). Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *The Journal of Pain*, 7(1), S3–S12.
- Dib-Hajj, S. D., Yang, Y., Black, J. A., Waxman, S. G. (2012). The Nav1.7 sodium channel: from molecule to man. *Nature Reviews Neuroscience* 2012 14:1, 14(1), 49–62.
- Dixon, W. J. (1980). Efficient analysis of experimental observations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 20, 441–62.
- Dodds, K. N., Beckett, E. A. H., Evans, S. F., Grace, P. M., Watkins, L. R., Hutchinson, M. R. (2016). Glial contributions to visceral pain: implications for disease etiology and the female predominance of persistent pain. *Translational Psychiatry* 2016 6:9, 6(9), e888–e888.
- Dong, X. W., Goregoaker, S., Engler, H., Zhou, X., Mark, L., Crona, J., Terry, R., Hunter, J., Priestley, T. (2007). Small interfering RNA-mediated selective knockdown of Nav1.8 tetrodotoxin-resistant sodium channel reverses mechanical allodynia in neuropathic rats. *Neuroscience*, 146(2),

---

812–821.

- Doyon, N., Prescott, S., Castonguay, A., Godin, A., Kröger, H., De Koninck, Y. (2011). Efficacy of synaptic inhibition depends on multiple, dynamically interacting mechanisms implicated in chloride homeostasis. *PLOS Computational Biology*, 7(9), e1002149.
- Egawa, K., Kitagawa, K., Inoue, K., Takayama, M., Takayama, C., Saitoh, S., Kishino, T., Kitagawa, M., Fukuda, A. (2012). Decreased tonic inhibition in cerebellar granule cells causes motor dysfunction in a mouse model of Angelman syndrome. *Science Translational Medicine*, 4(163).
- Egloff, N., Cámara, R. J. A., von Känel, R., Klingler, N., Marti, E., Ferrari, M. L. G. (2014). Hypersensitivity and hyperalgesia in somatoform pain disorders. *General Hospital Psychiatry*, 36(3), 284–290.
- Ekberg, J., Jayamanne, A., Vaughan, C. W., Aslan, S., Thomas, L., Mould, J., Drinkwater, R., Baker, M. D., Abrahamsen, B., Wood, J. N., Adams, D. J., Christie, M. J., Lewis, R. J. (2006).  $\mu$ O-conotoxin MrVIB selectively blocks Nav1.8 sensory neuron specific sodium channels and chronic pain behavior without motor deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(45), 17030.
- Fan, P., Lai, T., Hor, C., Lee, M., Huang, P., Sieghart, W., Ernst, M., Knutson, D., Cook, J., Chiou, L. (2018). The  $\alpha_6$  subunit-containing GABA<sub>A</sub> receptor: a novel drug target for inhibition of trigeminal activation. *Neuropharmacology*, 140, 1–13.
- Farrant, M., Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA<sub>A</sub> receptors. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(3), 215–229.

- 
- Farrant, Mark, Kaila, K. (2007). The cellular, molecular and ionic basis of GABA<sub>A</sub> receptor signalling. In J. Tepper, E. Abercrombie, & Jp. Bolam (Eds.), *Progress in Brain Research* (Vol. 160, pp. 59–87). Elsevier.
- Fillingim, R. B., King, C. D., Ribeiro-Dasilva, M. C., Rahim-Williams, B., Riley, J. L. (2009). Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *The Journal of Pain*, 10(5), 447–485.
- Fisher, J. L. (2002). Amiloride inhibition of gamma-aminobutyric acid(A) receptors depends upon the alpha subunit subtype. *Molecular Pharmacology*, 61(6), 1322–1328.
- Franco-Enzástiga, Ú., García, G., Murbartián, J., González-Barrios, R., Salinas-Abarca, A., Sánchez-Hernández, B., Tavares-Ferreira, D., Herrera, L., Barragán-Iglesias, P., Delgado-Lezama, R., Price, T., Granados-Soto, V. (2021). Sex-dependent pronociceptive role of spinal  $\alpha_5$ -GABA<sub>A</sub> receptor and its epigenetic regulation in neuropathic rodents. *Journal of Neurochemistry*, 156(6), 897–916.
- Fukuoka, T., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Obata, K., Dai, Y., Noguchi, K. (2008). Comparative study of the distribution of the  $\alpha$ -subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 510(2), 188–206.
- Gao, Y. J., Ji, R. R. (2010). Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics*, 7(4), 482–493.
- García-González, A. I., Rosas-Carrasco, O. (2017). Herpes zoster (HZ) y neuralgia posherpética (NPH) en el adulto mayor: particularidades en la prevención, el diagnóstico y el tratamiento. *Gaceta Médica de México*, 153, 92–101.

- 
- Garcia-Nicas, E., Laird, J. M., Cervero, F., Laird, J. M. (2006). GABA<sub>A</sub> receptor blockade reverses the injury-induced sensitization of nociceptor-specific (NS) neurons in the spinal dorsal horn of the rat. *Journal of Neurophysiology*, 96, 661–670.
- García, G., Méndez-Reséndiz, K., Oviedo, N., Murbartían, J. (2021). PKC- and PKA-dependent phosphorylation modulates TREK-1 function in naïve and neuropathic rats. *Journal of Neurochemistry*, 157(6), 2039–2054.
- Garrido-Suárez, B., Garrido-Garrido, G., Castro-Labrada, M., Menéndez, A., Menéndez-Soto del Valle, R., Delgado-Hernández, R. (2015). Ovariectomy-induced chronic abdominal hypernociception in rats: Relation with brain oxidative stress. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 3(6), 148–161.
- Gilron, I., Baron, R., Jensen, T. (2015). Neuropathic pain: principles of diagnosis and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 90(4), 532–545.
- Glover, D. J., Lipps, H. J., Jans, D. A. (2005). Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nature Reviews Genetics* 2005 6:4, 6(4), 299–310.
- Gold, M. S., Stucky, C. L. (2020). Molecular Biology of the Nociceptor/Transduction. In B. Fritzsche (Ed.), *The Senses: A Comprehensive Reference* (2nd ed., pp. 88–119). Elsevier.
- Gold, M. S., Weinreich, D., Kim, C. S., Wang, R., Treanor, J., Porreca, F., Lai, J. (2003). Redistribution of NaV1.8 in Uninjured Axons Enables Neuropathic Pain. *The Journal of Neuroscience*, 23(1), 158.
- Grace, P. M., Hutchinson, M. R., Maier, S. F., Watkins, L. R. (2014).

- 
- Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nature Reviews Immunology*, 14(4), 217–231.
- Granados-Soto, V., Arguelles, C. F., Álvarez-Leefmans, F. J. (2005). Peripheral and central antinociceptive action of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter blockers on formalin-induced nociception in rats. *Pain*, 114(1–2), 231–238.
- Greenspan, J. D., Craft, R. M., LeResche, L., Arendt-Nielsen, L., Berkley, K. J., Fillingim, R. B., Gold, M. S., Holdcroft, A., Lautenbacher, S., Mayer, E. A., Mogil, J. S., Murphy, A. Z., Traub, R. J. (2007). Studying sex and gender differences in pain and analgesia: a consensus report. *Pain*, 132(SUPPL. 1).
- Gurrell, R., Dua, P., Feng, G., Sudworth, M., Whitlock, M., Reynolds, D., Butt, R. (2018). A randomised, placebo-controlled clinical trial with the  $\alpha_{2/3/5}$  subunit selective GABA<sub>A</sub> positive allosteric modulator PF-06372865 in patients with chronic low back pain. *Pain*, 159(9), 1742–1751.
- Gutiérrez-Agredano, M. (2022). *Efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la función de los receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha_6$  en un modelo de fibromialgia en ratas*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.
- Gutierrez, A., Khan, Z., De Blas, A. (1996). Immunocytochemical localization of the alpha 6 subunit of the gamma-aminobutyric acid A receptor in the rat nervous system. *Journal of Comparative Neurology*, 365(3), 504–510.
- Hadingham, K., Garrett, E., Wafford, K., Heavens, R., Sirinathsinghji, D., Whiting, P. (1996). Cloning of cDNAs encoding the human gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 6 subunit and characterization of the pharmacology of alpha 6-containing receptors. *Molecular Pharmacology*, 49(2), 253–259.



