



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Papel del receptor  $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub> en la modulación de la excitabilidad  
de las neuronas que procesan el dolor en la médula espinal”**

**TESIS**

que presenta

**LUCERO GUZMÁN PÉREZ**

para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

en la especialidad de

**NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

Director de la Tesis:

**DR. JOSÉ RODOLFO DELGADO LEZAMA**

Ciudad de México

AGOSTO, 2023

# Contenido

<b>Agradecimientos</b>	4
<b>Abreviaturas</b>	5
<b>Resumen</b>	6
<b>Abstract</b>	7
<b>Introducción</b>	8
<b>Dolor</b>	8
<b>Circuito neuronal que procesa el dolor en la médula espinal</b>	9
Aferentes primarias	9
Tipos de fibras aferentes primarias	10
Neuronas de las láminas I-IV	11
Conexión entre las neuronas de las láminas I-IV y las fibras aferentes primarias	13
Conexión entre las neuronas de las láminas I-IV y las neuronas de proyección	14
<b>Inhibición GABAérgica</b>	15
El GABA	16
Mecanismos de acción del GABA	17
Tipos de receptores a GABA	18
Subtipos de receptores GABA <sub>A</sub>	19
Receptores $\alpha_6$ GABA <sub>A</sub>	20
Furosemida	20
<b>Antecedentes de los mecanismos funcionales en el circuito de procesamiento de la nocicepción</b>	22
La electrofisiología en el estudio biofísico y funcional de las neuronas	22
Participación de las neuronas de la asta dorsal en la alodinia	22
Inhibición GABAérgica en el dolor	24
Inhibición GABAérgica en la médula espinal	25
<b>Planteamiento del problema</b>	28
<b>Hipótesis</b>	28
<b>Objetivo General</b>	28
<b>Objetivos particulares</b>	29

<b>Materiales y métodos</b>	30
Preparación	30
Obtención de la médula espinal	30
Registro electrofisiológico	31
Protocolo de registro	31
Aplicación del fármaco	34
<b>Resultados</b>	35
Identificación de las neuronas en las láminas I-III	35
Clasificación de las neuronas de las láminas I-III de acuerdo con su patrón de disparo	36
Efecto de la furosemida en las propiedades pasivas y activas de la membrana	39
Potencial de membrana en reposo (PMR)	39
Resistencia de membrana	41
Umbral de activación de un potencial de acción	43
La Reobase	45
Potenciales de acción	47
Efecto de la furosemida en las propiedades pasivas y activas de la membrana en presencia de GABA	51
<b>Discusión</b>	56
Registros electrofisiológicos en ratas adultas	56
Clasificación de las neuronas de las láminas I-III de la médula espinal	57
Papel de los receptores $\alpha_6$ GABA <sub>A</sub> en la excitabilidad de las neuronas de las láminas I-III	57
<b>Conclusión</b>	59
<b>Bibliografía</b>	61

## **Agradecimientos**

Agradezco el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT).

Al Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias y por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) por su contribución a mi formación profesional.

A Guadalupe Raya Tafolla y Arturo Mena Vieira por su apoyo y buena disposición.

A mis compañeros de laboratorio por sus consejos para mejorar este trabajo.

Agradezco al Dr. Vladimir Martínez Rojas por sus enseñanzas, orientación y paciencia, pero, sobre todo, por ser una inspiración como investigador y electrofisiólogo.

Así mismo, agradezco a mis asesores el Dr. Jorge Noel Quevedo Durán y el Dr. Ricardo Félix Grijalva por su tiempo y sugerencias en la revisión de este proyecto.

Finalmente agradezco al Dr. José Rodolfo Delgado Lezama por permitirme formar parte de su laboratorio y por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto de investigación bajo su cargo.

## Abreviaturas

**$\alpha_5$ GABAA:** receptores a GABA del subtipo *alfa 5*

**$\alpha_6$ GABAA:** receptores a GABA del subtipo *alfa 6*

**Cl<sup>-</sup>:** ion cloruro

**E<sub>m</sub>:** potencial de equilibrio de la membrana

**E<sub>Cl</sub>:** potencial de equilibrio del Cloro

**Fig.:** Figura

**GABA:** ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**GABA<sub>A</sub>:** receptor a GABA del tipo ionotrópico

**GABA<sub>B</sub>:** receptor a GABA del tipo metabotrópico

**GRD:** ganglio de la Raíz Dorsal

**K<sup>+</sup>:** ion potasio

**KCC2:** transportador cloro/potasio

**L-65:** L-655,708 (agonista inverso del receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>)

**min:** minuto

**mm:** milímetro

**mV:** milivoltios

**PA:** potencial de Acción

**pA:** pico amperios

**PMR:** potencial de membrana en reposo

**pS:** pico siemens

**RGABA:** Receptores a GABA

**$\mu$ m:** micra

**$\mu$ M:** micro Molar

**V<sub>m</sub>:** potencial de membrana en reposo

## Resumen

El dolor neuropático es un tipo de dolor crónico que tiene una gran prevalencia en el ser humano, se desarrolla como consecuencia de lesiones del sistema somatosensorial. Los estudios enfocados en determinar los mecanismos celulares que subyacen el dolor neuropático han demostrado la importancia de la inhibición tónica mediada por los receptores GABA<sub>A</sub> expresados en la médula espinal. En particular los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> extrasinápticos, expresados en las láminas I y II (LI y LII), tienen un papel antinociceptivo y pronociceptivo en animales sanos y neuropáticos, respectivamente. Nuestro equipo de trabajo ha demostrado que también el bloqueo de los receptores  $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub> extrasinápticos con furosemida produce alodinia mecánica y analgesia en animales sanos y prediabéticos, respectivamente. Además, estos receptores se expresan en las neuronas de las láminas I-III del asta dorsal de la médula espinal donde localiza el circuito que procesa la información nociceptiva. No obstante, se desconoce si estos receptores producen una inhibición tónica y si modulan las propiedades activas y pasivas de tales neuronas. En este estudio se caracterizaron las neuronas de las láminas I-III de la médula espinal, por sus patrones de disparo y sus propiedades pasivas y activas, así como su modulación por los receptores  $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub> mediante su bloqueo con furosemida.

