



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**Papel del receptor α_5 GABA_A en la regulación de la excitabilidad
de las neuronas de las láminas I-II de la médula espinal**

T E S I S

Que presenta

JOSÉ ANTONIO AGUILAR PALOMARES

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director

Dr. José Rodolfo Delgado Lezama

Ciudad de México

Agosto, 2022

Contenido

Abreviaturas	1
Agradecimientos académicos.....	3
Agradecimientos personales	4
Resumen	5
Abstract	7
Introducción.....	8
<i>Dolor: definición y clasificación.....</i>	<i>8</i>
<i>Procesamiento de la información sensorial.....</i>	<i>9</i>
<i>El GABA y sus receptores en el Sistema Nervioso</i>	<i>14</i>
<i>Receptores GABA_A en la médula espinal.....</i>	<i>17</i>
<i>Relevancia del control inhibitorio en la médula espinal.....</i>	<i>18</i>
<i>Papel del receptor α_5GABA_A en el procesamiento del dolor</i>	<i>21</i>
Planteamiento del problema.....	24
Hipótesis	25
Objetivo general.....	25
Objetivos particulares.....	25
Métodos	26
<i>Animales</i>	<i>26</i>
<i>Obtención de rebanadas de médula espinal.....</i>	<i>26</i>
<i>Registros de electrofisiología mediante la técnica de patch clamp</i>	<i>27</i>

Resultados	29
<i>Identificación y registro de neuronas en LI-LII</i>	<i>29</i>
<i>Patrones de disparo registrados en las neuronas de LI-LII.....</i>	<i>30</i>
<i>Efecto del bloqueo del receptor α_5GABA_A en la excitabilidad de las neuronas registradas en LI-LII.....</i>	<i>31</i>
Discusión.....	35
<i>Caracterización de las neuronas de las láminas I y II en función del patrón de descarga de potenciales de acción.....</i>	<i>35</i>
<i>Modulación de la excitabilidad neuronal por receptor α_5GABA_A evidenciada por la descarga de potenciales de acción.....</i>	<i>36</i>
<i>Modulación de la rebase, el umbral de activación del potencial de acción y de la resistencia de entrada mediada por el receptor α_5GABA_A.....</i>	<i>36</i>
<i>Relevancia del control inhibitorio mediado por los receptores α_5GABA_A.....</i>	<i>37</i>
Conclusiones.....	39
Bibliografía.....	40

Abreviaturas

Ca ²⁺	Ion de calcio
Cl ⁻	Ion de cloro
Cm	Capacitancia de la membrana
FAP	Fibras aferentes primarias
GRD	Ganglio de la raíz dorsal
HCO ₃	Bicarbonato
K ⁺	Ion de potasio
KCC2	Cotransportador K ⁺ /Cl ⁻ tipo 2
L-65	Agonista inverso de alta afinidad del receptor α_5 GABA _A , L-655,708
LCR	Líquido cefalorraquídeo artificial
LI-VIII	Láminas I a VIII del asta dorsal de la médula espinal
mV	Milivolts
MΩ	Megaohms
NP	Neuronas de proyección
pA	Picoamperios
PA	Potenciales de acción
PM	Potencial de membrana

PMR	Potencial de membrana en reposo
RM	Resistencia de entrada
SEM	Error estándar de la media

Agradecimientos académicos

Agradezco el apoyo brindado por el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias y por el propio Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

Agradezco también el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca académica con CVU 1040007.

De igual manera agradezco a Guadalupe Raya Tafolla, al Dr. Vladimir Martínez, así como a todos los integrantes de este laboratorio por su apoyo y asistencia en el desarrollo experimental de esta tesis.

Principalmente agradezco al Dr. José Rodolfo Delgado Lezama por la oportunidad de colaborar en su laboratorio. Agradezco el apoyo y la confianza brindada en todo momento tanto como tutor como persona.

Finalmente agradezco al Dr. Benjamín Florán Garduño y al Dr. Ricardo Félix Grijalva por su apoyo y orientación fundamental para la conclusión de esta tesis.

Agradecimientos personales

Todo el proceso de mi formación académica y científica no hubiera sido posible sin el apoyo de mi madre Rosa María: gracias por siempre apoyarme e impulsarme a alcanzar mis metas, gracias por siempre creer en mí, siempre en mi vida habrá un espacio para agradecerte todo lo que haces por mí, te amo.

A mi padre, Efrén: tu apoyo siempre ha sido y será fundamental a lo largo de mi vida, a pesar de la distancia o de las adversidades siempre me sentiré acompañado por ti, te amo.

A mis amigos de la infancia Ashley, Erick, Juan Carlos y Primo: gracias por acompañarme en este proceso, sus pláticas, consejos y motivación siempre serán bienvenidas. Gracias por su amistad sincera y desinteresada, los amo.

A mis amigos psicólogos Alberto, Francisco, Jorge Castillo, Jorge Ortega y Juan Carlos: gracias por siempre estar ahí, por apoyarme, por ser sinceros y señalar cuando estoy equivocado y hacerme caer en realidad. Siempre estaré agradecido de su amistad y compañía, los amo.

A Celeste Nieto: Gracias por apoyarme, por motivarme cuando llegaba triste y derrotado, por aguantar mis quejas, por acompañarme día tras día. Gracias por estar a mi lado en los momentos buenos y malos, espero poder compartir este y muchos triunfos a tu lado. Te amo.

Resumen

El dolor neuropático es un tipo de dolor crónico que se genera a partir de una lesión o enfermedad del sistema nervioso produciendo una condición incapacitante en alrededor del 25 al 30% de la población a nivel mundial. La información nociceptiva generada por un estímulo doloroso es detectada por las terminales de las fibras nociceptivas y enviada hacia el circuito neuronal que procesa la información nociceptiva ubicado principalmente en las láminas I y II del asta dorsal de la médula espinal. Este circuito neuronal se encuentra bajo un control inhibitorio GABAérgico mediado por los receptores GABA_A sinápticos y extrasinápticos, que funcionaría como la compuerta de regulación del dolor. En estudios de comportamiento se ha demostrado que el bloqueo del receptor α_5 GABA_A induce alodinia mecánica y la revierte, en animales sanos y con neuropatía, respectivamente. Por lo tanto, este receptor extrasináptico tiene un papel antinociceptivo y pronociceptivo en animales sanos y con alodinia mecánica, respectivamente. Estos hallazgos difieren de la propuesta de varios grupos de investigación, quienes pretenden restaurar e intensificar la actividad sináptica GABAérgica para revertir el dolor crónico. En este trabajo se investigó la función del receptor α_5 GABA_A, que media una corriente tónica, en la regulación de la excitabilidad de las neuronas de las láminas I y II de la médula espinal donde se localiza el circuito que procesa la información nociceptiva. Con este fin, se registraron las neuronas con la técnica de *patch clamp* en la modalidad de fijación de corriente, determinándose los cambios en su excitabilidad producidos por el bloqueo del mencionado receptor, con el agonista inverso de alta afinidad L-655,708. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la actividad del receptor α_5 GABA_A modula la excitabilidad de las neuronas de LI-LII del asta dorsal de

la médula espinal, sentando las bases de la relevancia del estudio de este receptor dentro del circuito que procesa la información nociceptiva.

Abstract

Neuropathic pain is a type of chronic pain generated from an injury or disease of the nervous system, producing a disabling condition in around 25 to 30% of the population worldwide. The nociceptive information generated by a painful stimulus is detected by the terminals of the nociceptive fibers and sent to the neuronal circuit responsible for processing the nociceptive information, located mainly in laminae I and II of the dorsal horn of the spinal cord. This neuronal circuit is under GABAergic inhibitory control mediated by synaptic and extrasynaptic GABA_A receptors, which would function as the pain regulation gate. Behavioral studies have shown that $\alpha 5$ GABA_A receptor blockade induces and reverses mechanical allodynia in healthy and neuropathy animals. Therefore, this extrasynaptic receptor has an antinociceptive and pronociceptive role in healthy animals and animals with mechanical allodynia, respectively. These findings are against the proposal of several research groups, who attempt to restore and enhance GABAergic synaptic activity to reverse chronic pain. In this work, the function of the $\alpha 5$ GABA_A receptor, which mediates a tonic current, in the regulation of the excitability of neurons in laminae I and II of the spinal cord, where the circuit that processes nociceptive information is located, was investigated. For this purpose, the neurons were recorded with the *patch clamp* technique in the current clamp mode to determine the changes in their excitability produced by the blockade of the aforementioned receptor with the high-affinity inverse agonist L-655,708. The results obtained in this work show that the activity of the $\alpha 5$ GABA_A receptor modulates the excitability of the LI-LII neurons of the dorsal horn of the spinal cord, laying the foundations for the relevance of the study of this receptor within the circuit that processes nociceptive information.

Introducción

Dolor: definición y clasificación

A lo largo de la evolución el dolor ha jugado un papel fundamental en el desarrollo y la supervivencia de los seres vivos, esto se debe a la capacidad de detectar estímulos nocivos o situaciones que pongan en peligro al organismo provocando la retirada que previene daños mayores (Basbaum et al., 2009; Thai & Fainsinger, 2011).

El dolor es definido como una experiencia sensorial o emocional desagradable asociada con un daño tisular real o potencial, la cual, es siempre una experiencia personal que está influenciada en diversos niveles por factores biológicos, psicológicos o sociales y, aunque suele tener un papel adaptativo, puede tener efectos adversos sobre la función y el bienestar social y psicológico de la persona (Asociación Internacional para el Estudio del Dolor [IASP, por sus siglas en inglés], 2021).

La presencia de dolor puede ser aguda (intenso y de corta duración) o crónica (persiste durante más de tres meses) (IASP, 2021). En particular, el dolor crónico afecta entre 25 y 30% de la población mundial; en México, a pesar de no tener un estadístico confiable, se ha reportado que al menos el 40% de la población adulta de más de 50 años reportó sufrir dolor persistente, que se ha convertido un problema de salud pública (Instituto Nacional de Salud Pública [INSP], 2020).

Se han propuesto 2 tipos principales de dolor: 1) El dolor nociceptivo, el cual es definido como el dolor que surge de un daño real o potencial al tejido no neural (IASP, 2021). Este dolor resulta de una lesión por ejemplo en la piel, músculos o huesos; generalmente está bien localizado y puede ser constante o intermitente (Thai & Fainsinger,

2011). 2) El dolor neuropático, un tipo de dolor crónico, es definido como el dolor causado por una lesión (una anomalía o trauma directa) o enfermedad (cuando se conoce la causa subyacente de la lesión) del sistema nervioso somatosensorial (IASP, 2021).

Las diversas causas del dolor neuropático pueden producir un aumento de la sensibilidad del sistema nervioso periférico y central, no obstante, también puede conducir a una pérdida de la función de la estructura comprometida por la lesión o enfermedad (Scholz et al., 2019). El dolor neuropático presenta dos características: la alodinia, es la percepción de dolor debido a un estímulo inocuo, producido por la activación de las fibras aferentes primarias (FAP) de bajo umbral; la hiperalgesia, es la respuesta exacerbada de dolor ante un estímulo que normalmente provoca dolor (IASP, 2021). Generalmente los síntomas de dolor neuropático son irreversibles, los tratamientos farmacológicos son paliativos. Hasta la fecha todavía hay controversia sobre los mecanismos celulares y moleculares que subyacen su desarrollo y mantenimiento.