- 
- Han, H. J., Lee, S. W., Kim, G. T., Kim, E. J., Kwon, B., Kang, D., Kim, H. J., Seo, K. S. (2016). Enhanced expression of TREK-1 is related with chronic constriction injury of neuropathic pain mouse model in dorsal root ganglion. *Biomolecules & Therapeutics*, 24(3), 252.
- Handforth, A., Kadam, P. A., Kosoyan, H. P., Eslami, P. (2018). Suppression of harmaline tremor by activation of an extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptor: implications for essential tremor. *Tremor and Other Hyperkinetic Movements*, 8, 546.
- Hernández-León, A., De la Luz-Cuellar, Y. E., Granados-Soto, V., González-Trujano, M. E., Fernández-Guasti, A. (2018). Sex differences and estradiol involvement in hyperalgesia and allodynia in an experimental model of fibromyalgia. *Hormones and Behavior*, 97, 39–46.
- Hernández-Reyes, J. E., Salinas-Abarca, A. B., Vidal-Cantu, G. C., Raya-Tafolla, G., Elias-Viñas, D., Granados-Soto, V., Delgado-Lezama, R. (2019).  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> receptors play a pro-nociceptive role and avoid the rate dependent depression of the Hoffmann reflex in diabetic neuropathic pain and reduce primary afferent excitability. *Pain*, 160(6), 1448–1458.
- Hu, H. J., Gereau, R. W. (2011). Metabotropic glutamate receptor 5 regulates excitability and Kv4.2-containing K<sup>+</sup> channels primarily in excitatory neurons of the spinal dorsal horn. *Journal of Neurophysiology*, 105(6), 3010–3021.
- Huang, Y.-H., Lee, M. T., Sieghart, W., Knutson, D. E., Wimmer, L. R., Sharmin, D., Cook, J., Mihovilovic, M. D., Chiou, L.-C. (2021). Positive modulation of cerebellar  $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub> receptors for treating essential tremor: a proof-of-concept study in harmaline-treated mice. *BioRxiv*, 2021.04.19.440397.

- 
- Huang, Y. J., Lee, K. H., Murphy, L., Garraway, S. M., Grau, J. W. (2016). Acute spinal cord injury (SCI) transforms how GABA affects nociceptive sensitization. *Experimental Neurology*, 285(Pt A), 82–95.
- Iura, A., Takahashi, A., Hakata, S., Mashimo, T., Fujino, Y. (2016). Reductions in tonic GABAergic current in substantia gelatinosa neurons and GABA<sub>A</sub> receptor  $\delta$  subunit expression after chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice. *European Journal of Pain*, 20(10), 1678–1688.
- Jarvis, M. F., Honore, P., Shieh, C. C., Chapman, M., Joshi, S., Zhang, X. F., Kort, M., Carroll, W., Marron, B., Atkinson, R., Thomas, J., Liu, D., Krambis, M., Liu, Y., McGaraughty, S., Chu, K., Roeloffs, R., Zhong, C., Mikusa, J. P., Hernández, G., Gauvin, D., Wade, C., Zhu, C., Pai, M., Scanio, M., Shi, L., Drizin, I., Gregg, R., Matulenko, M., Hakeem, A., Gross, M., Johnson, M., Marsh, K., Wagoner, P. K., Sullivan, J. P., Faltynek, C. R., Krafte, D. S. (2007). From the Cover: A-803467, a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(20), 8520.
- Jechlinger, M., Pelz, R., Tretter, V., Klausberger, T., Sieghart, W. (1998). Subunit composition and quantitative importance of hetero-oligomeric receptors: GABA<sub>A</sub> receptors containing alpha6 subunits. *The Journal of Neuroscience*, 18(7), 2449–2457.
- Jensen, T S, Gottrup, H., Sindrup, S. H., Bach, F. W. (2001). The clinical picture of neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*, 429(1–3), 1–11.
- Jensen, Troels S., Finnerup, N. B. (2014). Allodynia and hyperalgesia in

- 
- neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *The Lancet. Neurology*, 13(9), 924–935.
- Ji, R. R., Kohno, T., Moore, K. A., Woolf, C. J. (2003). Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends in Neurosciences*, 26(12), 696–705.
- Jin, X. T., Galvan, A., Wichmann, T., Smith, Y. (2011). Localization and Function of GABA Transporters GAT-1 and GAT-3 in the Basal Ganglia. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5(63).
- Juarez-Salinas, D., Braz, J., Etlin, A., Gee, S., Sohal, V., Basbaum, A. (2019). GABAergic cell transplants in the anterior cingulate cortex reduce neuropathic pain aversiveness. *Brain*, 142(9), 2655–2669.
- Kahle, K. T., Staley, K. J., Nahed, B. V, Gamba, G., Hebert, S. C., Lifton, R. P., Mount, D. B. (2008). Roles of the cation–chloride cotransporters in neurological disease. *Nature Clinical Practice Neurology*, 4(9), 490–503.
- Karim, F., Wang, C. C., Gereau IV, R. W. (2001). Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 are activators of extracellular signal-regulated kinase signaling required for inflammatory pain in mice. *The Journal of Neuroscience*, 21(11), 3771–3779.
- Katz, N. (2002). The impact of pain management on quality of life. *Journal of Pain and Symptom Management*, 24(1), 38–47.
- Kavvadias, D., Sand, P., Youdim, K. A., Qaiser, M. Z., Rice-Evans, C., Baur, R., Sigel, E., Rausch, W. D., Riederer, P., Schreier, P. (2004). The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood-brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. *British Journal of Pharmacology*, 142(5), 811–820.

- 
- 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. *Molecular Pain*, 3, 1744-8069-3–27.
- Kelly, M. J., Loose, M. D., Ronnekleiv, O. K. (1992). Estrogen suppresses mu-opioid- and GABA<sub>B</sub>-mediated hyperpolarization of hypothalamic arcuate neurons. *The Journal of Neuroscience*, 12(7), 2745–2750.
- Kidd, B. L., Urban, L. A. (2001). Mechanisms of inflammatory pain. *British Journal of Anaesthesia*, 87(1), 3–11.
- Kim, H., Hwang, S., Lee, S., Kim, S., Abdi, S. (2016). Pentoxifylline ameliorates mechanical hyperalgesia in a rat model of chemotherapy-induced neuropathic pain. *Pain Physician*, 19(4), E589–E600.
- Kim, S. H., Chung, J. M. (1992). An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, 50(1988), 355–363.
- Kleppner, S. R., Tobin, A. J. (2002). GABA. *Encyclopedia of the Human Brain*, 353–367.
- Kogelman, L. J. A., Christensen, R. E., Pedersen, S. H., Bertalan, M., Hansen, T. F., Jansen-Olesen, I., Olesen, J. (2017). Whole transcriptome expression of trigeminal ganglia compared to dorsal root ganglia in *Rattus Norvegicus*. *Neuroscience*, 350, 169–179.
- Korpi, E., Debus, F., Linden, A. M., Malécot, C., Leppä, E., Vekovischeva, O., Rabe, H., Böhme, I., Aller, M. I., Wisden, W., Lüddens, H. (2007). Does ethanol act preferentially via selected brain GABA<sub>A</sub> receptor subtypes? the current evidence is ambiguous. *Alcohol*, 41(3), 163–176.