## Abstract

Neuropathic pain is a type of chronic pain that is highly prevalent in humans and develops as a consequence of lesions of the somatosensory system. Studies focused on determining the cellular mechanisms underlying neuropathic pain have demonstrated the importance of tonic inhibition mediated by GABA<sub>A</sub> receptors expressed in the spinal cord. In particular, extrasynaptic  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> receptors, expressed in laminae I-II, have an antinociceptive and pronociceptive role in healthy and neuropathic animals, respectively. Our working group has shown that the blockade of extrasynaptic  $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub> receptors with furosemide produces mechanical allodynia and analgesia in healthy and prediabetic animals, respectively. Furthermore, these receptors are expressed on neurons in laminae I-III of the dorsal horn of the spinal cord where nociception is processed; however, it is unknown whether they mediate tonic inhibition and modulate the active and passive properties of such neurons. In this study, the neurons of laminae I-III of the spinal cord will be characterized by their firing patterns and their passive and active properties, as well as their modulation by  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> receptors through their blockade with furosemide.

# Introducción

## Dolor

De acuerdo con la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, 2021), el dolor se define como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con, o similar a la asociada con, daño tisular real o potencial”.

De manera general, el dolor se puede clasificar en dos tipos: el primero conocido como dolor agudo, se genera con la presencia de estímulos nocivos, tiene una duración limitada y da lugar a estrategias conductuales o reflejas de evitación, por lo que es considerado como un mecanismo de defensa del organismo (Woolf y Doubell, 1994), debido a que se presenta como consecuencia de la lesión o inflamación de tejidos blandos y su función es adaptativa; mientras que el segundo denominado “dolor crónico” es persistente y desadaptativo.

A su vez, el dolor crónico se divide en dos tipos: el nociceptivo, puede ser generado por cáncer, por la lesión de los tejidos como músculo, vísceras, entre otros; el neuropático, tiene una duración mayor a tres meses y no ofrece ninguna ventaja para la supervivencia, ya que es el resultado de alteraciones funcionales del sistema somatosensorial, originadas por lesiones o por trastornos patológicos (IASP, 2021) que inducen a un estado de sensibilización central, caracterizada por la hiperexcitabilidad en el sistema nervioso (Wolf, 1983). Esta tipología se manifiesta con dolor espontáneo y difuso, acompañado de alteraciones sensoriales y perceptivas; con disminución o pérdida de la sensibilidad, y/o aparición de alodinia (dolor ante estímulos inocuos) e hiperalgesia (aumento de la intensidad del dolor) (Scholz et al., 2019; Gu et al., 2005.).

Dentro de las lesiones nerviosas que lo inducen se encuentran: la neuralgia del trigémino, polineuropatía dolorosa y neuropatía diabética. Cada uno con diferente etiología, fisiopatología y signos clínicos, adicional a esto, debido a la sensibilización central, en el dolor crónico el tratamiento con analgésicos convencionales no da resultados satisfactorios, lo cual genera un impacto negativo en la calidad de vida de quien lo padece.



## **Circuito neuronal que procesa el dolor en la médula espinal**

El procesamiento del dolor inicia como respuesta ante un estímulo ya sea mecánico, térmico o químico con la suficiente intensidad como para generar un posible daño, por lo cual se conoce como estímulo nocivo, dicho estímulo es capaz activar las fibras aferentes primarias del tipo C y A<sub>δ</sub> de alto umbral, que transducen la energía recibida en un potencial de acción, el cual viaja al asta dorsal de la médula espinal, en donde la información es transmitida monosinápticamente a las neuronas de proyección y a las interneuronas gabaérgicas y glutamatérgicas de las láminas I-III (Fig.1). Las neuronas de proyección envían la información de dolor a los núcleos supraespinales hasta el tálamo (Todd, 2010; Zeilhofer, 2012). Paralelo a esto, la información nociceptiva también se transmite al asta ventral, donde activa los reflejos nocifensivos.

Así, la médula espinal es esencial en la primera etapa de procesamiento central de la información nociceptiva, donde el control inhibitorio, mediado por el GABA y la glicina, es esencial en la modulación de la nocicepción.

### **Aferentes primarias**

Las fibras aferentes primarias nociceptivas son una subpoblación de fibras con propiedades biofísicas y moleculares que les permiten detectar selectivamente estímulos térmicos, mecánicos y químicos nocivos. Su principal transmisor es el glutamato, por lo que ejercen una acción excitadora posináptica (Todd, 2010).

Su soma se localiza en el ganglio de la raíz dorsal (GRD) y están conformados por dos ramas axonales, una que inerva el órgano diana y otra que inerva a las neuronas de la médula espinal (Basbaum et al., 2009). Esta característica pseudounipolar hace posible que la mayoría de las proteínas sintetizadas en el GRD se distribuyan en ambas direcciones, lo que da como resultado que el nociceptor sea capaz de enviar y recibir mensajes desde las dos terminales. Adicionalmente, bajo condiciones especiales, la terminal periférica puede liberar neuropéptidos, como la sustancia P, provocando alteraciones en el entorno tisular local, como en el caso de la inflamación neurogénica (Basbaum et al., 2009).