Procesamiento de la información sensorial

La percepción de los estímulos nocivos (también llamada nocicepción) se lleva a cabo por una serie de FAP (llamadas nociceptores) que inervan la piel, los músculos y los diferentes tejidos del cuerpo (Todd, 2010). Las FAP nociceptivas son neuronas pseudo unipolares que tienen su soma en el ganglio de la raíz dorsal (GRD), de donde parte un axón con dos terminales, una hacia la periferia y la otra inerva las neuronas de la médula espinal (Fig. 1A) (Basbaum et al., 2009; Todd, 2010).

El circuito que procesa esta información nociceptiva está ubicado principalmente en las láminas I a III del asta dorsal de la médula espinal, donde se localizan las neuronas de proyección (NP), interneuronas de naturaleza GABAérgica, glicinérgica y glutamatérgica, así como las terminales de los diferentes tipos de FAP y de vías descendentes (Todd, 2010; Delgado-Lezama et al., 2021). Las FAP se clasifican en cuatro grupos, dependiendo del criterio que se tome, por su diámetro, velocidad de conducción y el receptor que inervan como: $A\alpha$, $A\beta$, $A\delta$ y C, o por la inervación de músculos y tendones como: tipo I, II, III, IV (Fig. 1) (Bear et al., 2016).

Dentro del asta dorsal de la médula espinal madura se han descrito anatómicamente diversas capas o láminas, donde se encuentra una combinación de neuronas que se pueden distinguir por su morfología o proyecciones (Todd, 2010). Dentro de esta división anatómica hay láminas específicas con neuronas e interneuronas que codifican estímulos nociceptivos y la temperatura, provenientes de las FAP nociceptivas (fibras $A\delta$ y C o tipos III y IV respectivamente). Estas son las únicas que hacen conexión monosináptica con las NP que se encuentran en las láminas más superficiales (I y II en mayor proporción que la III) (Fig. 1B), así como interneuronas que activan el reflejo flexor de retirada ante el estímulo nocivo (Fig. 1A) (Caspary & Anderson, 2003; Delgado-Lezama et al., 2021).

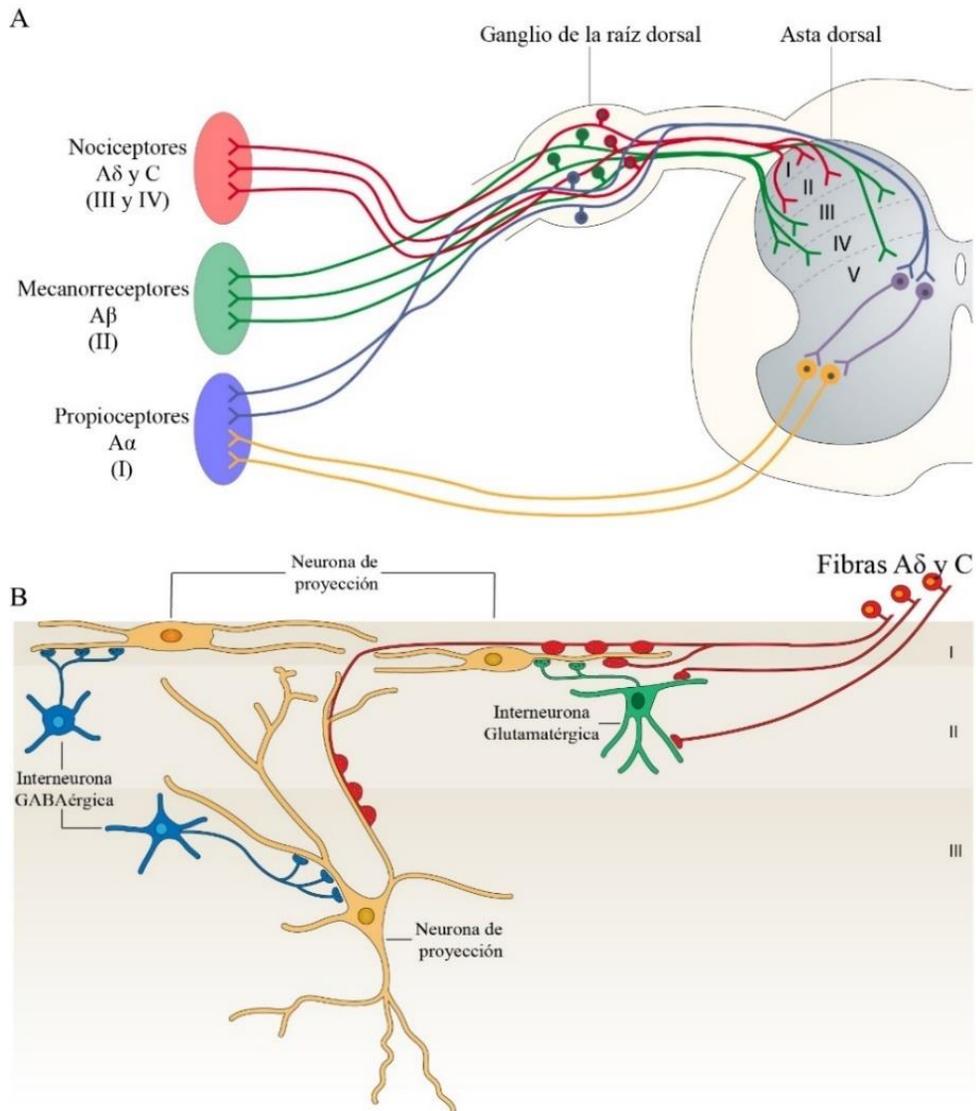


Figura 1. A) Representación esquemática de los diferentes tipos de FAP que inervan la médula espinal. Los axones de las neuronas sensoriales nociceptivas (rojo) inervan neuronas e interneuronas principalmente de LI-II; las FAP que inervan los mecanorreceptores hacen sinapsis principalmente con neuronas de LIII-V; las FAP que inervan a los propioceptores hacen sinapsis con las motoneuronas ubicadas en la parte ventral de la médula espinal y con interneuronas GABAérgicas y glutamatérgicas. B) Esquema que muestra el circuito neuronal dentro de LI-III que procesan la información nociceptiva. Se muestran las sinapsis de las fibras $A\delta$ y C con las NP e interneuronas glutamatérgicas, glicinérgicas y GABAérgicas (Modificado de Caspary & Anderson, 2003; Todd, 2010).

En las láminas I-II (LI y LII) se localizan las NP que envían la información a los núcleos supraespinales del tallo cerebral y el tálamo, de ahí se trasmite a la corteza sensorial donde se inicia la percepción del dolor (Todd, 2010). Además, en estas láminas se localizan interneuronas GABAérgicas, glicinérgicas y glutamatérgicas, que también reciben inervación de las fibras aferentes nociceptivas y no nociceptivas, que a su vez inervan a las NP regulando su excitabilidad (Fig. 1B) (Todd, 2010).

Actualmente existen muy pocos trabajos que describan las propiedades biofísicas y morfológicas de las NP e interneuronas GABAérgicas y glutamatérgicas de LI-LII del asta dorsal de la médula espinal de roedores adultos. En estos trabajos se ha descrito la existencia de una heterogeneidad morfológica dentro de la población de interneuronas GABAérgicas y glutamatérgicas pertenecientes a este circuito neuronal (Todd, 2010; Yasaka et al., 2010; Zhu et al., 2021). Esta diferenciación morfológica se realizó a partir de la distribución del árbol dendrítico con respecto al soma de la neurona en los ejes dorsal \leftrightarrow ventral y rostral \leftrightarrow caudal en donde se encontraron 5 subpoblaciones de interneuronas: Islotes, Centrales, Radiales, verticales y las que no pudieron ser clasificadas en ninguna de las anteriores (Fig. 2) (Zhu et al., 2021).

Adicional a esta distinción morfológica, se ha reportado la diferenciación por sus características biofísicas, en particular por su patrón de disparo al generar potenciales de acción (PA), en donde se encontró una población heterogénea de interneuronas que fueron clasificadas dependiendo de su patrón de disparo (Todd, 2010; Yasaka et al., 2010; Li et al., 2021; Zhu et al., 2021). Dentro de esta clasificación por su patrón de disparo podemos encontrar: Tónico, Fásico, Inicial, Retrasado y Desfasado (Fig. 3) (Zhu et al., 2021).

En particular, las NP están sujetas a un control inhibitorio que regula su excitabilidad, de tal modo que solo se producen PA por las entradas provenientes de las fibras aferentes nociceptivas y no por las fibras de bajo umbral como las $A\beta$, que las excitan polisinápticamente con una fuerza sináptica baja (Torsney & MacDermott, 2006; Takazawa & MacDermott, 2010b; Bonin & De Koninck, 2013; Perez-Sanchez et al., 2017; Delgado-Lezama et al., 2021). En la actividad inhibitoria dentro del asta dorsal participan de manera muy importante los receptores $GABA_A$, mediando dos tipos de inhibición en el sistema nervioso maduro: una sináptica rápida, producida por los receptores que se ubican en la densidad postsináptica subyacente y otra tónica, mediada por receptores extrasinápticos (Farrat y Nuser, 2005; Kullmann et al., 2005; Delgado-Lezama et al., 2021).

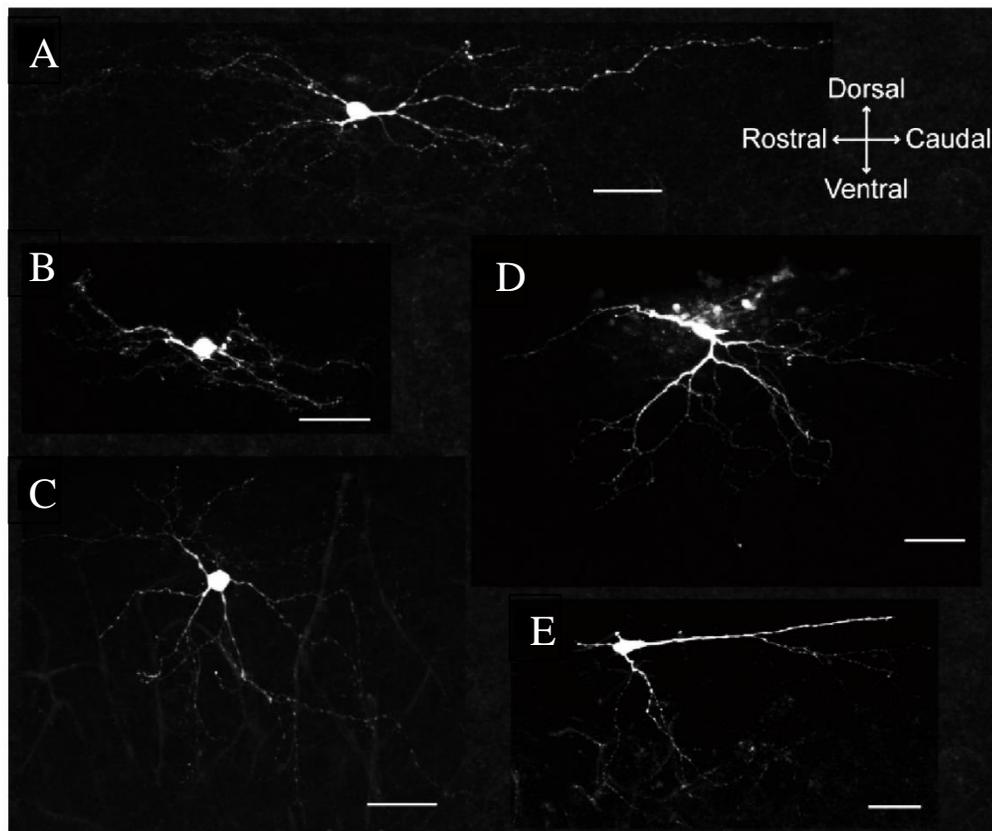


Figura 2. Heterogeneidad morfológica de las neuronas de LI-LII. Las neuronas se marcaron y revelaron contra biocitina y fueron posteriormente clasificadas como: A) Islote,

B) Centrales, C) Radiales, D) Verticales y E) las que no pudieron ser clasificadas en ninguna de las anteriores (Imagen tomada de Zhu et al., 2021).