- 
- Korpi, E., Lüddens, H. (1997). Furosemide interactions with brain GABA<sub>A</sub> receptors. *British Journal of Pharmacology*, 120(5), 741–748.
- Korpi, E. R., Kuner, T., Seeburg, P. H., Lüddens, H. (1995). Selective antagonist for the cerebellar granule cell-specific gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Molecular Pharmacology*, 47(2).
- Kosaka, Y., Yafuso, T., Shimizu-Okabe, C., Kim, J., Kobayashi, S., Okura, N., Ando, H., Okabe, A., Takayama, C. (2020). Development and persistence of neuropathic pain through microglial activation and KCC2 decreasing after mouse tibial nerve injury. *Brain Research*, 1733.
- Kramer, P., Bellinger, L. (2013). Reduced GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha_6$  expression in the trigeminal ganglion enhanced myofascial nociceptive response. *Neuroscience*, 245, 1–11.
- Kramer, P. R., Bellinger, L. L. (2013). Reduced GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha_6$  expression in the trigeminal ganglion enhanced myofascial nociceptive response. *Neuroscience*, 245, 1–11.
- Kramer, P. R., Bellinger, L. L. (2014). Infusion of Gabra6 siRNA into the trigeminal ganglia increased the myogenic orofacial nociceptive response of ovariectomized rats treated with 17 $\beta$ -estradiol. *Neuroscience*, 278, 144–153.
- Kuo, Y. L., Cheng, J. K., Hou, W. H., Chang, Y. C., Du, P. H., Jian, J. J., Rau, R. H., Yang, J. H., Lien, C. C., Tsaur, M. L. (2017). K<sup>+</sup> channel modulatory subunits KChIP and DPP participate in Kv4-mediated mechanical pain control. *The Journal of Neuroscience*, 37(16), 4391.
- Kuzanwinska, O., Lis, K., Cuda, A., Balkowiec-Iskra, E. (2014). Gender differences in the neurochemical response of trigeminal ganglion

- 
- neurons to peripheral inflammation in mice. *Acta Neurobiologiae Experimentalis Journal*, 74(2), 227–232.
- Laffray, S., Bouali-Benazzouz, R., Papon, M. A., Favereaux, A., Jiang, Y., Holm, T., Spriet, C., Desbarats, P., Fossat, P., Le Feuvre, Y., Decossas, M., Hliot, L., Langel, U., Nagy, F., Landry, M. (2012). Impairment of GABA<sub>B</sub> receptor dimer by endogenous 14-3-3 $\zeta$  in chronic pain conditions. *The EMBO Journal*, 31(15), 3239–3251.
- Lamigeon, C., Bellier, J. P., Sacchettoni, S., Rujano, M., Jacquemont, B. (2001). Enhanced neuronal protection from oxidative stress by coculture with glutamic acid decarboxylase-expressing astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 77(2), 598–606.
- Latremoliere, A., Woolf, C. J. (2010). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *Journal of Pain*, 10(9), 895–926.
- Laurie, D. J., Seeburg, P. H., Wisden, W. (1992). The distribution of 13 GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *The Journal of Neuroscience*, 12(3), 1063–1076.
- Lautenbacher, S., Rollman, G. B. (1993). Sex differences in responsiveness to painful and non-painful stimuli are dependent upon the stimulation method. *Pain*, 53(3), 255–264.
- Lee, I., Lim, E. (2010). Intracisternal or intrathecal glycine, taurine, or muscimol inhibit bicuculline-induced allodynia and thermal hyperalgesia in mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(8), 907–14.
- LeResche, L., Mancl, L., Sherman, J. J., Gandara, B., Dworkin, S. F. (2003). Changes in temporomandibular pain and other symptoms across the

- menstrual cycle. *Pain*, 106(3), 253–261.
- Li, L. H., Wang, Z. C., Yu, J., Zhang, Y. Q. (2014). Ovariectomy results in variable changes in nociception, mood and depression in adult female rats. *PloS One*, 9(4).
- Liu, X. J., Gingrich, J. R., Vargas-Caballero, M., Dong, Y. N., Sengar, A., Beggs, S., Wang, S. H., Ding, H. K., Frankland, P. W., Salter, M. W. (2008). Treatment of inflammatory and neuropathic pain by uncoupling Src from the NMDA receptor complex. *Nature Medicine*, 14(12), 1325–1332.
- Loeza-Alcocer, E., Canto-Bustos, M., Aguilar, J., González-Ramírez, R., Felix, R., Delgado-Lezama, R. (2013).  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptors mediate primary afferent fiber tonic excitability in the turtle spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 110, 2175–2184.
- Lorenzo, L. E., Godin, A. G., Ferrini, F., Bachand, K., Plasencia-Fernandez, I., Labrecque, S., Girard, A. A., Boudreau, D., Kianicka, I., Gagnon, M., Doyon, N., Ribeiro-da-Silva, A., De Koninck, Y. (2020). Enhancing neuronal chloride extrusion rescues  $\alpha_2/\alpha_3$  GABA<sub>A</sub>-mediated analgesia in neuropathic pain. *Nature Communications*, 11(1), 869.
- Lu, V. B., Biggs, J. E., Stebbing, M. J., Balasubramanyan, S., Todd, K. G., Lai, A. Y., Colmers, W. F., Dawbarn, D., Ballanyi, K., Smith, P. A. (2009). Brain-derived neurotrophic factor drives the changes in excitatory synaptic transmission in the rat superficial dorsal horn that follow sciatic nerve injury. *The Journal of Physiology*, 587(Pt 5), 1013–1032.
- Lüddens, H., Pritchett, D. B., Köhler, M., Killisch, I., Keinänen, K., Monyer, H., Sprengel, R., Seeburg, P. H. (1990). Cerebellar GABA<sub>A</sub> receptor selective for a behavioural alcohol antagonist. *Nature*, 346(6285), 648–

---

651.