## Tipos de fibras aferentes primarias

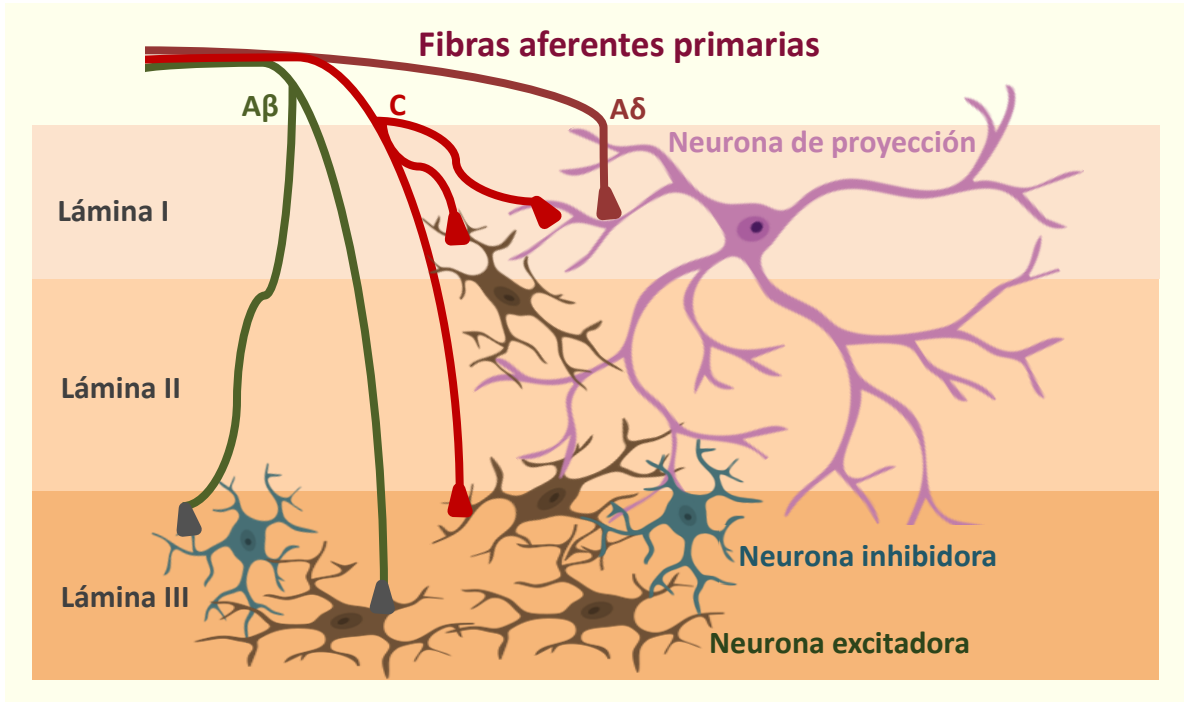
De manera general, las fibras aferentes primarias se clasifican en dos grupos, las aferentes mielinizadas:  $A_{\alpha/\beta}$  (I-II) y  $A_{\delta}$  (III) y las que carecen de mielina tipo C (IV), mismas que se describen a continuación:

**Fibras  $A_{\alpha/\beta}$ :** estas fibras son de las de mayor diámetro ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ) y velocidad de conducción (30 a 100 m/s), son las de más bajo umbral. Las  $A_{\alpha}$  son propioceptivas; mientras que las  $A_{\beta}$  responden a estímulos inocuos o de tacto ligero (Lynn, 1994; Abaira y Ginty, 2013). Su activación en humanos sanos produce sensaciones de presión o vibración, pero nunca de dolor, incluso ante la estimulación a frecuencias elevadas, sin embargo, en quemaduras, su activación puede provocar dolor (Woolf y Doubell, 1994).

**Fibras  $A_{\delta}$ :** tienen un diámetro de  $\sim 1-5 \mu\text{m}$ , su velocidad de conducción varía de 5 a 30 m/s, regulan el dolor agudo y bien localizado (Lynn, 1994; Abaira y Ginty, 2013). De acuerdo con sus características electrofisiológicas, los nociceptores  $A_{\delta}$  se han dividido en dos grupos. El tipo I, de alto umbral, responde a estímulos mecánicos y químicos y a temperaturas superiores a los  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Otra propiedad importante es que, en caso de lesión tisular, estas fibras disminuyen su umbral térmico o mecánico, es decir, se sensibilizan. Mientras que el tipo II, tiene un umbral más bajo a la temperatura, pero su umbral mecánico es muy alto (Basbaum et al., 2009).

**Fibras C o tipo IV:** su diámetro es de  $\sim 1 \mu\text{m}$ , y su velocidad de conducción oscila entre los 0.2 y 2 m/s. Son fibras amielínicas sensibles al calor, con la característica particular que desarrollan sensibilidad mecánica ante una lesión (Lynn, 1994; Schmidt et al., 1995). Responden a los estímulos químicos, como a la histamina y la capsaicina, esto genera que, en un contexto de inflamación, sus propiedades se vean afectadas (Abaira y Ginty, 2013).

Así mismo, de acuerdo con sus propiedades neuroquímicas se dividen en dos grupos: las peptidérgicas que liberan neuropéptidos, como la sustancia P, inervan regiones profundas de la piel, entre otros tejidos y las no peptidérgicas, que inervan principalmente la epidermis (Basbaum et al., 2009).



**Figura 1. Representación esquemática de las fibras aferentes primarias que inervan la médula espinal.** Las fibras  $A\beta$  inervan principalmente la lámina III; mientras que las fibras  $A\delta$  y C hacen contacto sináptico con neuronas de proyección e interneuronas GABAérgicas y glutamatérgicas presentes en las láminas I, II y III (Imagen modificada de Todd, 2010).

### Neuronas de las láminas I-IV

El asta dorsal de la médula espinal se divide en láminas de acuerdo con la distribución anatómica y características electrofisiológicas de las neuronas que la integran. Se considera que al menos un 90 por ciento son interneuronas, mismas que pueden ser excitadoras o inhibitorias, de acuerdo con el neurotransmisor que liberan; aproximadamente el 70% liberan glutamato y se localizan en las láminas I-III; mientras que las inhibitorias que liberan GABA se distribuyen en un 25% en la lámina I, 30% en la lámina II y 40% en la lámina III, donde coliberan glicina (Todd, 2010).

Estas neuronas también se clasificaron según sus características morfológicas y biofísicas: la diferenciación morfológica se basa en la distribución del árbol dendrítico con respecto al soma, lo cual define la morfología neuronal y de acuerdo con esto se han

clasificado de manera general cómo unipolares, multipolares, con diversos órdenes de ramificación, con estructuras tridimensionales complejas (Moliner, 1968; Johnston, et al., 1996). En el caso de las interneuronas del asta dorsal, se han realizado estudios de reconstrucciones tridimensionales de neuronas de cada una de las láminas:

**Lámina I:** se han identificado cuatro tipos; fusiforme pequeñas (10  $\mu\text{m}$ ) y grandes (20  $\mu\text{m}$ ), aplanado, multipolar y piramidal, tienen la principal característica de que su árbol dendrítico tiene una longitud entre 20 y 50  $\mu\text{m}$ , el cual se extiende en el eje rostro-caudal, medio lateral y dorso-ventral (Chéry et al., 2000).

**Lámina II:** comparte algunos de los tipos de neuronas identificadas en la lámina I, con la diferencia de que los somas celulares van de 15 a 20  $\mu\text{m}$ , y cuya arborización se extiende principalmente dorso-ventral de 40 a 50  $\mu\text{m}$ . Conocidas como islotes, radiales, verticales y las que no comparten las características de ninguna de las anteriores (Chéry et al., 2000). Las neuronas pertenecientes a esta lámina han sido las más estudiadas debido a que se consideran como la “puerta central” para la modulación y transmisión sináptica (Zhu et al., 2021).