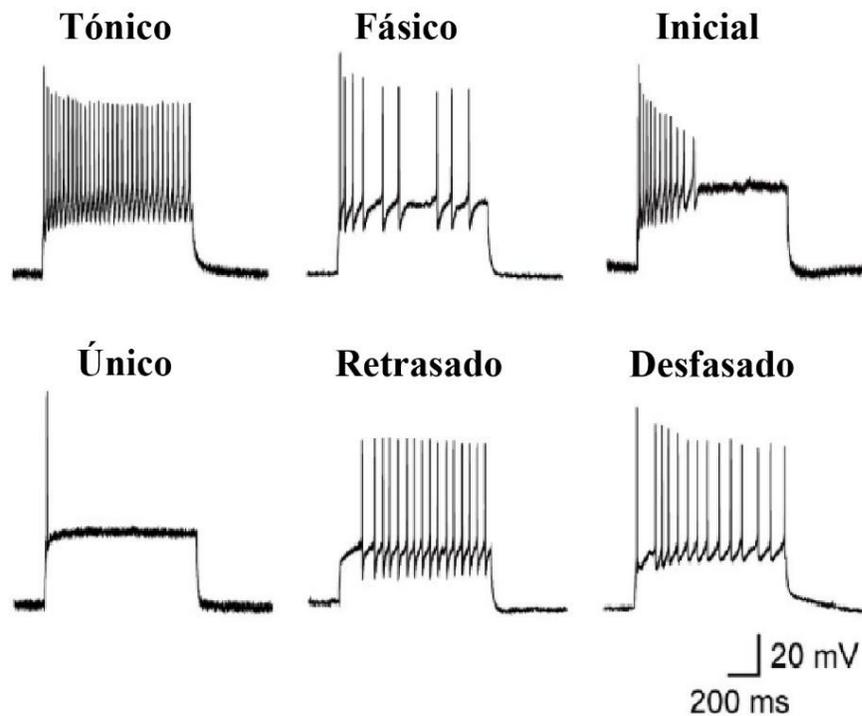


Figura 3. Patrones de disparo de las neuronas de LI-LII. Las neuronas registradas con la técnica de *patch clamp* en LI-LII mostraron diferentes patrones de disparo al ser estimuladas con pulsos de corriente despolarizantes siendo clasificados como: Tónico, Fásico: Inicial, Único, Retrasado y Desfasado (Modificado de Zhu et al., 2021).

El GABA y sus receptores en el Sistema Nervioso

El GABA (ácido γ -aminobutírico) es el principal neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central de mamíferos. Su principal acción se lleva a cabo mediante receptores que pueden ser activados por la liberación de GABA de las vesículas presinápticas.

Los receptores a GABA son de dos tipos, ionotrópicos como el GABA_A y GABA_C, y metabotrópico como el GABA_B (Farrant & Nusser, 2005). Los receptores GABA_A y GABA_C son miembros de la superfamilia de receptores pentaméricos acoplados a canales iónicos activados por ligando, que permiten el paso de los iones Cl⁻ y HCO₃⁻. Los receptores GABA_B son heterodímeros acoplados a proteínas G que funcionan a través de un sistema de segundos mensajeros, pueden tener diferentes acciones, aumentar la permeabilidad a K⁺ o reducir la permeabilidad a Ca²⁺ (Bowery, 1989; Petroff, 2002).

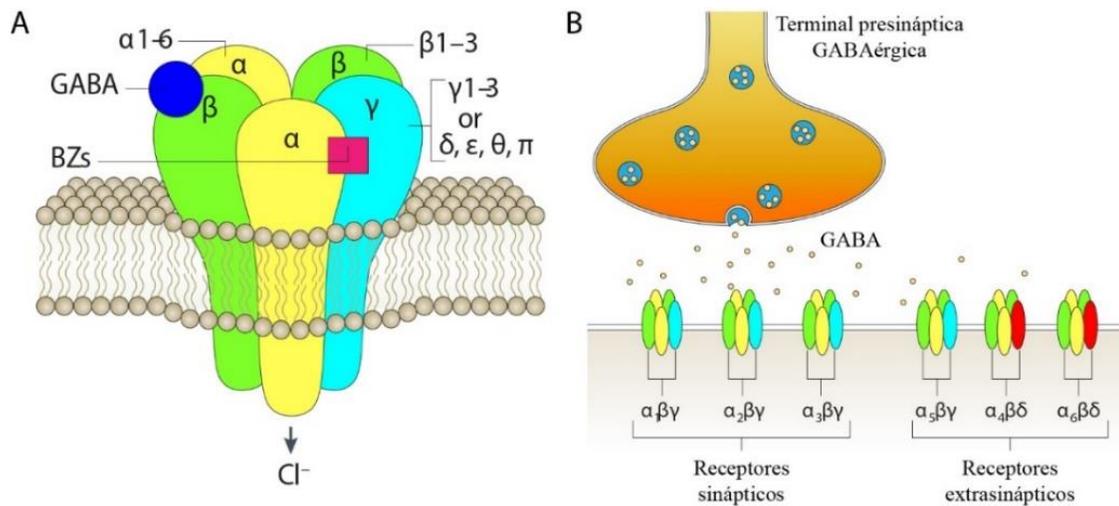


Figura 4. Estructura de los receptores GABA_A. A) El receptor GABA_A está conformado por dos subunidades α y dos β, la tercera puede ser γ o δ, ε, θ, π. El sitio de unión del GABA es entre las subunidades α y β; el sitio de unión de las benzodiazepinas es entre las subunidades α y γ. B) Los receptores compuestos por las subunidades α₁₋₃, β y γ son principalmente sinápticos mientras que los receptores compuestos por las subunidades α₄ y α₆, β y δ y los receptores α₅, β y γ son principalmente extrasinápticos (Modificado de Jacob et al., 2008).

Actualmente se ha descrito la existencia de 17 clases de subunidades que conforman el receptor GABA_A: α(1-6), β(1-3), γ(1-3), δ, ε(1-3), θ y π (Fig. 4A) (Farrat y Nusser, 2005;

Jacob et al., 2008). La mayoría de los receptores GABA_A se componen de dos subunidades α , dos subunidades β y una subunidad γ (o δ , θ y π) (Fig. 4A). Estos receptores presentan diferentes propiedades biofísicas, fisiológicas y farmacológicas debido a la diversidad de las subunidades que los conforman; además se expresan de manera diferencial en todo el sistema nervioso (Farrant & Nusser, 2005; Jacob et al., 2008).

En función de sus propiedades farmacológicas, los receptores GABA_A se pueden dividir en sensibles y no sensibles a benzodiazepinas, lo que está determinado por la composición de subunidades del receptor, el sitio de unión de las benzodiazepinas se encuentra entre las subunidades α (1, 2, 3 y 5) y γ (Fig. 4A); por lo tanto, los receptores que contienen las subunidades α_4 o α_6 con δ no presentan sitio de unión a benzodiazepinas (Farrant y Nusser, 2005; Jacob et al., 2008; Zeilhofer et al., 2012).

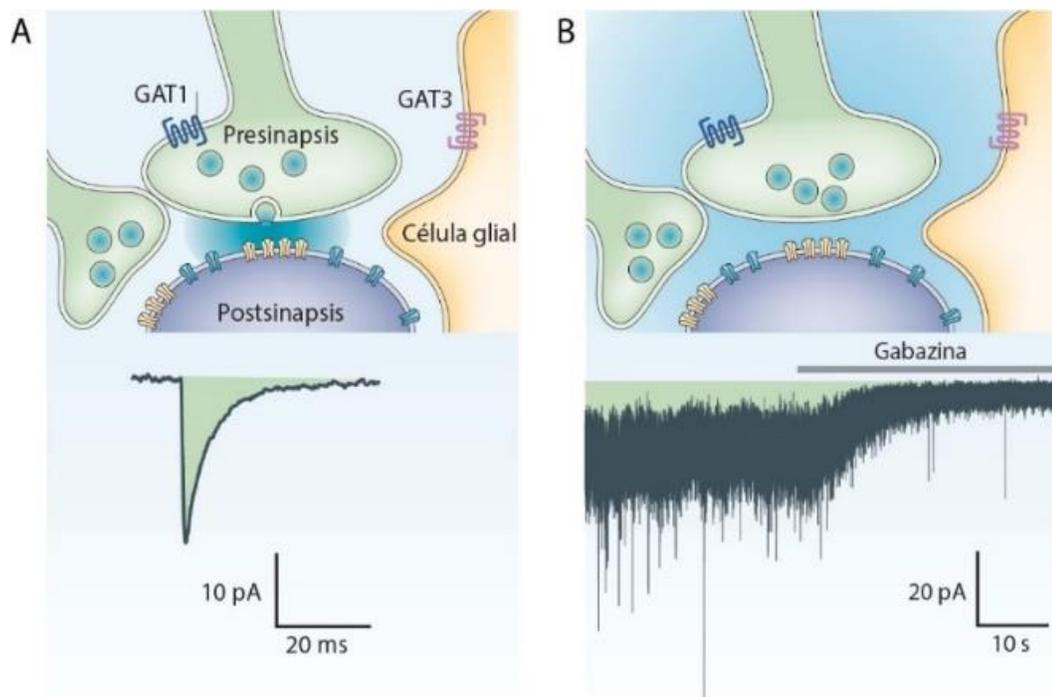


Figura 5. Activación fásica y tónica de los receptores GABA_A. A) La activación de los receptores sinápticos (amarillos) que se encuentran en la postsinapsis del sitio de liberación del GABA, generan una corriente fásica. B) La activación de los receptores extrasinápticos

(azules) que se encuentran en la periferia o distales al sitio de liberación del GABA genera una corriente tónica, que se manifiesta en presencia de gabazina, antagonista de los receptores GABA_A (Modificado de Farrant & Nusser, 2005).

Estos receptores también se pueden clasificar dependiendo de su localización (Fig. 4B). Los receptores sinápticos ($\alpha_{1,2,3}$) que se encuentran en oposición directa a las terminales presinápticas de donde se libera el GABA, producen una inhibición fásica (Fig. 5A). Los receptores extrasinápticos ($\alpha_{4, 5}$ y 6) se ubican fuera del espacio sináptico o más distales del botón sináptico, de donde se libera el GABA, median la inhibición tónica (Fig. 5B) (Farrant & Nusser, 2005; Kullmann et al., 2005; Möhler, 2007; Jacob et al., 2008).

Receptores GABA_A en la médula espinal

Los subtipos de receptores GABA_A se expresan de manera diferencial dentro de las diferentes láminas de la médula espinal. Particularmente las neuronas de LI expresa receptores con las subunidades $\alpha_{2,3,5}$ (Paul et al., 2012). Los receptores α_5 GABA_A están expresados de manera extrasináptica en las neuronas de LI y LII (Fig. 6) mediando una corriente tónica (Paul et al., 2012; Perez-Sanchez et al., 2017; Hernández-Reyes et al., 2019). Dentro de LIII-V se expresan receptores con las subunidades $\alpha_{1,2,3, 5}$, en la capa interna de LIII se expresa en mayor proporción la subunidad α_5 , mientras que en la capa externa se expresa en mayor proporción la subunidad α_3 (Bohlhalter et al., 1996; Paul et al., 2012). En LVI-VIII se expresa en mayor proporción las subunidades α_3 ; no obstante, hay poca presencia de neuronas con receptores con las subunidades α_1 y α_5 (Bohlhalter et al., 1996; Watanabe et al., 2002; Paul et al., 2012).