- Macdonald, R., Botzolakis, E. (2009). Physiology and pathology of chloride transporters and channels in the nervous system: from molecules to diseases. In F. J. Alvarez-Leefmans & E. Delpire (Eds.), *GABA<sub>A</sub> receptors channels* (1st ed., pp. 257–271). Elsevier Academic Press.
- Manion, J., Khuong, T., Harney, D., Littleboy, J., Ruan, T., Loo, L., Costigan, M., Larance, M., Caron, L., Neely, G. (2020). Human induced pluripotent stem cell-derived GABAergic interneuron transplants attenuate neuropathic pain. *Pain*, *161*(2), 379–387.
- Mapplebeck, J., Dalgarno, R., Tu, Y., Moriarty, O., Beggs, S., Kwok, C., Halievski, K., Assi, S., Mogil, J., Trang, T., Salter, M. (2018). Microglial P2X4R-evoked pain hypersensitivity is sexually dimorphic in rats. *Pain*, *159*(9), 1752–1763.
- Marchand, F., Perretti, M., McMahon, S. B. (2005). Role of the Immune system in chronic pain. *Nature Reviews Neuroscience* *2005* *6*:7, *6*(7), 521–532.
- Marcus, D. A. (1995). Interrelationships of neurochemicals, estrogen, and recurring headache. *Pain*, *62*(2), 129–139.
- Martin, D. L., Rimvall, K. (1993). Regulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid synthesis in the brain. *Journal of Neurochemistry*, *60*(2), 395–407.
- Martin, L., Acland, E., Cho, C., Gandhi, W., Chen, D., Corley, E., Kadoura, B., Levy, T., Mirali, S., Tohyama, S., Khan, S., MacIntyre, L., Carlson, E., Schweinhardt, P., Mogil, J. (2019). Male-specific conditioned pain hypersensitivity in mice and humans. *Current Biology*, *29*(2), 192-201.e4.
- Maurer, A. J., Lissounov, A., Knezevic, I., Candido, K. D., Knezevic, N. N.



- 
- (2016). Pain and sex hormones: a review of current understanding. *Pain Management*, 6(3), 285–296.
- Mayer, E. A., Bushnell, M. C., Renna, T. Di. (2009). Functional pain syndromes: presentation and pathophysiology. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal Canadien d'anesthésie* 2009 56:11, 56(11), 882–882.
- McEwen, B. S., Gould, E., Orchinik, M., Weiland, N. G., Woolley, C. S. (1995). Oestrogens and the structural and functional plasticity of neurons: implications for memory, ageing and neurodegenerative processes. *Ciba Foundation Symposium*, 191.
- Meacham, K., Shepherd, A., Mohapatra, D. P., Haroutounian, S. (2017). Neuropathic pain: central vs peripheral mechanisms. *Current Pain and Headache Reports*, 21(6), 1–11.
- Melzack, R., Wall, P. D. (1965). Pain mechanisms: A new theory. *Science*, 150, 3699.
- Middleton, S. J., Barry, A. M., Comini, M., Li, Y., Ray, P. R., Shiers, S., Themistocleous, A. C., Uhelski, M. L., Yang, X., Dougherty, P. M., Price, T. J., Bennett, D. L. (2021). Studying human nociceptors: from fundamentals to clinic. *Brain*, 144(5), 1312–1335.
- Mikuzuki, L., Saito, H., Katagiri, A., Okada, S., Sugawara, S., Kubo, A., Ohara, K., Lee, J., Toyofuku, A., Iwata, K. (2017). Phenotypic change in trigeminal ganglion neurons associated with satellite cell activation via extracellular signal-regulated kinase phosphorylation is involved in lingual neuropathic pain. *The European Journal of Neuroscience*, 46(6), 2190–2202.
- Milligan, E., Sloane, E., Langer, S., Hughes, T., Jekich, B., Frank, M.,

- 
- Mahoney, J., Levkoff, L., Maier, S., Cruz, P., Flotte, T., Johnson, K., Mahoney, M., Chavez, R., Leinwand, L., Watkins, L. (2006). Repeated intrathecal injections of plasmid DNA encoding interleukin-10 produce prolonged reversal of neuropathic pain. *Pain*, 126(1–3), 294–308.
- Mitoma, H., Manto, M., Hampe, C. S. (2017). Pathogenic roles of glutamic acid decarboxylase 65 autoantibodies in cerebellar ataxias. *Journal of Immunology Research*, 2017.
- Mogil, J. S., Bailey, A. L. (2010). Sex and gender differences in pain and analgesia. *Progress in Brain Research*, 186(C), 140–157.
- Mogil, J. S., Graham, A. C., Ritchie, J., Hughes, S. F., Austin, J. S., Schorscher-Petcu, A., Langford, D. J., Bennett, G. J. (2010). Hypolocomotion, asymmetrically directed behaviors (licking, lifting, flinching, and shaking) and dynamic weight bearing (gait) changes are not measures of neuropathic pain in mice. *Molecular Pain*, 6, 1–15.
- Möhler, H. (2015). The legacy of the benzodiazepine receptor: From flumazenil to enhancing cognition in down syndrome and social interaction in autism. In R. Uwe (Ed.), *Advances in Pharmacology* (Vol. 72, pp. 1–36).
- Möhler, H., Fritschy, J. M., Rudolph, U. (2002). A new benzodiazepine pharmacology. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300(1), 2–8.
- Moscoso, J. (2012). *Historia cultural del dolor* (1st ed.). Mexico City: Taurus.
- Moulton, E. A., Keaser, M. L., Gullapalli, R. P., Maitra, R., Greenspan, J. D. (2006). Sex differences in the cerebral BOLD signal response to painful heat stimuli. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and*

- 
- Comparative Physiology*, 291(2), 257–267.
- Moy, J. K., Hartung, J. E., Duque, M. G., Friedman, R., Nagarajan, V., Loeza-Alcocer, E., Koerber, H. R., Christoph, T., Schröder, W., Gold, M. S. (2020). Distribution of functional opioid receptors in human dorsal root ganglion neurons. *Pain*, 161(7), 1636.
- Müller, F., Heinke, B., Sandkühler, J. (2003). Reduction of glycine receptor-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents in rat spinal lamina I neurons after peripheral inflammation. *Neuroscience*, 122(3), 799–805.
- Nagakura, Y. (2015). Challenges in drug discovery for overcoming “dysfunctional pain”: an emerging category of chronic pain. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(10), 1043–1045.
- Ngo, D. H., Vo, T. S. (2019). An updated review on pharmaceutical properties of gamma-aminobutyric acid. *Molecules*, 24(15).
- Njoo, C., Heinl, C., Kuner, R. (2014). In vivo SiRNA transfection and gene knockdown in spinal cord rapid noninvasive lumbar intrathecal injections in mice. *Journal of Visualized Experiments*, (85).
- Olsen, R. W. (2015). Allosteric ligands and their binding sites define  $\gamma$ -aminobutyric acid (gaba) type a receptor subtypes. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 73, pp. 167–202). Academic Press Inc.
- Olsen, R. W., Sieghart, W. (2008). International union of pharmacology. LXX. Subtypes of  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacological Reviews*, 3(60), 243–260.
- Olsen, R. W., Tobin, A. J. (1990). Molecular biology of GABA<sub>A</sub> receptors. *The FASEB Journal*, 4(5), 1469–1480.

- 
- Pajot, J., Ressot, C., Ngom, I., Woda, A. (2003). Gonadectomy induces site-specific differences in nociception in rats. *Pain*, 104(1–2), 367–373.
- Papka, R. E., Storey-Workley, M., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., Collins, J. J., Usip, S., Saunders, P. T. K., Shupnik, M. (2001). Estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  immunoreactivity and mRNA in neurons of sensory and autonomic ganglia and spinal cord. *Cell and Tissue Research* 2001 304:2, 304(2), 193–214.
- Papka, Raymond E., Storey-Workley, M. (2002). Estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  coexist in a subpopulation of sensory neurons of female rat dorsal root ganglia. *Neuroscience Letters*, 319(2), 71–74.
- Parker, K. L., Andreasen, N. C., Liu, D., Freeman, J. H., O’Leary, D. S. (2013). Eyeblick conditioning in unmedicated schizophrenia patients: a positron emission tomography study. *Psychiatry Research*, 214(3), 402–409.
- Patil, M., Belugin, S., Mecklenburg, J., Wangzhou, A., Paige, C., Barba-Escobedo, P., Boyd, J., Goffin, V., Grattan, D., Boehm, U., Dussor, G., Price, T., Akopian, A. (2019). Prolactin regulates pain responses via a female-selective nociceptor-specific mechanism. *IScience*, 20, 449–465.
- Patil, M., Hovhannisyan, A., Wangzhou, A., Mecklenburg, J., Koek, W., Goffin, V., Grattan, D., Boehm, U., Dussor, G., Price, T., Akopian, A. (2019). Prolactin receptor expression in mouse dorsal root ganglia neuronal subtypes is sex-dependent. *Journal of Neuroendocrinology*, 31(8), e12759.
- Paulson, P. E., Minoshima, S., Morrow, T. J., Casey, K. L. (1998). Gender differences in pain perception and patterns of cerebral activation during noxious heat stimulation in humans. *Pain*, 76(1–2), 223–229.