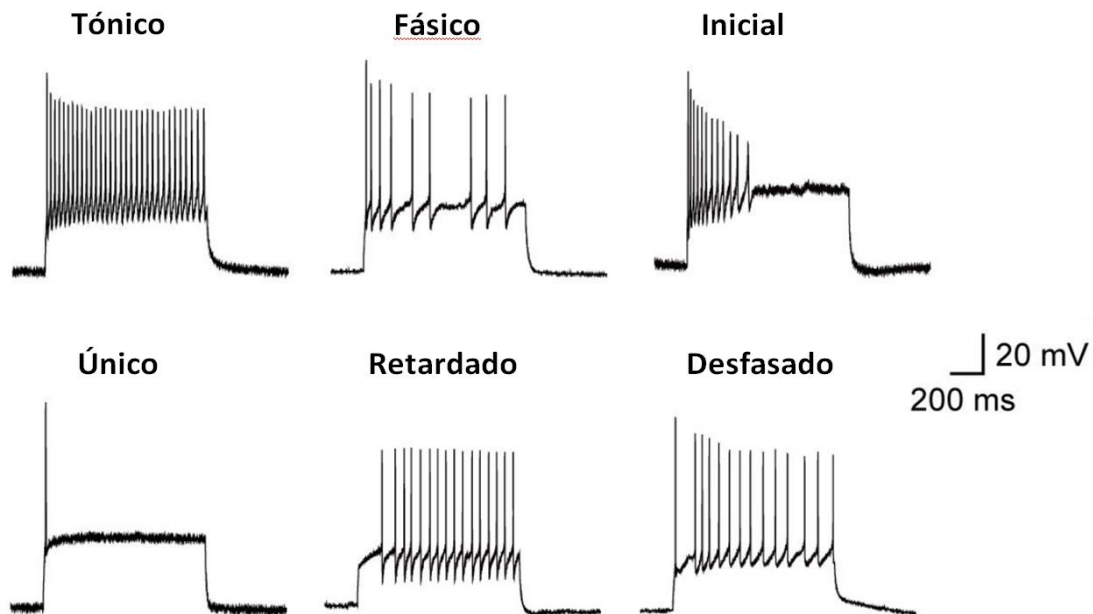
**Láminas III y IV:** presentan neuronas con cuerpos celulares fusiformes y tamaño similares a los de las láminas I y II. Sin embargo, lo que las diferencia es el árbol dendrítico, cuya longitud rostro-caudal es superior a las 150  $\mu\text{m}$  (Miranda et al., 2022).

De acuerdo con sus características biofísicas, como su patrón de disparo de los potenciales de acción las interneuronas del asta dorsal de la médula espinal se han clasificado en: tónica, fásica, inicial, único por presentar un solo potencial de acción, retardado y desfasado (Fig. 2) (Zhu et al., 2021; Li et al., 2021). Sin embargo, es importante mencionar que la mayoría de estos estudios se han enfocado en la lámina II o sustancia gelatinosa.

Adicionalmente, existen estudios que proponen la relación de las propiedades electrofisiológicas con el tipo de neurotransmisor que liberan. Se considera que las neuronas que presentan un patrón de disparo tónico son GABAérgicas o inhibitorias,

mientras que las glutamatérgicas o excitadoras presentan patrones de disparo retardado y de un solo potencial de acción (Li et al., 2021).

Sumado a esto, su función también está determinada por las proyecciones que reciben de las aferentes primarias, como se expone en el siguiente apartado.



**Figura 2. Clasificación de acuerdo con el patrón de disparo.** Registros de los patrones de disparo de potenciales de acción representativos de neuronas presentes en la Lámina II del asta dorsal de la médula espinal de ratas de 4 a 6 semanas de edad (Imagen modificada de Zhu et al., 2021).

### **Conexión entre las neuronas de las láminas I-IV y las fibras aferentes primarias**

**Lámina I:** también es conocida como zona marginal, debido a que se localiza en la parte superior del asta dorsal. Es una capa delgada conformada principalmente por células de forma piramidal, fusiforme y multipolar. Y responden a la estimulación nociva, proveniente de las fibras A<sub>δ</sub> y C (Rexed, 1952; Todd, 2010).

**Lámina II:** también llamada sustancia gelatinosa (SG) de Rolando, se divide en Ilo (externa) y Ili (interna). Se trata de una banda bien definida, integrada por células pequeñas. En la

parte más dorsal o lámina Ilo, se localizan terminales de fibras aferentes peptidérgicas de tipo C y  $A_{\delta}$ , mientras la parte central de la lámina II contiene interneuronas excitadoras que expresan la isoforma gamma de la proteína quinasa C (PKC), mismas que reciben aferentes de fibras C no peptidérgicas, conocidas por su participación en el dolor persistente causado por lesiones (Malmberg et al., 1997). Por su parte, la lámina Ili recibe entradas de las fibras  $A_{\beta}$ .

**Lámina III:** está integrada por células más grandes que las de la lámina II y reciben aferentes de tipo  $A_{\beta}$  y  $A_{\delta}$  (Fig. 1).

**Lámina IV:** está formada por una mezcla de todos los tamaños de células. En esta lámina se presentan terminales de las fibras aferentes  $A_{\beta}$ .

**Lámina V:** contiene una cantidad menor de células que la IV, son células grandes de coloración oscura y células medianas más claras que predominan en la zona media (Rexed, 1952). Reciben aferentes monosinápticas de las fibras aferentes primarias  $A_{\delta}$  y  $A_{\beta}$ , además de polisinápticas provenientes de fibras aferentes tipo C.

### **Conexión entre las neuronas de las láminas I-IV y las neuronas de proyección**

Las neuronas de proyección son las que transmiten la información de dolor a los núcleos supraespinales. Se encuentran mayormente en la lámina I, en menor cantidad en las láminas III y IV y difusamente en la lámina II (Todd, 2010).

**Lámina I:** las neuronas de proyección se dirigen hacia el tálamo enviando proyecciones al bulbo caudal-ventrolateral (BVLM), el núcleo del tracto solitario (NTS), el área parabraquial lateral (LPb) y la materia gris periacueductal (PAG), de tal manera que forman parte de circuitos relacionados con aspectos sensoriales y motivacionales del dolor (Todd, 2010). El 80% de las neuronas de proyección en esta lámina, expresan el receptor de neuroquinina 1 (NK1R), un receptor al que se une la sustancia P liberado por la aferentes de tipo C, la mayoría de estas neuronas se activan ante estímulos nocivos, el cual está relacionado con el desarrollo de hiperalgesia en modelos de dolor neuropático. Las neuronas de proyección

de la lámina I reciben información monosináptica de los aferentes nociceptivos de alto umbral A $\delta$  y C (Fig. 1) (Todd, 2010).