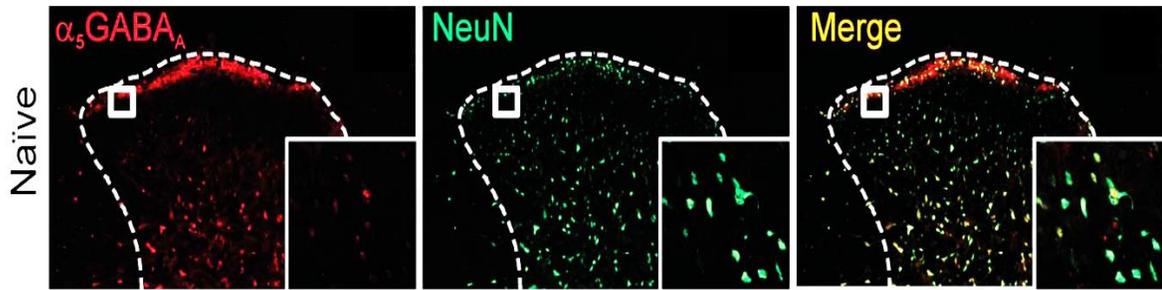


Figura 6. Los receptores α_5 GABA_A se expresan en el asta dorsal de la médula espinal de ratas naïve. Se muestra la expresión del receptor α_5 GABA_A (rojo) en neuronas de la médula espinal (verde) y la colocalización de ambas marcas (amarillo) concentradas en LI y LII del asta dorsal de la médula espinal (Hernández-Reyes et al., 2019).

Relevancia del control inhibitorio en la médula espinal

El control inhibitorio que se lleva a cabo en el asta dorsal de la médula espinal está modulado en mayor proporción por la inhibición GABAérgica mediante receptores GABA_A (Todd, 2010; Paul et al., 2012). Esto queda en evidencia por la aplicación de bicuculina en roedores sanos (antagonista de los receptores GABA_A), que genera hiperalgesia y alodinia, similar a la que se presentan animales con dolor neuropático. Este hecho ha llevado a varios grupos de investigación a proponer que el desarrollo del dolor neuropático es resultado de la pérdida de la inhibición sináptica mediada por receptores GABA_A en la médula espinal (Zeilhofer et al., 2012; Bonin & De Koninck, 2013; Delgado-Lezama et al., 2021).

Esta propuesta ha sido reforzada por los resultados experimentales basados en el registro electrofisiológico de las NP, que en condiciones normales, solo las FAP de los tipos C y A δ de alto umbral activan potenciales excitadores que pueden activar potenciales de acción, mientras que las FAP de bajo umbral A β producen potenciales sinápticos polisinápticos de muy baja amplitud (Baba et al., 1999; Torsney & MacDermott, 2006). No

obstante, después de la aplicación de bicuculina las FAP de bajo umbral $A\beta$ producen potenciales sinápticos lo suficientemente intensos como para activar PA en las NP, esto explicaría la alodinia táctil (Baba et al., 1999, 2003; Torsney & MacDermott, 2006). Este hallazgo llevo a Takazawa & MacDermott (2010) a proponer que las interneuronas que median la excitación de las NP por activación de las FAP de bajo umbral $A\beta$ se encuentran bajo un fuerte control inhibitorio mediado por receptores $GABA_A$, lo cual se puede interpretar según la propuesta de Melzack y Wall (1965) que la compuerta está cerrada (Baba et al., 1999, 2003; Takazawa & MacDermott, 2010a, 2010b), sin embargo, aún no se ha descrito qué tipo de receptores $GABA_A$ estarían mediando la compuerta dado que la aplicación de bicuculina bloquea a todos los tipos de receptores $GABA_A$.

Nuestro grupo de trabajo demostró en estudios de comportamiento en animales sanos (naïve) que con solo bloquear el receptor α_5GABA_A con L-655,708 (L-65), agonista inverso de alta afinidad de este tipo de receptor, es suficiente para producir alodinia táctil, sugiriendo que este receptor tiene una acción antinociceptiva en condiciones normales (Fig. 7) (Hernández-Reyes et al., 2019). Este comportamiento también se reprodujo utilizando la aplicación de un ARN pequeño de interferencia (siRNA) del receptor α_5GABA_A (De la Luz-Cuellar et al., 2019). Además, contrario a lo propuesto por varios grupos de investigación, nuestro grupo demostró que el bloqueo del receptor α_5GABA_A con L-65 revirtió la alodinia táctil en varios modelos con dolor crónico inducido por ligadura de un nervio espinal (Bravo-Hernández et al., 2016), la aplicación de formalina (Bravo-Hernández et al., 2014), con neuropatía diabética (Hernández-Reyes et al., 2019), o en un modelo de fibromialgia, acción que también produjo anestesia con la administración del siRNA del receptor α_5GABA_A (De

la Luz-Cuellar et al., 2019). Esto llevó a proponer que el receptor $\alpha_5\text{GABA}_A$ tiene un papel pronociceptivo en el dolor crónico (Delgado-Lezama et al., 2021).

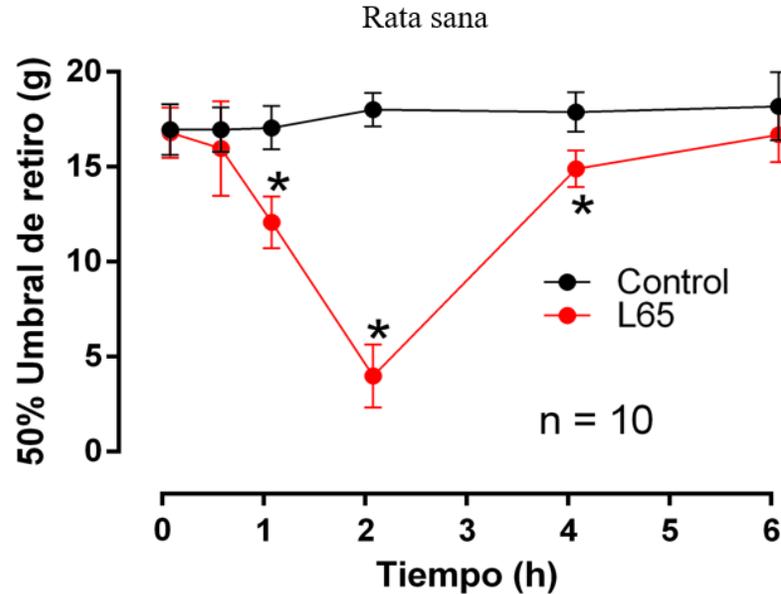


Figura 7. El bloqueo del receptor $\alpha_5\text{GABA}_A$ en ratas naïve induce alodinia mecánica. Se muestra el curso temporal de una prueba de umbral táctil para medir alodinia mecánica en condiciones control (negro) y con el efecto del bloqueo del receptor $\alpha_5\text{GABA}_A$ con L-65 (rojo) (Modificada de Hernández-Reyes et al., 2019)

Una posible explicación de la acción antinociceptiva y pronociceptiva del receptor $\alpha_5\text{GABA}_A$ en animales sanos y con dolor crónico, respectivamente, se apoya que este receptor produce una corriente tónica en las neuronas de LI-II, donde se localizan las neuronas que procesan la información nociceptiva. En animales sanos, los receptores $\alpha_5\text{GABA}_A$ estarían produciendo una corriente tónica inhibitoria en las interneuronas y las NP, manteniendo cerrada la compuerta. Mientras que en animales con dolor crónico, donde se ha encontrado un incremento en la concentración intracelular de Cl^- , producido por la disminución de la expresión del cotransportador K^+/Cl^- tipo 2 (KCC2), la activación de los

receptores $\alpha_5\text{GABA}_A$ en lugar de inhibir tónicamente a las neuronas donde se expresa (Perez-Sanchez et al., 2017), las despolarizaría (Coull et al., 2005), lo que permitiría la activación de las NP por las fibras de bajo umbral $A\beta$, por lo que se estaría abriendo la compuerta.

Papel del receptor $\alpha_5\text{GABA}_A$ en el procesamiento del dolor

A través de registros electrofisiológicos en rebanadas de la médula espinal de ratones con dolor neuropático producido por la lesión de un nervio espinal, se ha demostrado que en las neuronas de LI-II se activan PA en presencia de GABA, debido a la despolarización del potencial de equilibrio del Cl^- (Coull et al., 2003; 2005). Sin embargo, aunque se sabe que el receptor $\alpha_5\text{GABA}_A$ se expresa en las neuronas de las LI-II del asta dorsal (Fig. 6) (Hernández-Reyes et al., 2019), no se conoce el papel que tiene en esta respuesta.

Canto-Bustos y colaboradores (2017) demostraron mediante registros electrofisiológicos de *patch clamp* en rebanada de la médula espinal de tortugas que los receptores $\alpha_5\text{GABA}_A$ están activados tónicamente por el GABA endógeno y producen una corriente inhibidora tónica que es capaz de modular las propiedades pasivas y activas de las motoneuronas espinales (Fig. 8).

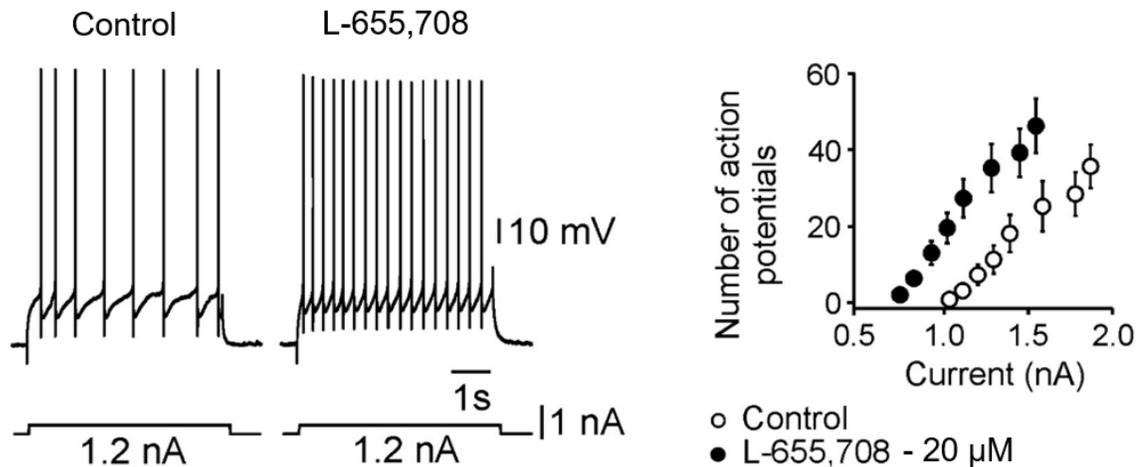


Figura 8. Los receptores α_5 GABA_A modulan la excitabilidad de las motoneuronas en la médula espinal. Del lado izquierdo se muestra la activación de los potenciales de acción en respuesta a un mismo pulso de corriente en condiciones control y en presencia de L-65. Del lado derecho se muestra la gráfica de la relación entre los pulsos de corriente despolarizante aplicados y el número de potenciales de acción evocados en las dos condiciones (Modificado de Canto-Bustos et al., 2017).