- 
- Payne, J. A., Rivera, C., Voipio, J., Kaila, K. (2003). Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends in Neurosciences*, 26(4), 199–206.
- Payne, R. (2000). Chronic pain: challenges in the assessment and management of cancer pain. *Journal of Pain and Symptom Management*, 19(1), 12–15.
- Peirs, C., Williams, S. P. G., Zhao, X., Walsh, C. E., Gedeon, J. Y., Cagle, N. E., Goldring, A. C., Hioki, H., Liu, Z., Marell, P. S., Seal, R. P. (2015). Dorsal horn circuits for persistent mechanical pain. *Neuron*, 87(4), 797–812.
- Pérez-Sánchez, J., Lorenzo, L. E., Lecker, I., Zurek, A. A., Labrakakis, C., Bridgwater, E. M., Orser, B. A., De Koninck, Y., Bonin, R. P. (2017).  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> receptors mediate tonic inhibition in the spinal cord dorsal horn and contribute to the resolution of hyperalgesia. *Journal of Neuroscience Research*, 95(6), 1307–1318.
- Persohn, E., Malherbe, P., Richards, J. G. (1992). Comparative molecular neuroanatomy of cloned GABA<sub>A</sub> receptor subunits in the rat CNS. *The Journal of Comparative Neurology*, 326(2), 193–216.
- Person, A. L., Raman, I. M. (2012). Synchrony and neural coding in cerebellar circuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 6(97), 1–32.
- Peters, H., Shao, J., Scherr, M., Schwerthöffer, D., Zimmer, C., Förstl, H., Bäuml, J., Wohlschläger, A., Riedl, V., Koch, K., Sorg, C. (2016). More consistently altered connectivity patterns for cerebellum and medial temporal lobes than for amygdala and striatum in schizophrenia. *Frontiers in Human Neuroscience*, 10(55).

- 
- Pieretti, S., Giannuario, A. Di, Di Giovannandrea, R., Marzoli, F., Piccaro, G., Minosi, P., Aloisi, A. M. (2016). Monographic section dender differences in pain and its relief. *Ann Ist Super Sanità*, 52(2), 184–189.
- Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W., Sperk, G. (2000). GABA<sub>A</sub> receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience*, 101(4), 815–850.
- Pörtl, A., Hauer, B., Fuchs, K., Tretter, V., Sieghart, W. (2003). Subunit composition and quantitative importance of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes in the cerebellum of mouse and rat. *Journal of Neurochemistry*, 87(6), 1444–1455.
- Prescott, S. A. (2015). *Synaptic inhibition and disinhibition in the spinal dorsal horn. Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 131). Elsevier Inc.
- Prescott, S. A., Sejnowski, T. J., De Koninck, Y. (2006). Reduction of anion reversal potential subverts the inhibitory control of firing rate in spinal lamina I neurons: towards a biophysical basis for neuropathic pain. *Molecular Pain*, 2, 32.
- Price, T. J., Cervero, F., De Koninck, Y. (2005). Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 5(6), 547–555.
- Price, T. J., Cervero, F., Gold, M. S., Hammond, D. L., Prescott, A. (2009). Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Research Reviews*, 60(1), 149–170.
- Price, T. J., Prescott, S. A. (2015). Inhibitory regulation of pain gate and how its failure causes pathological pain. *Pain*, 156(5), 789–792.

- 
- Puri, J, Vinothini, P., Reuben, J., Bellinger, L., Ailing, L., Peng, Y., Kramer, P. (2012). Reduced GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha_6$  expression in the trigeminal ganglion alters inflammatory TMJ hypersensitivity. *Neuroscience*, 213, 179.
- Puri, Jyoti, Bellinger, L. L., Kramer, P. R. (2011). Estrogen in cycling rats alters gene expression in the temporomandibular joint, trigeminal ganglia and trigeminal subnucleus caudalis/ upper cervical cord junction. *Journal of Cellular. Physiology*, 226, 3169–3180.
- Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F. J., Mogil, J. S., Ringkamp, M., Sluka, K. A., Song, X. J., Stevens, B., Sullivan, M. D., Tutelman, P. R., Ushida, T., Vader, K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161(9), 1976–1982.
- Ramerstorfer, J., Furtmüller, R., Sarto-Jackson, I., Varagic, Z., Sieghart, W., Ernst, M. (2011). The GABA<sub>A</sub> receptor alpha+beta- interface: a novel target for subtype selective drugs. *The Journal of Neuroscience*, 31(3), 870–877.
- Ramerstorfer, J., Furtmüller, R., Vogel, E., Huck, S., Sieghart, W. (2010). The point mutation gamma 2F77I changes the potency and efficacy of benzodiazepine site ligands in different GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. *European Journal of Pharmacology*, 636(1–3), 18–27.
- Rasmussen, P., Jensen, T., Sindrup, S., Bach, F. (2004). TDM-based imipramine treatment in neuropathic pain. *Therapeutic Drug Monitoring*, 26(4), 352–360.
- Ray, P., Torck, A., Quigley, L., Wangzhou, A., Neiman, M., Rao, C., Lam, T.,

- 
- Kim, J., Kim, T., Zhang, M., Dussor, G., Price, T. (2018). Comparative transcriptome profiling of the human and mouse dorsal root ganglia: an RNA-seq-based resource for pain and sensory neuroscience research. *Pain*, 159(7), 1325–1345.
- Ren, P., Wang, W., Pan, H., Qiu, C., Hu, W. (2018). Up-regulation of ASIC3 expression by  $\beta$ -estradiol. *Neuroscience Letters*, 684, 200–204.
- Riley, J. L., Robinson, M. E., Wise, E. A., Myers, C. D., Fillingim, R. B. (1998). Sex differences in the perception of noxious experimental stimuli: A meta-analysis. *Pain*, 74(2–3), 181–187.
- Riley, J. L., Robinson, M. E., Wise, E. A., Price, D. (1999). A meta-analytic review of pain perception across the menstrual cycle. *Pain*, 81(3), 225–235.
- Rocha-Gonzalez, H. I., Mao, S., Alvarez-Leefmans, F. J. (2008).  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  cotransport and intracellular chloride regulation in rat primary sensory neurons: Thermodynamic and kinetic aspects. *Journal of Neurophysiology*, 100(1), 169–184.
- Rodríguez-Palma, E., Granados-Soto, V. (2022). Vista de La percepción del dolor. *Milenaria, Ciencia y Arte*, 10(16), 16–18.
- Rodríguez-Palma, E. J., Castelo-Flores, D. G., Caram-Salas, N. L., Salinas-Abarca, A. B., Centurión, D., De la Luz-Cuellar, Y. E., Granados-Soto, V. (2022). Sex-dependent antiallodynic effect of  $\alpha_2$  adrenergic receptor agonist tizanidine in rats with experimental neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*, 920(5).
- Rolke, R., Magerl, W., Campbell, K. A., Schalber, C., Caspari, S., Birklein, F., Treede, R. D. (2006). Quantitative sensory testing: a comprehensive