Mientras que, dentro del grupo de neuronas de proyección que carecen de NK1R, se encuentran neuronas multipolares que expresan Fos, reciben una gran cantidad de entradas tanto excitadoras como inhibitorias, sin embargo, comprenden sólo del 2-3% del total de las neuronas de proyección de la lámina I.

Las células gigantes de la lámina I están densamente invadas por botones GABAérgicos que contienen la forma neuronal del óxido nítrico sintasa (nNOS) (un marcador de las neuronas que coliberan GABA y glicina en el asta dorsal (Todd, 2010).

**Lámina II:** las neuronas de proyección presentes en esta lámina reciben entrada monosináptica de fibras de bajo umbral A $\beta$ , además, las células verticales glutamatérgicas en la lámina II que están invadas por aferentes A $\delta$  se conectan sinápticamente con las neuronas de proyección de la lámina I que expresan NK1R (Todd, 2010).

**Lámina III:** las neuronas de proyección que expresan el NK1R están altamente invadas por aferentes tipo C peptidérgicas. Estas células reciben numerosas sinapsis de las neuronas GABAérgicas que contienen el neuropéptido Y (NPY), mismas que pueden ser de las interneuronas inhibitorias locales, por el contrario, reciben pocos contactos de interneuronas inhibitorias que contienen nNOS (Todd, 2010).

## **Inhibición GABAérgica**

La actividad neuronal está regulada por los mecanismos de señalización excitador e inhibitor, los cuales trabajan en conjunto para mantener la funcionalidad del sistema. “En el funcionamiento de la maquinaria nerviosa central, la inhibición parece tan omnipresente y frecuente como la excitación misma. Toda la caracterización cuantitativa de las operaciones de la médula espinal y el cerebro parece descansar sobre la interacción mutua y constante entre los dos procesos centrales de "excitación" e "inhibición", uno no menos importante que el otro” (Sherrington, 1932; Fishell y Rudy, 2011). En el caso de la inhibición

neuronal a nivel del sistema nervioso central, las principales moléculas neurotransmisoras son el GABA y la glicina (Pasantés-Morales y Aréchiga, 1983).

## **El GABA**

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el Sistema Nervioso Central (SNC) en mamíferos maduros, así como en vertebrados, es el neurotransmisor con mayor distribución anatómica y funcional, por lo que su papel en la modulación de la actividad neuronal es fundamental para mantener el equilibrio en las funciones vitales, incluida la actividad motriz, secreción de hormonas, o el mantenimiento del equilibrio emocional e intelectual (Macdonald y Olsen, 1994; Farrant y Nusser, 2005).

El GABA lleva a cabo su acción a través de un proceso complejo que involucra múltiples mecanismos celulares y moleculares. Para empezar, la síntesis de este neurotransmisor se da en las neuronas GABAérgicas, en donde las enzimas de glutamato descarboxilasa (GAD 65 y GAD 67) sintetizan GABA a partir de glutamato (Varju et al., 2001), enseguida el transportador vesicular de GABA (VGAT) lo transporta al interior de las vesículas, que al fusionarse con la membrana lo liberan a la hendidura sináptica.

Una vez difundido en la hendidura sináptica, el GABA se une a los receptores GABA. En el caso particular de los receptores GABA<sub>A</sub> ionotrópicos de la membrana postsináptica, que, en las neuronas del sistema nervioso central, permean los iones cloruro (Cl<sup>-</sup>) al interior de la célula, resultando en la hiperpolarización del potencial de membrana y por lo tanto en la disminución de la excitabilidad neuronal (Macdonald y Olsen, 1994; Farrant y Nusser, 2005).

Finalmente, el GABA es removido de la hendidura sináptica por la glía, principalmente por los astrocitos, a través de los transportadores GAT-1 y GAT-3, respectivamente (Varju et al., 2001). También, participan en este proceso las mismas neuronas GABAérgicas, las cuales llevan a cabo la recaptura presináptica del GABA, por medio de los transportadores GAT-1 y GAT-2.



## **Mecanismos de acción del GABA**

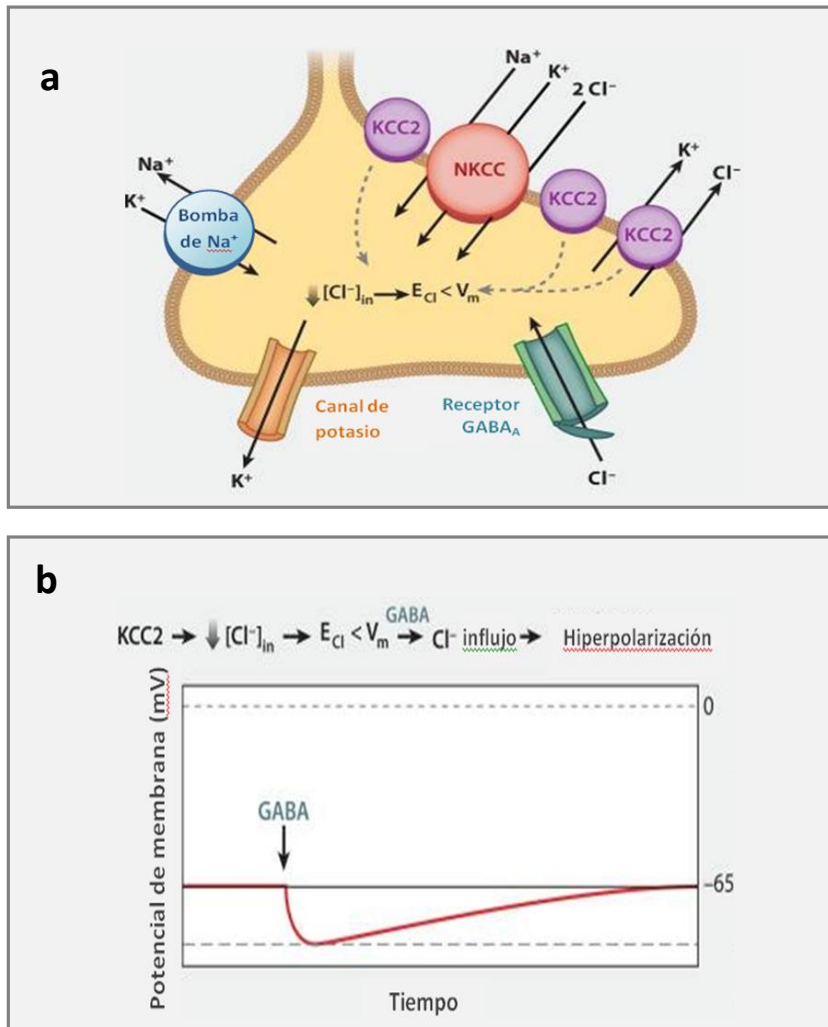
### **Inhibición por hiperpolarización fásica**