De igual forma, mediante registros electrofisiológicos de *patch clamp* en rebanadas de médula espinal de ratones naïve (WT) y *knockout* para el gen *Gabra5* (*Gabra5*^{-/-}) que no expresaban el receptor α_5 GABA_A, se demostró que en las neuronas de LI-LII este receptor está mediando una corriente tónica inhibitoria mediada por los receptores α_5 GABA_A, evidenciada por la aplicación de bicuculina (10μM), en el caso de los ratones WT, estando considerablemente disminuida en los ratones *knockout* (*Gabra5*^{-/-}), por lo que se concluye que este receptor podría estar inhibiendo tónicamente a las neuronas de LI-LII. Sin embargo, no se sabe con exactitud cómo es que modula su excitabilidad (Fig. 9) (Perez-Sanchez et al., 2017).

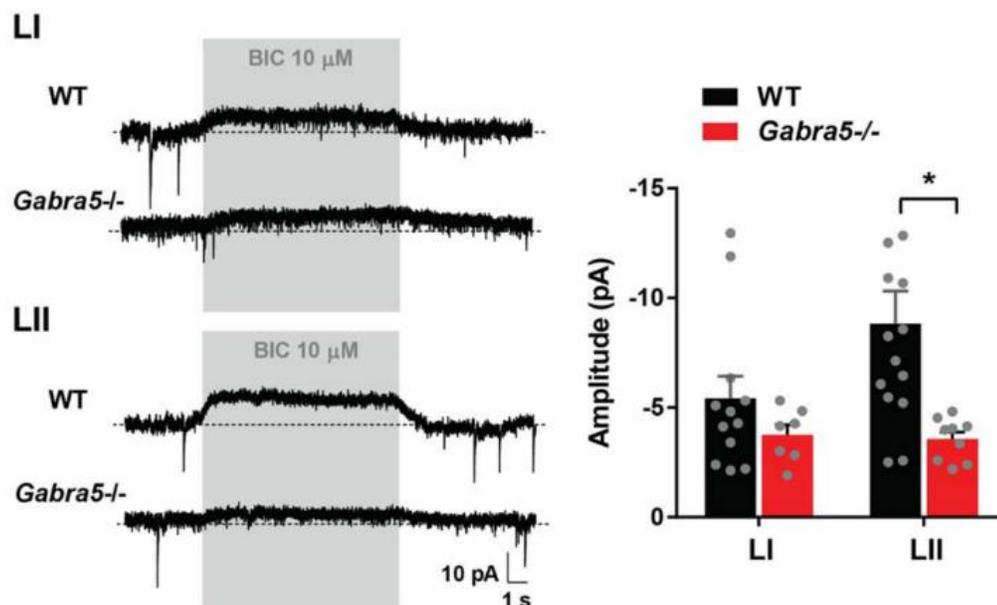


Figura 9. Corriente tónica mediada por los receptores α_5 GABA_A. Los registros electrofisiológicos de *patch* clamp en la modalidad de célula completa revelan la presencia de una corriente inhibitoria tónica en las neuronas de LI-II del asta dorsal que se bloquea con bicuculina. La corriente tónica disminuye en un ratón que no expresa el receptor α_5 GABA_A (*Gabra5*^{-/-}). El histograma de la derecha muestra que la corriente tónica es más intensa en LII (Perez-Sanchez et al., 2017).

Es muy relevante que el bloqueo únicamente del receptor α_5 GABA_A revierta la alodinia en cuatro modelos de dolor crónico. Esto discrepa de lo propuesto por varios grupos de investigación del campo de dolor, quienes proponen que para revertir la alodinia hay que restaurar la inhibición GABAérgica sináptica perdida (Paul et al., 2014). Para este fin han desarrollado agonistas alostéricos positivos de los receptores GABA_A. A pesar los esfuerzos de estos grupos no han podido revertir la alodinia en los diferentes modelos de dolor como ocurre con el bloqueo del receptor α_5 GABA_A (Delgado-Lezama et al., 2021). Si bien se sabe que el receptor α_5 GABA_A media una corriente tónica en las neuronas de LI y LII de la médula

espinal, no se conoce si está corriente inhibitoria es suficiente para mantenerlas inhibidas con bajo nivel de excitabilidad.

Planteamiento del problema

Los receptores extrasinápticos α_5 GABA_A se expresan en las neuronas de LI y LII del asta dorsal de la médula espinal mediando una corriente tónica inhibitoria de Cl⁻ que podría estar hiperpolarizando o cortocircuitando a las neuronas en el estado normal, no obstante, no se conoce cuál es su papel en la regulación de su excitabilidad. En los ratones a los que se les suprimió la expresión del receptor α_5 GABA_A (Gabra5^{-/-}), se encontró que en las neuronas de LI y LII la corriente tónica está mediada en un alto porcentaje (~ 60 %) por este receptor, esto significa que la principal corriente tónica esta mediada por los receptores α_5 GABA_A. Es muy probable que la activación de este receptor en animales sanos determine que las FAP de bajo umbral no activen a las NP produciendo una respuesta nociceptiva. En este trabajo no se demostró el papel de estos receptores en la modulación de la excitabilidad de las neuronas. Por lo que surgen las preguntas: ¿Los receptores extrasinápticos α_5 GABA_A son más relevantes que los sinápticos en la regulación de la excitabilidad de las neuronas de las láminas I-II? ¿Cómo modula este receptor las propiedades pasivas y activas de las neuronas donde se expresa? ¿La corriente tónica mediada por el receptor α_5 GABA_A es la más relevante en las neuronas de LI-II de la médula espinal?

Hipótesis

- Los receptores $\alpha_5\text{GABA}_A$ mantienen tónicamente disminuida la excitabilidad de las neuronas de las láminas I-II de la médula espinal de animales sanos.

Objetivo general

- Determinar electrofisiológicamente si los receptores $\alpha_5\text{GABA}_A$ modulan las propiedades pasivas y activas (potenciales de acción, PA) de las neuronas láminas de LI-II del asta dorsal de la médula espinal de animales sanos.

Objetivos particulares

- Registrar con la técnica de *patch clamp* en el modo fijación de corriente las neuronas de LI y LII en rebanadas de la médula espinal lumbar de ratas sanas.
- Determinar mediante la aplicación de pulsos despolarizantes supraumbral el nivel de excitabilidad medida por el número de potenciales de acción activados en condiciones control y después del bloqueo de los receptores $\alpha_5\text{GABA}_A$.
- Determinar las propiedades pasivas de las neuronas registradas en condiciones control y después del bloqueo de los receptores $\alpha_5\text{GABA}_A$.

Métodos

Animales

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en ratas macho de la cepa Wistar de 100-120 g. Fueron mantenidas en un cuarto con ciclos de luz oscuridad (12h/12h), con agua y alimento *ad libitum*. Este estudio fue aprobado por el Comité Interino de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Cinvestav, Ciudad de México, México; Protocolo 0198-16).

Obtención de rebanadas de médula espinal

Para la obtención de rebanadas de la médula espinal se utilizó una solución que émula al líquido cefalorraquídeo (LCR), que contiene en mM: sacarosa 210, KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 26, Tiourea 2, Ascorbato de sodio 4, CaCl₂ 0.5, MgCl₂, Acetilcisteína 6, Ácido quinurénico 0.5, Piruvato 2, Glucosa 10, y Myo inositol 3. Esta solución se enfrió a una temperatura cercana al punto de congelación y se burbujeó con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). Una vez lista la solución se procedió a decapitar la rata y posteriormente se extrajo la médula espinal por extrusión hidráulica. Posteriormente, se retiró el excedente de tejido conectivo, dejando únicamente la porción de médula que corresponde al engrosamiento lumbar que se embebió en un bloque de agar al 3 %. La médula montada verticalmente en el agar se pegó en la platina de un vibratomo para cortar las rebanadas transversales de 300 µm de grosor.

Las rebanadas se transfirieron a una solución de incubación a 32°C, la cual contiene en mM: Sacarosa 40, NaCl 70, KCl 5, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 26, Tiourea 2, ascorbato de sodio 4, CaCl₂ 2, MgCl₂ 10, Acetilcisteína 6, HEPES 20, Glucosa 10, Piruvato 2 y Myo inositol 3, durante 10 minutos. Posteriormente se transfirieron a una solución de registro a temperatura ambiente que contiene en mM: NaCl 126, KCl 3.6, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 26, CaCl₂ 2.5, Glucosa 10, MgCl₂ 1.2, y Piruvato 2.

Registros de electrofisiología mediante la técnica de *patch clamp*

Las rebanadas se fijaron en una cámara de registro montada en un microscopio vertical de iluminación oblicua BX51 (Olympus). Se identificó LI-II del asta dorsal de la médula espinal mediante inspección visual con un objetivo 5x, se localizó la banda translúcida (sustancia gelatinosa) inmediatamente debajo de la sustancia blanca dorsal (Fig. 8) (Li et al., 2021). Una vez identificada la zona se procedió a registrar con un objetivo de inmersión en agua de 40x. Los electrodos de registro de *patch clamp* se hicieron de pipetas de borosilicato empleando un estirador horizontal programable (Sutter instruments); se rellenaron con una solución que contiene en mM: gluconato de potasio 130, KCl 5, HEPES 10, EGTA 1.1, CaCl₂ 0.1, fosfocreatina 10, Mg-ATP 4 y Mg-GTP 0.4 con una resistencia de 4-7 MΩ.

Los electrodos se montaron en un micromanipulador (Sutter instruments) que permite el avance de la pipeta en las tres dimensiones. Con una jeringa se aplicó una presión positiva. La pipeta fue introducida en la cámara de inmersión donde se colocó la rebanada. Una vez localizada la célula por registrar, con ayuda del micromanipulador se acercó la

pipeta a la membrana hasta que la punta la toque, se procedió a liberar la presión positiva para succionar la membrana celular y generar un sello de $>1 \text{ G}\Omega$ de resistencia, lo que garantiza la formación de un sello adecuado para el registro. Realizado el Giga sello se procedió a fijar el voltaje en un valor cercano al potencial de membrana en reposo (PMR) de -60 mV , se aplicaron pequeñas succiones con ayuda de la jeringa para lograr romper la membrana celular y así tener acceso al medio intracelular, quedando de este modo el registro electrofisiológico en la modalidad de célula completa.

Una vez estabilizado el registro en fijación de corriente se procedió a aplicar pulsos de corriente despolarizante de 1000 ms de duración en incrementos de 10 pA , hasta alcanzar el umbral de los PA, continuando con los pulsos hasta que se sature la respuesta de PA, este protocolo se repitió en presencia de L-65 ($20 \mu\text{M}$) (Fig. 10). Los protocolos de estimulación y registro se realizaron empleando el programa pClamp (Molecular Devices), acoplado a un amplificador Multiclamp-700B (Molecular Devices), conectado a una tarjeta digitalizadora Digidata 1440A (Molecular Devices). Los registros se guardaron en una computadora para su posterior análisis.