- 
- protocol for clinical trials. *European Journal of Pain*, 10(1), 77–77.
- Rosen, S., Ham, B., Mogil, J. (2017). Sex differences in neuroimmunity and pain. *Journal of Neuroscience Research*, 95(1–2), 500–508.
- Rudolph, S., Guo, C., Pashkovski, S. L., Osorno, T., Gillis, W. F., Krauss, J. M., Nyitrai, H., Flaquer, I., El-Rifai, M., Datta, S. R., Regehr, W. G. (2020). Cerebellum-specific deletion of the GABA<sub>A</sub> receptor  $\delta$  subunit leads to sex-specific disruption of behavior. *Cell Reports*, 33(5).
- Sah, D. W. Y., Ossipov, M. H., Porreca, F. (2003). Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(6), 460–472.
- Saleh, T. M., Saleh, M. C. (2001). Inhibitory effect of 17beta-estradiol in the parabrachial nucleus is mediated by GABA. *Brain Research*, 911(2), 116–124.
- Salinas-Abarca, A., Velazquez-Lagunas, I., Franco-Enzástiga, Ú., Torres-López, J., Rocha-González, H., Granados-Soto, V. (2018). ATF2, but not ATF3, participates in the maintenance of nerve injury-induced tactile allodynia and thermal hyperalgesia. *Molecular Pain*, 14, 1–14.
- Schofield, P. R., Darlison, M. G., Fujita, N., Burt, D. R., Stephenson, F. A., Rodriguez, H., Rhee, L. M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, T. A., Seeburg, P. H., Barnard, E. A. (1988). Sequence and functional expression of the GABA<sub>A</sub> receptor shows a ligand-gated receptor superfamily. *Nature*, 328(6127), 221–227.
- Scholz, J., Finnerup, N. B., Attal, N., Aziz, Q., Baron, R., Bennett, M. I., Benoliel, R., Cohen, M., Cruccu, G., Davis, K. D., Evers, S., First, M., Giamberardino, M. A., Hansson, P., Kaasa, S., Korwisi, B., Kosek, E.,

- 
- Lavand'homme, Nicholas, M., Nurmikko, B., Perrot, S., Raja, S. N., Rice, A. S. C., Rowbotham, M. C., Schug, S., Simpson, D. M., Smith, B. H., Svensson, P., Vlaeyen, J. W. S., Wang, S., Barke, A., Rief, W., Treede, R. D. (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. *Pain*, 160(1), 53.
- Seelig, A., Gottschlich, R., Devant, R. M. (1994). A method to determine the ability of drugs to diffuse through the blood-brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(1), 68.
- Semyanov, A., Walker, M. C., Kullmann, D. M., Silver, R. A. (2004). Tonically active GABA<sub>A</sub> receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends in Neurosciences*, 27(5), 262–269.
- Seol, T., Lee, W., Park, S., Kim, K., Kim, T., Oh, Y., Jun, J. (2017). Effect of palmitoylethanolamide on inflammatory and neuropathic pain in rats. *Korean Journal of Anesthesiology*, 70(5), 561–566.
- Serra-Catafu, J. (2007). *Tratado de dolor neuropático* (1era ed.). Medica panamericana.
- Sexton, J. E., Cox, J. J., Zhao, J., Wood, J. N. (2018). The genetics of pain: implications for therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 58, 123–142.
- Shevelkin, A. V., Ihenatu, C., Pletnikov, M. V. (2014). Pre-clinical models of neurodevelopmental disorders: focus on the cerebellum. *Reviews in the Neurosciences*, 25(2), 177–194.
- Shi, D. N., Yuan, Y. T., Ye, D., Kang, L. M., Wen, J., Chen, H. P. (2018). MiR-183-5p alleviates chronic constriction injury-induced neuropathic pain

- through inhibition of TREK-1. *Neurochemical Research*, 43(6), 1143–1149.
- Shiers, S. I., Sankaranarayanan, I., Jeevakumar, V., Cervantes, A., Reese, J. C., Price, T. J. (2021). Convergence of peptidergic and non-peptidergic protein markers in the human dorsal root ganglion and spinal dorsal horn. *The Journal of Comparative Neurology*, 529(10), 2771–2788.
- Shiers, S., Klein, R., Price, T. (2020). Quantitative differences in neuronal subpopulations between mouse and human dorsal root ganglia demonstrated with RNAscope in situ hybridization. *Pain*, 161(10), 2410–2424.
- Shu, X. Q., Mendell, L. M. (1999). Neurotrophins and hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14), 7693–7696.
- Shughrue, P. J., Merchenthaler, I. (2000). Estrogen is more than just a “sex hormone”: novel sites for estrogen action in the hippocampus and cerebral cortex. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21(1), 95–101.
- Sieghart, W. (1995). Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacological Reviews*, 47(2), 181–234.
- Sieghart, Werner, Chiou, L. C., Ernst, M., Fabjan, J., Savić, M. M., Lee, M. T. (2022).  $\alpha_6$ -containing GABA<sub>A</sub> receptors: functional roles and therapeutic potentials. *Pharmacological Reviews*, 74(1), 238–270.
- Silberstein, S. D. (2001). Hormone-related headache. *The Medical Clinics of North America*, 85(4), 1017–1035.
- Siniscalco, D., Giordano, C., Rossi, F., Maione, S., Novellis, V. de. (2011). Role of neurotrophins in neuropathic pain. *Current Neuropharmacology*,

---

9(4), 523.

- Smith, E. S. J., Lewin, G. R. (2009). Nociceptors: a phylogenetic view. *Journal of Comparative Physiology A* 2009 195:12, 195(12), 1089–1106.
- Smith, P. (2020). K<sup>+</sup> channels in primary afferents and their role in nerve injury-induced pain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 1–30.
- Sorge, R., LaCroix-Fralish, M., Tuttle, A., Sotocinal, S., Austin, J., Ritchie, J., Chanda, M., Graham, A., Topham, L., Beggs, S., Salter, M., Mogil, J. (2011). Spinal cord Toll-like receptor 4 mediates inflammatory and neuropathic hypersensitivity in male but not female mice. *The Journal of Neuroscience*, 31(43), 15450–15454.
- Sorge, R., Mapplebeck, J., Rosen, S., Beggs, S., Taves, S., Alexander, J., Martin, L., Austin, J., Sotocinal, S., Chen, D., Yang, M., Shi, X., Huang, H., Pillon, N., Bilan, P., Tu, Y., Klip, A., ... Mogil, J. (2015). Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nature Neuroscience*, 18(8), 1081–1083.
- Stein, C., Clark, J. D., Oh, U., Vasko, M. R., Wilcox, G. L., Overland, A., Vanderah, T. W., Spencerg, R. H. (2009). Peripheral mechanisms of pain and analgesia. *Brain Research Reviews*, 60(1), 90–113.
- Stenkowski, P. L., Garcia-Caballero, A., Gadotti, V. M., M'Dahoma, S., Chen, L., Souza, I. A., Zamponi, G. W. (2017). Identification of interleukin-1 beta as a key mediator in the upregulation of Cav3.2–USP5 interactions in the pain pathway. *Molecular Pain*, 13.
- Stenkowski, P. L., Smith, P. A. (2012). Long-term IL-1 $\beta$  exposure causes subpopulation-dependent alterations in rat dorsal root ganglion neuron excitability. *Journal of Neurophysiology*, 107(6), 1586–1597.