El efecto de inhibición que produce el GABA, al unirse a su receptor GABA<sub>A</sub>, en las neuronas del SNC maduro está determinado por la expresión y actividad del cotransportador K<sup>+</sup>- 2Cl<sup>-</sup> (KCC2), que se encarga de la extrusión de Cl<sup>-</sup> desde el interior de la célula al medio extracelular, manteniendo así la concentración intracelular de Cl<sup>-</sup> baja (Fig. 3), lo que da como resultado un potencial de equilibrio del Cl<sup>-</sup> (E<sub>Cl</sub>) de aproximadamente -70 mV (Lee et al., 2005; Coull et al., 2003), el cual resulta ser más negativo que el potencial de membrana en reposo (E<sub>m</sub> ~ -65 mV).

De tal modo, que cuando el GABA activa a los receptores posinápticos GABA<sub>A</sub>, el canal iónico se abre y el Cl<sup>-</sup> entra a la célula por el gradiente electroquímico; este incremento de aniones en el interior de la célula genera un cambio en el potencial de membrana de aproximadamente 30 ms, volviéndolo más negativo y acercándolo al potencial de equilibrio del Cl<sup>-</sup>, esta forma de inhibición generada por el GABA se conoce como hiperpolarización fásica (Fig. 3). Esta hiperpolarización incrementa la diferencia entre el potencial de membrana y el umbral de activación del potencial de acción, lo cual disminuye la excitabilidad de la neurona transitoriamente (Fishell, G., y Rudy, B., 2011).

### **Inhibición por “corto circuito”**

A diferencia de la hiperpolarización fásica, el mecanismo de inhibición por corto circuito se presenta cuando el E<sub>m</sub> es cercano al E<sub>Cl</sub>, por lo que al activarse los RGABA se genera una entrada de Cl<sup>-</sup> que no es capaz de modificar el potencial de membrana, pero ese aumento en la conductancia aniónica o disminución de la resistencia de la neurona, reduce el impacto de las corrientes excitadoras, disminuyendo la amplitud de potenciales postsinápticos, lo que se traduce en entradas excitadoras menos efectivas y por lo tanto, un decremento en la excitabilidad neuronal (Fishell y Rudy, 2011).



**Figura 3. Expresión del cotransportador KCC2 en una neurona madura.** a) El KCC2 extrae Cl<sup>-</sup> dando como resultado un (E<sub>Cl</sub>) más negativo que el E<sub>m</sub>. b) Al activarse los RGABA<sub>A</sub> el Cl<sup>-</sup> fluye al interior, generando la hiperpolarización de la membrana (Imagen modificada de Fishell y Rudy, 2011).

### Tipos de receptores a GABA

La acción del GABA como transmisor, inicia cuando se une a su receptor en la membrana postsináptica. Los receptores a GABA son glicoproteínas que se encuentran embebidas en la membrana celular, su clasificación obedece a su conformación, tipo de actividad y sus propiedades farmacológicas.

De tal manera que existen dos grandes grupos; por una parte, los receptores GABA<sub>A</sub> inotrópicos generan una respuesta rápida o tónica, mientras que los receptores GABA<sub>B</sub> o metabotrópicos, se acoplan a proteínas G, por lo que modulan la excitabilidad celular a través de segundos mensajeros. Son considerados de respuesta lenta, y son resistentes a los fármacos que modulan a los receptores GABA<sub>A</sub>.

### **Subtipos de receptores GABA<sub>A</sub>**

Los receptores GABA<sub>A</sub> se ubican en las neuronas cerca del sitio donde se generarán los potenciales de acción, por lo que al activarse reducen la probabilidad de activación de potenciales de acción, de tal manera que estos receptores conforman un sistema inhibitor muy eficaz (Seutin y Johnson, 1999).

Los receptores GABA<sub>A</sub> pertenecen a la familia de los receptores de canales iónicos activados por ligando, requieren de la unión de dos moléculas de GABA para la apertura de los canales de Cl<sup>-</sup> (Macdonald y Olsen, 1994; Farrant y Nusser, 2005). Adicionalmente, presentan sitios de unión para fármacos que modulan alostéricamente su función como las benzodiazepinas, barbitúricos, picrotoxina, anestésicos esteroideos y etanol (Twyman y Macdonald, 1991; Macdonald y Olsen, 1994; Farrant y Nusser, 2005).

Estos receptores son proteínas hetero-pentaméricas, conformadas por la combinación de subunidades pertenecientes a siete familias diferentes:  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  y  $\rho$ . El ensamble de cinco subunidades forma un canal iónico permeable a Cl<sup>-</sup> y ion bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), la composición de subunidades es variable, pero en general contienen al menos dos subunidades  $\alpha$ , dos  $\beta$  y una  $\gamma$ , que puede intercambiarse por una de las restantes; lo que genera la expresión de 20 a 30 subtipos de receptores GABA<sub>A</sub> funcionales, con propiedades farmacológicas y electrofisiológicas diferentes.

En la médula espinal se encuentran distribuidos de la siguiente manera:

**Lámina I:**  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  y  $\gamma_2$  (Bohlalter et al., 1996).

**Lámina II:**  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma_2$  y  $\alpha_{5/6}$  (Bohlalter et al., 1996; Bravo-Hernández et al., 2016).

**Lámina III:**  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma_2$  y  $\alpha_{5/6}$ . Con una expresión mayor de la subunidad  $\alpha_5$  en la capa interna (Bohalter et al., 1996; Bravo-Hernández et al., 2016) y de la subunidad  $\alpha_3$  en la capa externa (Bolhalter et al., 1996).

**Láminas IV y V:**  $\alpha_3$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  y  $\gamma_2$  en células pequeñas,  $\alpha_5$  en células donde no está la subunidad  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , con expresión difusa (Bolhalter et al., 1996).