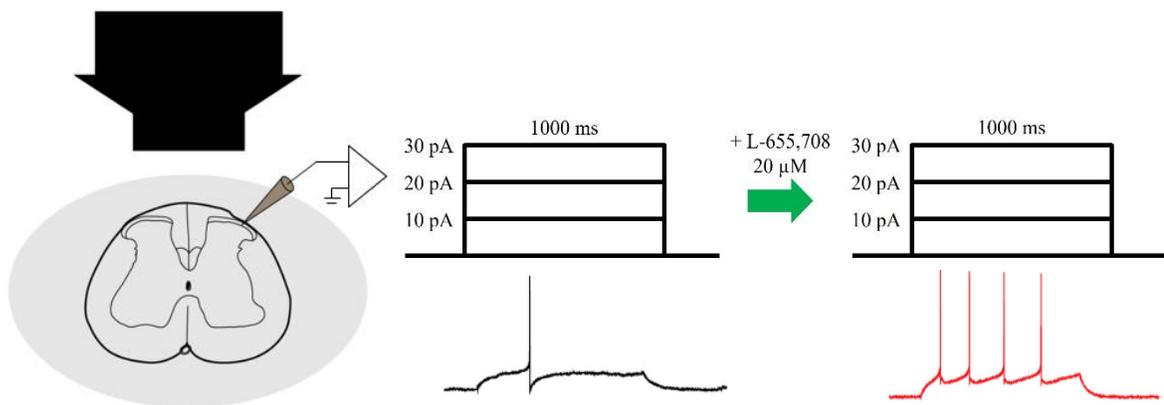


Figura 10. Protocolo de registros electrofisiológicos mediante la técnica *patch clamp*.

Resultados

Identificación y registro de neuronas en LI-LII

Para determinar si el bloqueo del receptor $\alpha_5\text{GABA}_A$ modula las propiedades pasivas y activas de las neuronas de las láminas I-II del asta dorsal de la médula espinal lumbar se realizaron registros electrofisiológicos con la técnica de *patch clamp* en la modalidad de célula completa. Primero se desarrollaron soluciones fisiológicas para mantener la médula espinal en las condiciones óptimas que permitiera obtener rebanadas transversales con neuronas viables. A continuación se localizaron visualmente las láminas de interés en el asta dorsal (sustancia gelatinosa; Li et al., 2021) (Fig. 11A), donde se seleccionaron las neuronas (Fig. 11B) que se registraron en un total de 10 (Fig. 11C).

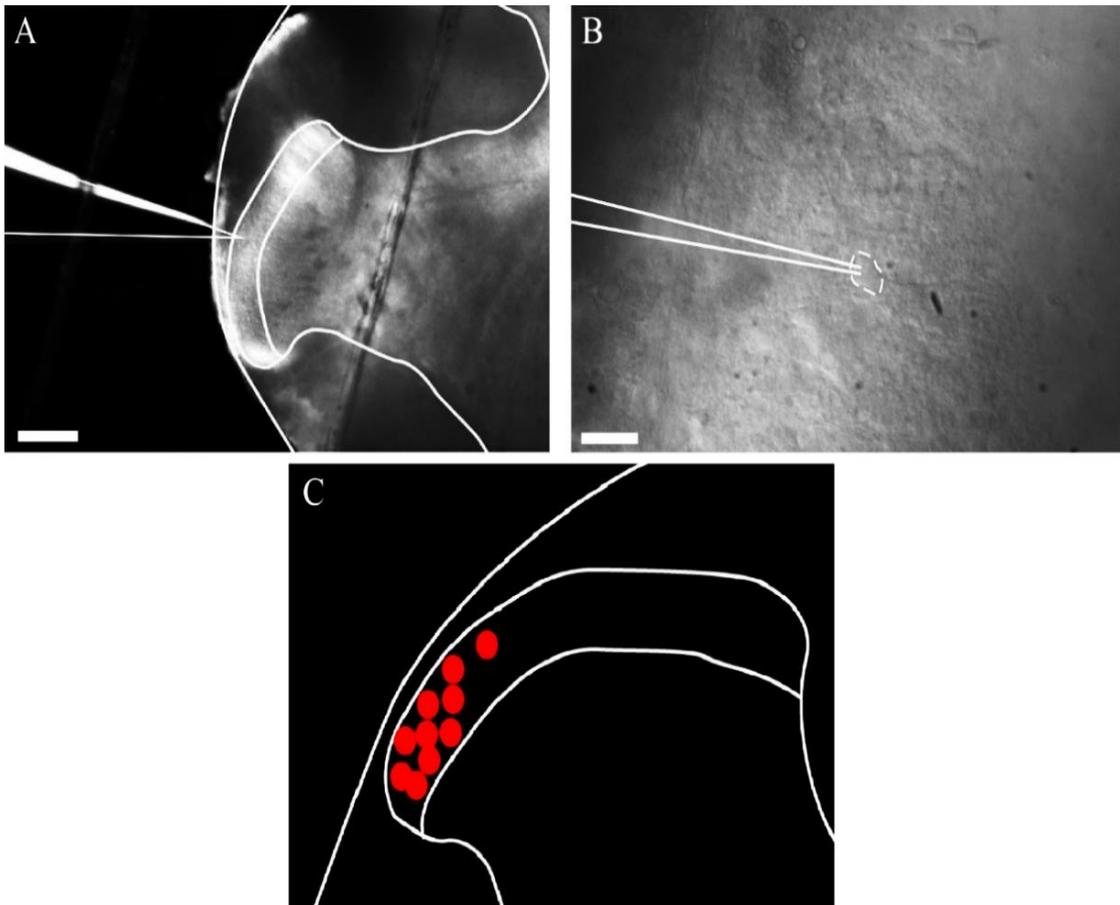


Figura 11. Rebanadas de medula espinal lumbar de rata. A) Ejemplo de la identificación de LI-LII en una rebanada de medula espinal lumbar con la pipeta de registro colocada en la zona de interés (escala = 250 μm). B) Ejemplo de la identificación de una neurona presente en LI-LII con la pipeta de registro colocada en su membrana (escala = 50 μm). C) Esquema representativo de la ubicación aproximada de los registros electrofisiológicos realizados dentro de LI-LII (n = 10).

Patrones de disparo registrados en las neuronas de LI-LII

En la figura 12 se muestran 4 registros representativos con los diferentes patrones de descarga de PA de las neuronas registradas en este trabajo, que concuerdan con los reportados previamente como: tónico (n = 1), único (n = 1), inicial (n = 4), y fásico (n = 1) (Todd, 2010; Yasaka et al., 2010; Li et al., 2021; Zhu et al., 2021).

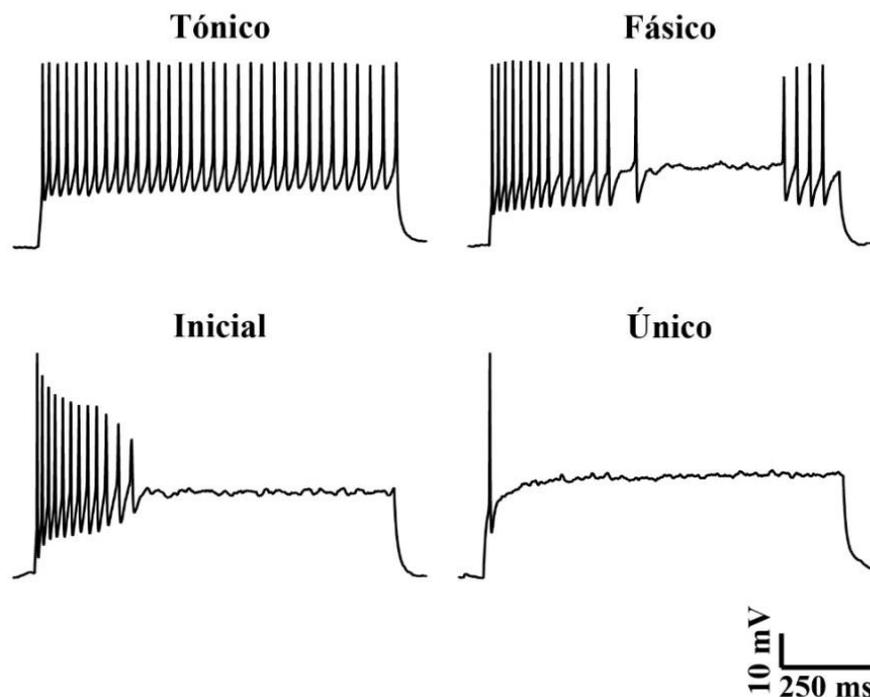


Figura 12. Diferentes patrones de disparo de PA de las neuronas de las láminas LI-LII. Las neuronas registradas mostraron cuatro patrones de disparo de PA: tónico (n = 1), fásico (n = 1) inicial (n = 4) y único (n = 4).

Efecto del bloqueo del receptor $\alpha 5\text{GABA}_A$ en la excitabilidad de las neuronas registradas en LI-LII

En la figura 13A se muestra un registro representativo de una neurona en condiciones control y en presencia de L-65. Al aplicar el mismo pulso de corriente despolarizante se observa un aumento en la descarga de PA (trazo rojo), como se observa en la gráfica de la figura 13B. La curva de corriente contra el número de PA activados se corrió hacia la izquierda en presencia de L-65, indicando un incremento en la excitabilidad de la neurona. Este cambio solo se observó en 2 de las 10 neuronas registradas.

Si bien en solo 2 de 10 neuronas se observó un incremento en la descarga de PA en presencia de L-65, en el caso de la reobase y el umbral de descarga de un PA ambos parámetros disminuyeron en 9 y 10 de las neuronas registradas, respectivamente. Mientras que la resistencia de entrada se incrementó en 8 de las 10 neuronas registradas (tabla 1). En la figura 14A se muestran los registros representativos de un PA activado por un protocolo de estimulación con un pulso de corriente de 20 ms, la corriente aplicada para evocar el PA en presencia de L-65 disminuyó de 100 a 60 pA, lo que significa una disminución en la reobase, en promedio esto ocurrió en 9 de 10 neuronas registradas (Fig. 14B, tabla 1). El umbral de disparo disminuyó en las 10 neuronas en presencia de L-65 (Fig. 14C, tabla 1).