- 
- Sung, B., Lim, G., Mao, J. (2003). Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *The Journal of Neuroscience*, 23(7), 2899–2910.
- Taleghany, N., Sarajari, S., Doncarlos, L. L., Gollapudi, L., Oblinger, M. M. (1999). Differential expression of estrogen receptor alpha and beta in rat dorsal root ganglion Neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 57, 603–615.
- Tao, Y. X. (2012). AMPA receptor trafficking in inflammation-induced dorsal horn central sensitization. *Neuroscience Bulletin*, 28(2), 111–120.
- Tavares-Ferreira, D., Shiers, S., Ray, P. R., Wangzhou, A., Jeevakumar, V., Sankaranarayanan, I., Cervantes, A. M., Reese, J. C., Chamessian, A., Copits, B. A., Dougherty, P. M., Gereau IV, R. W., Burton, M. D., Dussor, G., Price, T. J. (2022). Spatial transcriptomics of dorsal root ganglia identifies molecular signatures of human nociceptors. *Science Translational Medicine*, 14(632), 8186.
- Taves, S., Berta, T., Liu, D., Gan, S., Chen, G., Kim, Y., Van de Ven, T., Laufer, S., Ji, R. (2016). Spinal inhibition of p38 MAP kinase reduces inflammatory and neuropathic pain in male but not female mice: Sex-dependent microglial signaling in the spinal cord. *Brain, Behavior, and Immunity*, 55, 70–81.
- Tracey, I., Mantyh, P. W. (2007). The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*, 55(3), 377–391.
- Tsang, A., Von Korff, M., Lee, S., Alonso, J., Karam, E., Angermeyer, M. C., Borges, G. L. G., Bromet, E. J., de Girolamo, G., de Graaf, R., Gureje, O., Lepine, J. P., Haro, J. M., Levinson, D., Oakley Browne, M. A.,

- 
- Posada-Villa, J., Seedat, S., Watanabe, M. (2008). Common chronic pain conditions in developed and developing countries: gender and age differences and comorbidity with depression-anxiety disorders. *The Journal of Pain*, 9(10), 883–891.
- Tzeng, H., Lee, M., Fan, P., Knutson, D., Lai, T., Sieghart, W., Cook, J., Chiou, L. (2021).  $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub> receptor positive modulators alleviate migraine-like grimaces in mice via compensating GABAergic deficits in trigeminal ganglia. *Neurotherapeutics*, 18(1), 569–585.
- Vacca, V., Marinelli, S., Pieroni, L., Urbani, A., Luvisetto, S., Pavone, F. (2016). 17beta-estradiol counteracts neuropathic pain: a behavioural, immunohistochemical and proteomic investigation on sex-related differences in mice. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–18.
- VanderHorst, V. G. J. M., Gustafsson, J. Å., Ulfhake, B. (2005). Estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  immunoreactive neurons in the brainstem and spinal cord of male and female mice: relationships to monoaminergic, cholinergic, and spinal projection systems. *Journal of Comparative Neurology*, 488(2), 152–179.
- Varagic, Z., Ramerstorfer, J., Huang, S., Rallapalli, S., Sarto-Jackson, I., Cook, J., Sieghart, W., Ernst, M. (2013). Subtype selectivity of  $\alpha+\beta-$  site ligands of GABA<sub>A</sub> receptors: identification of the first highly specific positive modulators at  $\alpha_6\beta_{2/3}\gamma_2$  receptors. *British Journal of Pharmacology*, 169(2), 384–399.
- Vardanyan, R., Hruby, V. (2016). Steroid hormones. In *Synthesis of Best-Seller Drugs* (pp. 459–493). Academic Press.
- Vardeh, D., Mannion, R. J., Woolf, C. J. (2016). Towards a mechanism-based approach to pain diagnosis. *The Journal of Pain*, 17(9 Suppl), T50.

- 
- Vasko, M. R. (2009). Inflammatory Pain. *Encyclopedia of Neuroscience*, 1952–1955.
- Vasović, D., Divović, B., Treven, M., Knutson, D., Steudle, F., Scholze, P., Obradović, A., Fabjan, J., Brković, B., Sieghart, W., Ernst, M., Cook, J., Savić, M. (2019). Trigeminal neuropathic pain development and maintenance in rats are suppressed by a positive modulator of  $\alpha_6$  GABA<sub>A</sub> receptors. *European Journal of Pain (London, England)*, 23(5), 973–984.
- Vicuña, L., Strohlic, D. E., Latremoliere, A., Bali, K. K., Simonetti, M., Husainie, D., Prokosch, S., Riva, P., Griffin, R. S., Njoo, C., Gehrig, S., Mall, M. A., Arnold, B., Devor, M., Woolf, C. J., Liberles, S. D., Costigan, M., Kuner, R. (2015). The serine protease inhibitor SerpinA3N attenuates neuropathic pain by inhibiting T cell-derived leukocyte elastase. *Nature Medicine*, 21(5), 518–523.
- Vinay, L., Jean-Xavier, C. (2008). Plasticity of spinal cord locomotor networks and contribution of cation-chloride cotransporters. *Brain Research Reviews*, 57(1), 103–10.
- von Hehn, C. A., Baron, R., Woolf, C. J. (2012). Deconstructing the Neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron*, 73(4), 638–652.
- Waagepetersen, H. S., Schousboe, A. (2015). Glial GABA and glutamate metabolism. In L. Squire (Ed.), *Reference Module in Biomedical Sciences* (pp. 789–792). Elsevier.
- Wafford, K. A., Bain, C. J., Quirk, K., McKernan, R. M., Wingrove, P. B., Whiting, P. J., Kemp, J. A. (1994). A novel allosteric modulatory site on the GABA<sub>A</sub> receptor beta subunit. *Neuron*, 12(4), 775–782.

- 
- Wang, J., Liu, Y., Hu, F., Yang, J., Guo, X., Hou, X., Ju, C., Wang, K. W. (2021). Activation of neuronal voltage-gated potassium Kv7/KCNQ/M-current by a novel channel opener SCR2682 for alleviation of chronic pain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 377(1), 20–28.
- Wang, Y., Lin, Z. P., Zheng, H. Z., Zhang, S., Zhang, Z. L., Chen, Y., You, Y. S., Yang, M. H. (2016). Abnormal DNA methylation in the lumbar spinal cord following chronic constriction injury in rats. *Neuroscience Letters*, 610, 1–5.
- Watanabe, M., Fukuda, A. (2015). Development and regulation of chloride homeostasis in the central nervous system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(24), 1–14.
- Weidner, C., Schmelz, M., Schmidt, R., Hansson, B., Handwerker, H. O., Torebjörk, H. E. (1999). Functional attributes discriminating mechano-insensitive and mechano-responsive C nociceptors in human skin. *The Journal of Neuroscience*, 19(22), 10184.
- Weng, H. R., Chen, J. H., Cata, J. P. (2006). Inhibition of glutamate uptake in the spinal cord induces hyperalgesia and increased responses of spinal dorsal horn neurons to peripheral afferent stimulation. *Neuroscience*, 138(4), 1351–1360.
- Whittemore, E., Yang, W., Drewe, J., Woodward, R. (1996). Pharmacology of the human  $\gamma$ -aminobutyric acid(A) receptor  $\alpha_4$  subunit expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Molecular Pharmacology*, 50(5), 1364–1375.
- Witschi, R., Punnakal, P., Paul, J., Walczak, J.-S., Cervero, F., Fritschy, J.-M., Kuner, R., Keist, R., Rudolph, U., Zeilhofer, H. U. (2011). Presynaptic  $\alpha_2$ -GABA<sub>A</sub> receptors in primary afferent depolarization and spinal