A su vez, por su función en el SNC los receptores GABA<sub>A</sub> se pueden clasificar en dos grupos, dependiendo de su ubicación en la superficie neuronal, los sinápticos conformados principalmente por las subunidades  $\alpha_{1-3}$ , se activan ante concentraciones altas del agonista (EC50 = 5  $\mu$ M), con conductancias >15 pS, producen la inhibición rápida, y los peri o extrasinápticos  $\alpha_{4-6}$  generan una inhibición tónica, estando activado por el GABA del medio extracelular, por el que tienen una afinidad alta, se activan a bajas concentraciones del agonista (EC50 = 0.5  $\mu$ M), presentan una conductancia <15 pS (Guyon et al., 1999). Ambos receptores son bloqueados por picrotoxina, bicuculina y gabazina.

### **Receptores $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub>**

Los receptores  $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub> ( $\alpha_6\beta_{2/3}\delta$ ) se localizan en el espacio extrasináptico, tienen una alta afinidad al GABA, por lo que se activan a bajas concentraciones, no se desensibilizan ante la presencia prolongada del neurotransmisor y tienen un tiempo de apertura muy prolongado (400 ms). Los receptores que expresan la subunidad  $\delta$  en lugar de la  $\gamma$  son los únicos extrasinápticos que no se han localizado en las membranas posinápticas ni perisinápticas (Farrant y Nusser, 2005). Estos receptores son insensibles a las benzodiazepinas y tienen como antagonista a la furosemida (Nusser et al., 1998; Sieghart et al., 2022).

### **Furosemida**

La furosemida es utilizada comúnmente como diurético, ya que actúa sobre los transportadores en el asa de Henle, donde regula la concentración de Cl<sup>-</sup>, sin embargo, se

ha comprobado que a nivel neuronal tiene efectos en los receptores a GABA (Guyon, et al., 2002). Por lo cual suele ser usado para el estudio de la funcionalidad dichos receptores, a pesar de la desventaja de ser poco soluble en soluciones acuosas e inestables a un pH fisiológico (Seutin y Johnson, 1998).

La furosemida se une al receptor  $GABA_A$  que contienen las subunidades  $\beta_2$  o  $\beta_3$ , bloqueando su actividad, por lo cual tiene un efecto de eliminar la corriente generada por estos receptores y se describe como antagonista competitivo. Presenta una selectividad 100 veces mayor por los receptores  $\alpha_6$  que por los  $\alpha_1$  (Korpi et al., 1995), con una IC en el rango de  $\mu M$  para  $\alpha_6$  y  $\alpha_4$  y con un IC más alto para el resto de las subunidades  $\alpha$ , lo que lo convierte en un fármaco ideal para el estudio del papel electrofisiológico de los receptores  $\alpha_6 GABA_A$  (Guyon et al., 2002).

Su acción depende de la concentración, a 100-300  $\mu M$  la furosemida bloquea específicamente a los receptores  $\alpha_6 GABA_A$  sin afectar a los receptores  $\alpha_1 GABA_A$ , ni al transportador KCC2, ya que para bloquearlos se requiere de concentraciones superiores a 300  $\mu M$  y del orden mM, respectivamente. Esto fue comprobado por nuestro equipo de laboratorio (Andrés et al., 2014), quienes determinaron que, con una concentración de 200  $\mu M$ , la furosemida bloquea la corriente tónica gabaérgica e incrementa la excitabilidad en las motoneuronas.

# **Antecedentes de los mecanismos funcionales en el circuito de procesamiento de la nocicepción**

## **La electrofisiología en el estudio biofísico y funcional de las neuronas**

Eccles y colaboradores, empleando electrodos intracelulares, registraron la acción de las neuronas inhibitoras sobre las motoneuronas en la médula espinal (Brock et al., 1952). En este estudio, como en muchos otros, la electrofisiología ha permitido comprobar la presencia y función de las neuronas inhibitoras en todo el SNC, así como caracterizar las funciones de los diferentes neurotransmisores y sus receptores. Por lo tanto, la electrofisiología es una técnica importante en la neurofisiología.

Toda célula excitable funciona como un circuito RC formado por una fuente de voltaje, una resistencia y un capacitor. En el caso de la célula, la resistencia depende de los canales iónicos, mientras que la bicapa lipídica funciona como capacitor al presentar una distribución transmembranal de más cargas positivas en el exterior con respecto al interior. Todos estos elementos son responsables de generar una diferencia de potencial más negativa en el interior celular con respecto al exterior, de -60 a -90 mV, lo que constituye la fuente de voltaje producida por el gradiente electroquímico, que determina el flujo de los iones a través de la membrana. Esta particularidad confiere a las neuronas diferentes propiedades biofísicas que les permite transmitir la información por medio de señales eléctricas (potencial de acción (PA)).

Dichas propiedades se dividen en activas y electrotónicas o pasivas, las cuales determinan la excitabilidad neuronal, por lo cual es importante analizar estos elementos dentro de la caracterización funcional de las neuronas.

## **Participación de las neuronas de la asta dorsal en la alodinia**

La lámina II del asta dorsal de la médula espinal es un componente importante en el circuito de procesamiento del dolor, esto se debe a que ésta área recibe las entradas de las fibras

aferentes primarias nociceptivas y es ahí donde las interneuronas propias de la médula espinal modulan la información que se transmitirá a las vías ascendentes.

En el SNC, las unidades funcionales son las neuronas excitadoras e inhibitoras y se sabe que, en algunas áreas como el cuerpo estriado o la amígdala central o medial, presentan principalmente células inhibitoras; lo cual muestra la importancia de la inhibición en todo el SNC (Fishell y Rudy, 2011). A nivel de la médula espinal la participación de la inhibición en los circuitos neuronales tiene gran importancia en la modulación del dolor (Farrant y Nusser, 2005; Todd, 2010).

Es por ello que en los últimos años los estudios que pretenden explicar el proceso celular del dolor se han centrado en describir las características anatómicas y funcionales de las neuronas del asta dorsal de la médula espinal. En particular se han estudiado sus propiedades biofísicas intrínsecas, mediante la implementación de la electrofisiología empleando la técnica de *patch-clamp*.