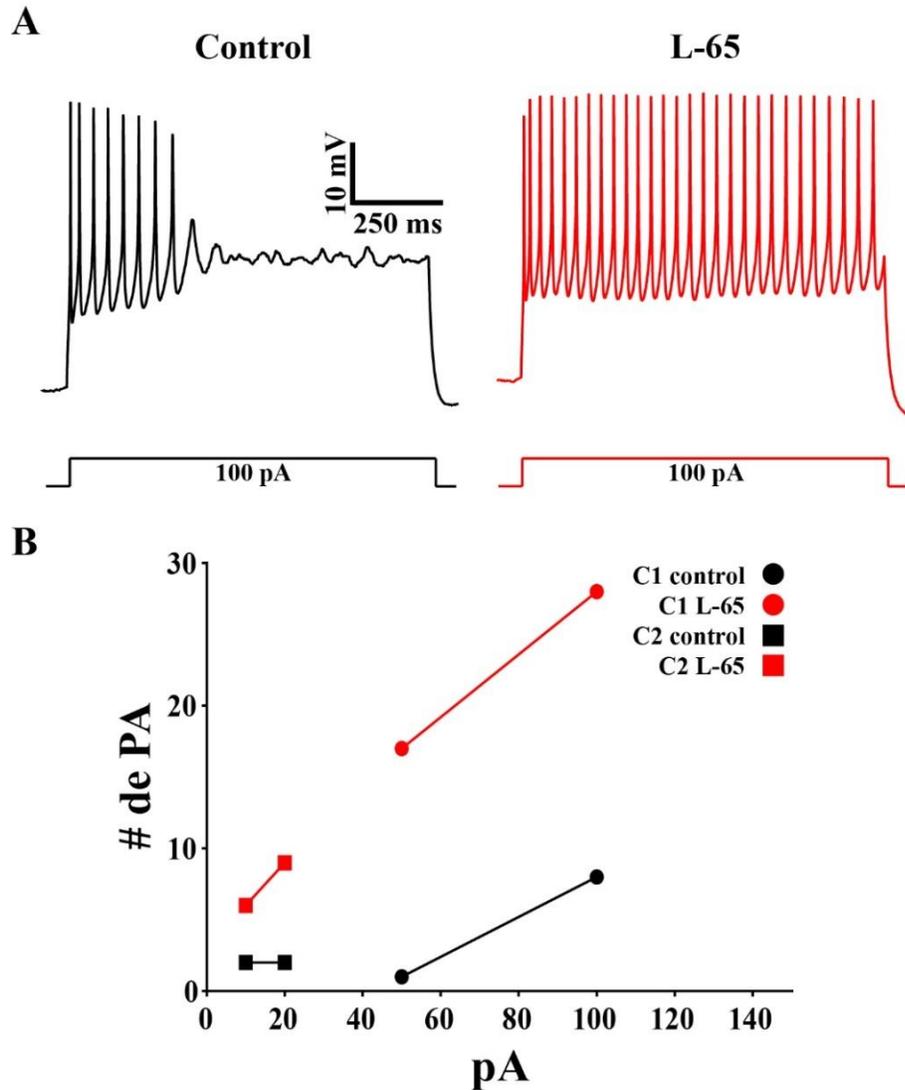


Figura 13. El bloqueo de los receptores α_5 GABA_A aumenta la excitabilidad de las neuronas de las láminas LI-LII del asta dorsal de la médula espinal lumbar. A) Respuesta en voltaje producida por la aplicación de un pulso de corriente despolarizante (supraumbra) en condiciones control (negro) y en presencia de L-65 (rojo). B) Gráfico que representa el aumento en el número de PA generados por cada pulso de corriente despolarizante de la neurona registrada en A.

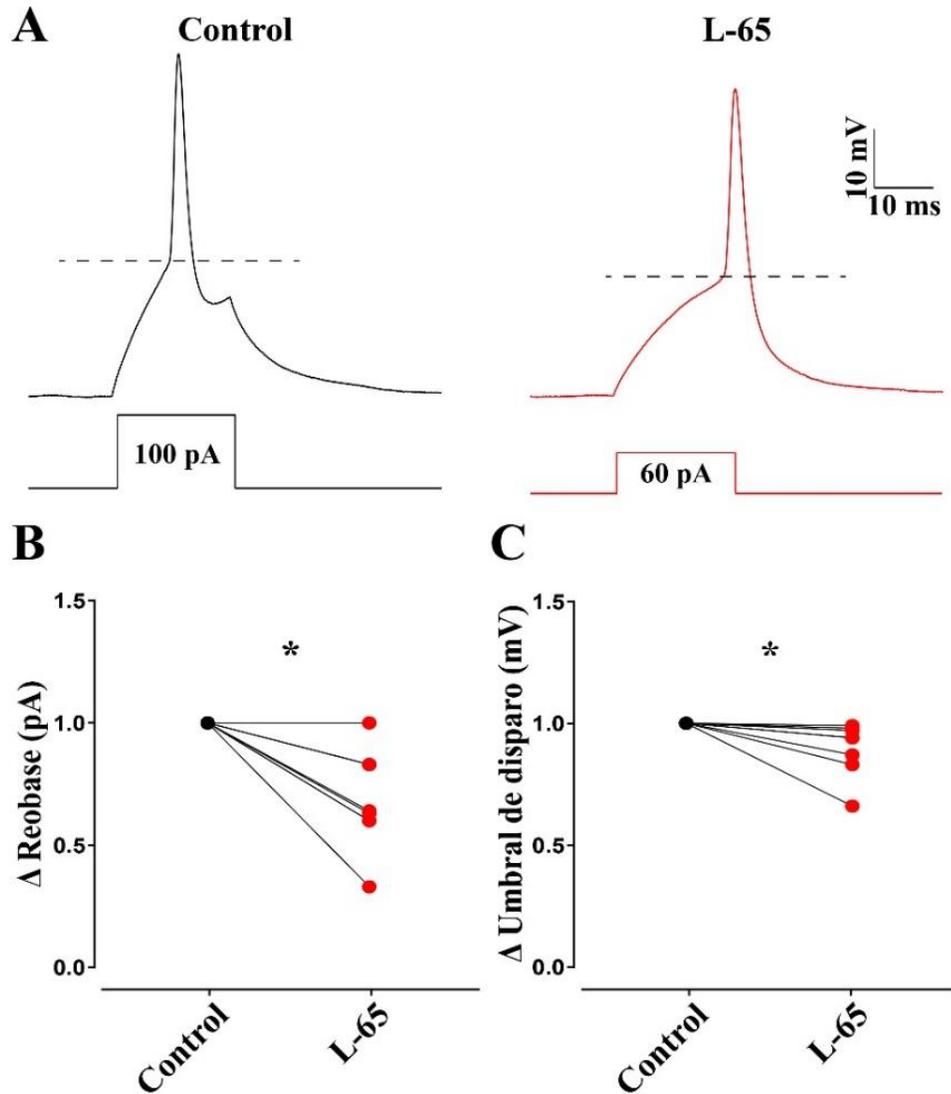


Figura 14. El bloqueo de los receptores α_5 GABA_A disminuye la rebase y el umbral de disparo de las neuronas de las láminas LI-LII del asta dorsal de la médula espinal lumbar. A) Respuesta de voltaje producida por la aplicación de un pulso de corriente despolarizante (supraumbral) de 20 ms de duración en condiciones control (negro) y en presencia de L-65 (rojo). B) Gráfico que representan el cambio (Δ) en la rebase normalizado con respecto al control en presencia de L-65 (Prueba de rangos Wilcoxon por pares, $p < 0.005^{**}$). C) Gráfico que representan el cambio (Δ) en el umbral de disparo normalizado con respecto al control en presencia de L-65 (Prueba de rangos Wilcoxon por pares, $p < 0.005^{**}$).

Adicionalmente la amplitud del PA, la capacitancia y el potencial de membrana no cambiaron en presencia de L-65 con respecto al control (tabla 1).

Parámetro	Control	L-65	Valor p
Cm (pF)	30 ± 3.71	29.8 ± 3.86	> 0.05
RM(MΩ)	568 ± 182	649 ± 190	< 0.05*
PMR (mV)	-55 ± 1.16	-54.9 ± 0.99	> 0.05
Reobase (pA)	126 ± 44.85	86.5 ± 28.52	< 0.005**
Umbral de disparo (mV)	-31.71 ± 1.91	-34.84 ± 1.61	< 0.005**
Amplitud PA (mV)	40.16 ± 3.42	38.99 ± 2.76	> 0.05

*,** prueba de rangos Wilcoxon por pares

Tabla 1. Propiedades electrofisiológicas pasivas y activas analizadas. Los valores mostrados para cada condición son la media ± SEM.

Discusión

El presente trabajo tuvo como primer objetivo realizar registros estables de neuronas de las láminas I y II de la médula espinal de ratas adultas, que tuvieran los patrones de descarga de PA previamente descritos. Como segundo objetivo, se determinó el papel del receptor α_5 GABA_A en la regulación de propiedades biofísicas de tales neuronas, como la excitabilidad, la resistencia, la reobase y el umbral de activación del PA.

Caracterización de las neuronas de las láminas I y II en función del patrón de descarga de potenciales de acción

De las 10 neuronas registradas en este trabajo cuatro mostraron un patrón de activación de un solo PA independientemente de la corriente despolarizante aplicada, por lo que se les conoce como patrón “único”. Este tipo neuronal fue reportado previamente (Todd, 2010; Li et al., 2021; Zhu et al., 2021). En estas neuronas no cambiaron su patrón de descarga de PA en presencia de L-65, por lo que no fue posible evaluar el cambio en excitabilidad en función de la descarga de PA ante pulsos despolarizantes prolongados (1 s).

Las restantes 6 neuronas si presentaron un patrón de descarga de PA semejante al reportado, cuatro tuvieron una descarga llamada “inicial”, una “tónico” y otra “fásico”. De acuerdo a la caracterización química y morfológica estas neuronas se consideran como glutamatérgicas (Todd, 2010; Yasaka et al., 2010; Li et al., 2021; Zhu et al., 2021).

Modulación de la excitabilidad neuronal por receptor α_5 GABA_A evidenciada por la descarga de potenciales de acción

De las 6 neuronas que presentaron un patrón de descarga de PA diferente al “único” solo en dos se observó un aumento estadísticamente significativo en el número de PA activados en presencia de L-65, como el mostrado en la figura 13. La curva se corrió a la izquierda indicando un incremento en la excitabilidad, resultado semejante a lo reportado en motoneuronas que también expresan el receptor α_5 GABA_A (Canto-Bustos et al., 2017). Además, este resultado demuestra que estos receptores están tónicamente activos en las neuronas de las láminas I y II, mediando una corriente tónica, como ya ha sido reportado por Pérez-Sánchez et al. (2017).

Modulación de la reobase, el umbral de activación del potencial de acción y de la resistencia de entrada mediada por el receptor α_5 GABA_A

Aunque no fue posible demostrar principalmente en las neuronas de disparo único una acción sobre el patrón de activación de PA por bloqueo del receptor α_5 GABA_A, si se observó en estas neuronas una disminución de 31 % en la reobase y de 9.8 % en el umbral de activación del PA. Además, también la resistencia de entrada de 8 de la 10 neuronas se incrementó significativamente, como ocurrió con las motoneuronas (Canto-Bustos et al., 2017). Estos resultados indican que la excitabilidad de estas neuronas está siendo tónicamente controlada por el mencionado receptor. Los valores obtenidos de la resistencia de entrada en el presente trabajo están en concordancia con los valores mostrados en trabajos previos, que están entre 150 M Ω y 1200 M Ω (Li et al., 2021; Zhu et al., 2021). Esta

variabilidad puede deberse a la gran heterogeneidad de subtipos neuronales dependiendo de sus características morfológicas y electrofisiológicas que existen dentro de este circuito ubicado en LI-LII (Todd, 2010; Li et al., 2021; Zhu et al., 2021). Los valores promedio obtenidos en estas propiedades biofísicas también se encuentran en concordancia con los datos mostrados en trabajos previos (Li et al., 2021; Zhu et al., 2021).

Relevancia del control inhibitorio mediado por los receptores α_5 GABA_A

En este trabajo se mostró que la excitabilidad de las neuronas pertenecientes al circuito que procesa la información nociceptiva ubicadas en las láminas I-II del asta dorsal de la médula espinal en animales sanos, está modulada por la actividad del receptor α_5 GABA_A. Esto podría explicar porque en los animales sanos se produce alodinia mecánica cuando se bloquean estos receptores por la aplicación intratecal de L-65 (Hernández-Reyes et al., 2015). Es importante resaltar que esta conducta se ha inducido por el bloqueo con bicuculina de todos los receptores GABA_A, lo que llevó a varios grupos de investigación a proponer que el dolor neuropático se induce por la pérdida de la inhibición GABAérgica sináptica (Zeilhofer et al., 2012; Bonin & De Koninck, 2013). Otros trabajos que apoyan esta última propuesta son de Baba et al. (1999, 2003), Torsney & MacDermott (2006) y Takazawa & MacDermott (2010). En estos estudios se registraron los potenciales sinápticos excitadores, evocados en las neuronas de proyección, por la estimulación de las fibras de bajo A β y de alto umbral A δ y C. Las primeras produjeron potencial excitadores polisinápticos de baja amplitud, mientras que las segundas fibras evocaron potenciales excitadores que podrían producir PA. Después de aplicar bicuculina los potenciales excitadores evocados por las fibras A β fueron de amplitudes semejantes a los evocados por

las fibras nociceptivas, lo que indicaría el origen de la alodinia, esto es que las fibras de bajo umbral activan PA en las neuronas de proyección. Esto indicaría que las interneuronas glutamatérgicas que conectan las fibras A β están sujetas a un fuerte control inhibitorio GABAérgico sináptico, que de acuerdo a la teoría de la compuerta del dolor de Melzack, R., & Wall (1965) mantendría cerrada la compuerta. Los hallazgos que indican la aparición de la alodinia mecánica por el bloqueo del receptor α_5 GABA_A (Hernández-Reyes et al., 2019; Bravo-Hernández et al., 2016; De la Luz-Cuellar et. al, 2019) muestran que este receptor podría ser el que inhibe la transmisión sináptica de las fibras A β con las neuronas de proyección. Función que respaldan mis resultados electrofisiológicos.