- 
- pain control. *The Journal of Neuroscience* , 31(22), 8134–42.
- Woolf, C. J. (2004). Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of Internal Medicine*, 140, 441–451.
- Woolf, C. J. (2010). What is this thing called pain? *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3742–4.
- Woolf, C. J., Ma, Q. (2007). Nociceptors-noxious stimulus detectors. *Neuron*, 55(3), 353–364.
- Woolley, C. S., Schwartzkroin, P. A. (1998). Hormonal effects on the brain. *Epilepsia*, 39 Suppl 8(SUPPL. 8).
- Wu, C., Sun, D. (2015). GABA receptors in brain development, function, and injury. *Metabolic Brain Disease*, 30(2), 367–379.
- Wu, G., Ringkamp, M., Murinson, B. B., Pogatzki, E. M., Hartke, T. V, Weerahandi, H. M., Campbell, J. N., Griffin, J. W., Meyer, R. A. (2002). Degeneration of myelinated efferent fibers induces spontaneous activity in uninjured C-fiber afferents. *The Journal of Neuroscience*, 22(17), 7746.
- Yao, M., Wang, J., Gu, J., Sun, L., Liu, H., Zhao, Z., Liu, X. (2002). Interleukin-2 gene has superior antinociceptive effects when delivered intrathecally. *Neuroreport*, 13(6), 791–794.
- Yekkirala, A. S., Roberson, D. P., Bean, B. P., Woolf, C. J. (2017). Breaking barriers to novel analgesic drug development. *Nature Reviews Drug Discovery* 2017 16:8, 16(8), 545–564.
- You, H., Kozuska, J., Paulsen, I., Dunn, S. (2010). Benzodiazepine modulation of the rat GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha_4\beta_3\gamma_2L$  subtype expressed in

- 
- Xenopus oocytes. *Neuropharmacology*, 59(6), 527–533.
- Zeilhofer, H., Möhler, H., Di Lio, A. (2009). GABAergic analgesia: new insights from mutant mice and subtype-selective agonists. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(8), 397–402.
- Zeilhofer, H., Wildner, H., Yevenes, E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiological Reviews*, 92(1), 193.
- Zeilhofer, H U, Wildner, H., Yévenes, G. E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory. *Physiological Reviews*, 92, 193–235.
- Zeilhofer, Hanns Ulrich. (2008). Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain contributions of inflammation and microglia. *International Immunopharmacology*, 8(2), 182–7.
- Zhang, W., Liu, L. Y., Xu, T. L. (2008). Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience*, 152(2), 502–510.
- Zhang, X., Hartung, J. E., Friedman, R. L., Koerber, H. R., Belfer, I., Gold, M. S. (2019). Nicotine-evoked currents in human primary sensory neurons. *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society*, 20(7), 810.
- Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16(2), 109–110.

## 14. Anexos

- **Artículo derivado de este proyecto:**

- Rodríguez-Palma EJ, De la Luz-Cuellar YE, Islas-Espinoza AM, Félix-Leyva AE, Shiers SI, García G, Torres-López JE, Delgado-Lezama R, Murbartían J, Price TJ, Granados-Soto V (2022). Activation of  $\alpha_6$ -containing GABA<sub>A</sub> receptors induces antinociception under physiological and pathological conditions. PAIN. in Press.

- **Artículos derivados de otros proyectos:**

- De la Luz-Cuellar YE, **Rodríguez-Palma EJ**, Franco-Enzástiga U, Salinas-Abarca AB, Delgado-Lezama R & Granados-Soto V (2019). Blockade of spinal  $\alpha_5$ -GABA<sub>A</sub> receptors differentially reduces reserpine-induced fibromyalgia-type pain in females rats. European Journal of Pharmacology. 5;858:172443.
- Baeza-Flores GC, **Rodríguez-Palma EJ**, Reyes-Pérez V, Guzmán-Priego CG & Torres-López JE (2020). Antinociceptive effects of ceftriaxone in formalin-induced nociception. Drug Development Research. 81(6):728-735.
- Delgado-Lezama R, Bravo-Hernández M, Franco-Enzástiga U, De la Luz-Cuellar YE, Alvarado-Cervantes NS, Raya-Tafolla G, Martínez-Zaldivar LA, Vargas-Parada A, **Rodríguez-Palma EJ**, Vidal-Cantú GC, Guzmán-Priego, CG, Torres-López JE, Murbartían J, Felix R, Granados-Soto V (2021). The role of spinal cord extrasynaptic  $\alpha_5$ -GABA<sub>A</sub> receptors in chronic pain. Physiological Reports. 9(16):e14984
- **Rodríguez-Palma EJ**, Castelo-Flores DG, Caram-Salinas NL, Salinas-Abarca AB, Centurión D, De la Luz-Cuellar YE, Granados-Soto V (2022). Sex-dependent antiallodynic effect of  $\alpha_2$  adrenergic receptor

agonist tizanidine in rats with experimental neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*. 5;920: 174855.

- Huerta de la Cruz S, **Rodríguez-Palma EJ**, Santiago-Castañeda CL, Sánchez-López A, Rocha L, Centurión D (2022). Exogenous hydrogen sulfide restores CSE and CBS but no 3-MST protein expression in the hypothalamus and brainstem after severe traumatic brain injury. *Metabolic Brain Disease*. 37(5): 1-14

- **Congresos:**

- IV Congreso de Neurobiología de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Oaxaca, México. Presentación oral.
- World Congress on Pain of the International Association for the Study of Pain. Toronto, Canada. Presentación poster.

- **Actividades académicas**

- Estancia académica y de investigación en el laboratorio de la Dra. Gabriel Castañeda-Corral de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 2018.
- Segundo Encuentro Internacional Virtual en Neurociencias del Consejo Mexicano de Neurociencias. 2020.
- Taller de actualización disciplinar de la maestría en ciencias biomédicas (PNPC: 5101) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 2020.
- Curso “Estadística Básica en R” por el Departamento de Educación Continua de la Universidad Veracruzana. 2021
- Estancia académica y de investigación en el laboratorio del Dr. Theodore J. Price de la School of Behavioral and Brain Sciences de la University of Texas at Dallas. 2021.

- Taller de actualización disciplinar de la maestría en ciencias biomédicas (PNPC: 5101) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 2021
- Instructor del curso-taller: “Abordaje de la neurofarmacología del dolor” en la maestría en ciencias biomédicas (PNPC: 5101) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 2021.
- Instructor del curso-taller: “Generalidades de la farmacodinamia experimental” en la maestría en ciencias biomédicas (PNPC: 5101) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 2021.

#### **Actividades de retribución social**

- Participación en la actividad “La feria del dolor” en el marco de la semana del cerebro del Departamento de Farmacobiología del Cinvestav Sede Sur 2019.
- Participación en la semana del cerebro 2021 con la plática titulada “Ouch!...la ciencia del dolor”. Departamento de Farmacobiología del Cinvestav Sede Sur.