La acción antinociceptiva generada por el bloqueo del receptor α_5 GABA_A en condiciones de dolor neuropático también podría explicarse tomando como punto de partida los resultados de este trabajo. Estudios previos mostraron que en condiciones de dolor crónico existe un incremento en la concentración intracelular de Cl⁻ en las neuronas pertenecientes al circuito que procesa la información nociceptiva que despolariza el E_{Cl⁻} (Coull et al., 2003, 2005) por lo que, de acuerdo con mis resultados, el receptor α_5 GABA_A al estar tónicamente activo en estas neuronas por el GABA endógeno generaría una despolarización tónica en estas neuronas (como consecuencia del cambio de gradiente electroquímico del Cl⁻), perdiéndose el control inhibitorio, de tal modo que las A β de bajo umbral logran generar PA en las NP, lo que a nivel de comportamiento significa la aparición de la alodinia. Esto explicaría porque cuando se bloquea este receptor en animales con dolor neuropático se revierte la alodinia (Bravo-Hernández et al., 2014, 2016; De la Luz-Cuellar et al., 2019; Hernández-Reyes et al., 2019). Se puede especular que esta acción se debe a la eliminación de una despolarización tónica mediada por este receptor extrasináptico. .

Esta propuesta no fue abordada en este trabajo, sin embargo, también nos ofrece una alternativa para el estudio del papel pronociceptivo del receptor α_5 GABA_A mostrado en los diversos modelos de dolor crónico, que como ya se ha mencionado está en contra de la propuesta de diversos grupos de investigación, que no consideran la relevancia del papel de este receptor en la generación y reversión del dolor crónico (Delgado-Lezama et al., 2021).

Conclusiones

Este trabajo se mostró la relevancia de la actividad del receptor α_5 GABA_A en las neuronas pertenecientes al circuito que procesa la información nociceptiva dentro de las láminas I-II del asta dorsal de la médula espinal. Generando las bases técnicas para el estudio del papel de este receptor en la médula espinal de animales sanos y con dolor, con el fin de dar sustento a una propuesta terapéutica farmacológica alternativa para tratar el dolor crónico.

Bibliografía

- Baba, H., Doubell, T. P., & Woolf, C. J. (1999). Peripheral inflammation facilitates A β fiber-mediated synaptic input to the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord. *Journal of Neuroscience*, *19*(2), 859–867. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-02-00859.1999>
- Baba, H., Ji, R. R., Kohno, T., Moore, K. A., Ataka, T., Wakai, A., Okamoto, M., & Woolf, C. J. (2003). Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *24*(3), 818–830. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00236-7](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00236-7)
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, *139*(2), 267–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>
- Bear, M., Connors, B., & Paradiso, M. (2016). *Neuroscience: Exploring the Brain* (4th ed). Wolters Kluwer.
- Bohlhalter, S., Weinmann, O., Mohler, H., & Fritschy, J. M. (1996). Laminar compartmentalization of GABAA-receptor subtypes in the spinal cord: An immunohistochemical study. *Journal of Neuroscience*, *16*(1), 283–297. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-01-00283.1996>
- Bonin, R. P., & De Koninck, Y. (2013). Restoring ionotropic inhibition as an analgesic strategy. *Neuroscience Letters*, *557*, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.09.047>
- Bowery, N. (1989). GABAB receptors and their significance in mammalian pharmacology.

Trends in Pharmacological Sciences, 10(10), 401–407. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(89\)90188-0](https://doi.org/10.1016/0165-6147(89)90188-0)

Bravo-Hernández, M., Corleto, J. A., Barragán-Iglesias, P., González-Ramírez, R., Pineda-Farias, J. B., Felix, R., Calcutt, N. A., Delgado-Lezama, R., Marsala, M., & Granados-Soto, V. (2016). The $\alpha 5$ subunit containing GABAA receptors contribute to chronic pain. *Pain*, 157(3), 613–626. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000410>

Bravo-Hernández, M., Feria-Morales, L. A., Torres-López, J. E., Cervantes-Durán, C., Delgado-Lezama, R., Granados-Soto, V., & Rocha-González, H. I. (2014). Evidence for the participation of peripheral $\alpha 5$ subunit-containing GABAA receptors in GABAA agonists-induced nociception in rats. *European Journal of Pharmacology*, 734(1), 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.03.051>

Canto-Bustos, M., Loeza-Alcocer, E., Cuellar, C. A., Osuna, P., Elias-Viñas, D., Granados-Soto, V., Manjarrez, E., Felix, R., & Delgado-Lezama, R. (2017). Tonically active $\alpha 5$ GABA_A receptors reduce motoneuron excitability and decrease the monosynaptic reflex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00283>

Caspary, T., & Anderson, K. V. (2003). Patterning cell types in the dorsal spinal cord: What the mouse mutants say. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(4), 290–298. <https://doi.org/10.1038/nrn1073>

Coull, J. A. M., 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.

<https://doi.org/10.1038/nature04223>

Coull, J. A. M., 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. <https://doi.org/10.1038/nature01868>

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 $\alpha 5$ -GABAA receptors differentially reduces reserpine-induced fibromyalgia-type pain in female rats. *European Journal of Pharmacology*, *858*(May), 172443. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172443>

Delgado-Lezama, R., Bravo-Hernández, M., Franco-Enzástiga, Ú., De la Luz-Cuellar, Y. E., Alvarado-Cervantes, N. S., Raya-Tafolla, G., Martínez-Zaldivar, L. A., Vargas-Parada, A., Rodríguez-Palma, E. J., Vidal-Cantú, G. C., Guzmán-Priego, C. G., Torres-López, J. E., Murbartían, J., Felix, R., & Granados-Soto, V. (2021). The role of spinal cord extrasynaptic $\alpha 5$ GABAA receptors in chronic pain. *Physiological Reports*, *9*(16), 1–10. <https://doi.org/10.14814/phy2.14984>

Farrant, M., & Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: Phasic and tonic activation of GABA A receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(3), 215–229. <https://doi.org/10.1038/nrn1625>

Hernández-Reyes, J. E., Salinas-Abarca, A. B., Vidal-Cantú, G. C., Raya-Tafolla, G., Elias-Viñas, D., Granados-Soto, V., & Delgado-Lezama, R. (2019). $\alpha 5$ GABAA receptors play a pronociceptive 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. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001515>

Instituto Nacional de Salud Pública, (2020). Día Mundial contra el Dolor: el alivio es un derecho universal. <https://www.insp.mx/avisos/5097-dia-mundial-dolor-cronico.html>

International Association for the Study of Pain, (2021). IASP Terminology. <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/>

Jacob, T. C., Moss, S. J., & Jurd, R. (2008). GABAA receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(5), 331–343. <https://doi.org/10.1038/nrn2370>

Kullmann, D. M., Ruiz, A., Rusakov, D. M., Scott, R., Semyanov, A., & Walker, M. C. (2005). Presynaptic , extrasynaptic and axonal GABA A receptors in the CNS : where and why? *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 87, 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2004.06.003>

Li, Y., Su, S., Yu, J., Peng, M., Wan, S., & Ke, C. (2021). Electrophysiological Properties of Substantia Gelatinosa Neurons in the Preparation of a Slice of Middle-Aged Rat Spinal Cord. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13(March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.640265>

Melzack, R., & Wall, P. D. (1965). *Pain Mechanisms: A New Theory*. *Science*, 150(3699), 971–978. 1–27.

Möhler, H. (2007). Molecular regulation of cognitive functions and developmental plasticity: Impact of GABAA receptors. *Journal of Neurochemistry*, 102(1), 1–12.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04454.x>

Paul, J., Yévenes, G. E., Benke, D., Lio, A. Di, Ralvenius, W. T., Witschi, R., Scheurer, L., Cook, J. M., Rudolph, U., Fritschy, J. M., & Zeilhofer, H. U. (2014). Antihyperalgesia by 2-GABA A receptors occurs via a genuine spinal action and does not involve supraspinal sites. *Neuropsychopharmacology*, 39(2), 477–487.

<https://doi.org/10.1038/npp.2013.221>

Paul, J., Zeilhofer, H. U., & Fritschy, J. M. (2012). Selective distribution of GABA_A receptor subtypes in mouse spinal dorsal horn neurons and primary afferents. *Journal of Comparative Neurology*, 520(17), 3895–3911. <https://doi.org/10.1002/cne.23129>

Perez-Sanchez, J., Lorenzo, L. E., Lecker, I., Zurek, A. A., Labrakakis, C., Bridgwater, E. M., Orser, B. A., De Koninck, Y., & Bonin, R. P. (2017). α 5GABA_A 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. <https://doi.org/10.1002/jnr.23981>

Petroff, O. A. C. (2002). GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist*, 8(6), 562–573. <https://doi.org/10.1177/1073858402238515>

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, P., Nicholas, M., ... Treede, R. D. (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic neuropathic pain. *Pain*, 160(1), 53–59. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001365>

Takazawa, T., & MacDermott, A. B. (2010a). Glycinergic and GABAergic tonic inhibition

fine tune inhibitory control in regionally distinct subpopulations of dorsal horn neurons. *Journal of Physiology*, 588(14), 2571–2587. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.188292>

Takazawa, T., & MacDermott, A. B. (2010b). Synaptic pathways and inhibitory gates in the spinal cord dorsal horn. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1198, 153–158. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05501.x>

Thai, V., & Fainsinger, R. L. (2011). Pain. In *Palliative Care* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-1619-1.00007-X>

Todd, A. J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(12), 823–836. <https://doi.org/10.1038/nrn2947>

Torsney, C., & MacDermott, A. B. (2006). Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 26(6), 1833–1843. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4584-05.2006>

Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T., & Hayasaki, H. (2002). GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *International Review of Cytology*, 213, 1–47. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(02\)13011-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(02)13011-7)

Yasaka, T., Tiong, S. Y. X., Hughes, D. I., Riddell, J. S., & Todd, A. J. (2010). Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain*, 151(2), 475–488. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.08.008>

Zeilhofer, H. U., Wildner, H., & Yévenes, G. E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiological Reviews*, *92*(1), 193–235.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2010>

Zhu, M., Yan, Y., Cao, X., Zeng, F., Xu, G., Shen, W., Li, F., Luo, L., Wang, Z., Zhang, Y., Zhang, X., Zhang, D., & Liu, T. (2021). Electrophysiological and Morphological Features of Rebound Depolarization Characterized Interneurons in Rat Superficial Spinal Dorsal Horn. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *15*(September), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2021.736879>