### **Sinapsis de las fibras $A_{\beta}$ con las neuronas proyección; origen de la alodinia**

En condiciones normales, el dolor aparece por la activación periférica de las fibras aferentes primarias  $A_{\delta}$  y C, las cuales son las únicas que activan monosinápticamente a las neuronas de proyección. Debido a que la activación de las aferentes  $A_{\beta}$  no producen dolor en sujetos sanos, anteriormente se pensaba que no estaban conectadas sinápticamente con las neuronas de proyección. Sin embargo, en condiciones de alodinia, las fibras aferentes  $A_{\beta}$  son capaces de activar a las neuronas de proyección y generar dolor. Torsney y MacDermott, (2006), demostraron que en un animal sano las neuronas de proyección son excitadas polisinápticamente por estimulación de las fibras aferentes  $A_{\beta}$  y monosinápticamente por la estimulación de las fibras aferentes C y  $A_{\delta}$ . En el primer caso la amplitud de la despolarización está muy por debajo del umbral de activación del potencial de acción, mientras que las fibras nociceptoras si los activan. Sin embargo, al bloquear la inhibición GABAérgica y glicinérgica con bicuculina y estricnina, respectivamente, estos autores observaron que las corrientes excitadoras evocadas en las neuronas de proyección

por las fibras  $A_{\beta}$  se facilitaron, alcanzando amplitudes similares a las generadas por las fibras de dolor (Takazawa y MacDermott, 2010).

Esto demostró, primero, que existe una conexión polisináptica excitadora entre las fibras  $A_{\beta}$  y las neuronas de proyección; segundo, que este circuito está tónicamente inhibido por los receptores  $GABA_A$ , de tal modo que cuando se bloquea esta inhibición las fibras  $A_{\beta}$  pueden producir potenciales de acción en las neuronas de proyección, es decir inducir nocicepción, lo que explicaría la aparición de la alodinia mecánica.

### **Inhibición GABAérgica en el dolor**

En línea con lo anterior, se ha demostrado que la administración intratecal de bicuculina, antagonista de los receptores  $GABA_A$ , en las ratas sanas produce alodinia mecánica, similar a la inducida por lesión periférica de un nervio; efecto que podría estar asociado a una disminución de las corrientes postsinápticas inhibitorias en las neuronas del asta dorsal (Sivilotti y Woolf, 1994; Woolf y Doubell, 1994).

En el modelo animal de dolor neuropático, inducido por la ligadura del nervio espinal que presenta alodinia mecánica, se demostró que la microglía se activa por el ATP liberado por las fibras C (Coull et al., 2005), produciéndose la síntesis y liberación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), que al unirse a su receptor TrkB en las neuronas e interneuronas de las láminas I-III produce una disminución de la expresión del cotransportador KCC2, esto provoca una despolarización del potencial de equilibrio del  $Cl^-$ , a tal punto ( $-49.0 \pm 2.3$  mV) que al activarse los receptores  $GABA_A$  se generan potenciales de acción (Coull et al., 2003). Este último resultado y el hecho de que el bloqueo de los receptores  $GABA_A$  produzca alodinia mecánica llevó a varios autores a proponer la “teoría moderna” del dolor crónico, fundamentada en la desinhibición o pérdida de la inhibición a nivel del asta dorsal de la médula espinal (Coull et al., 2003, 2005; Zeilhofer et al., 2012).

Estas evidencias llevaron a varios grupos de investigación a proponer que, para eliminar el dolor neuropático hay que rescatar la inhibición GABAérgica perdida. Para este



fin han desarrollado fármacos derivados de las benzodiazepinas que en animales neuropáticos produjeron analgesia, pero cuando los trasladaron a pruebas clínicas no tuvieron la acción analgésica esperada.

Una explicación a este resultado desfavorable, es que la disminución en la expresión del transportador KCC2 produjo un cambio en la acción del GABA vía la activación de los receptores GABA<sub>A</sub>, sinápticos y extrasinápticos, que pasaron de producir inhibición a despolarización, como lo demostró Coull et al. (2003-2005). Los receptores extrasinápticos producirían una despolarización tónica, lo que explicaría porque nuestro grupo de trabajo ha demostrado en varios modelos de dolor nociceptivo y neuropático que el bloqueo de los receptores  $\alpha_{5/6}$ GABA<sub>A</sub> extrasinápticos induce analgesia (Bravo-Hernández et al., 2016; Jolivald et al., 2008; Hernández-Reyes et al., 2017; Alvarado-Cervantes, 2022).

### **Inhibición GABAérgica en la médula espinal**

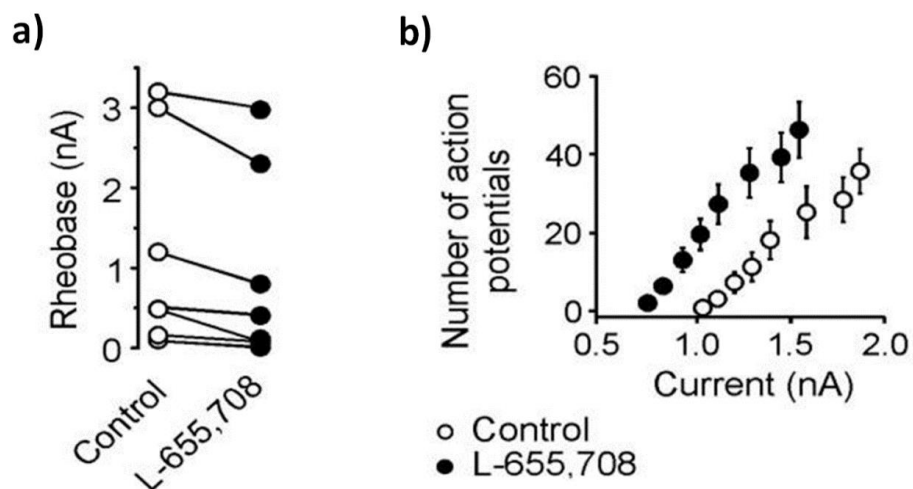
La liberación de las vesículas presinápticas de GABA eleva su concentración en el espacio sináptico a una cifra de milimolar en un lapso breve; de esta manera los receptores GABA<sub>A</sub> postsinápticos se activan, permitiendo el flujo de cloruro y bicarbonato lo que incrementa la permeabilidad y conductancia de la membrana, dando como resultado una respuesta de hiperpolarización transitoria o potencial postsináptico inhibitorio (IPSP, por sus siglas en inglés). Esta inhibición se conoce como fásica debido a la apertura rápida (<30 ms) y sincrónica los canales presentes en la sinapsis. Por otra parte, el GABA que difunde fuera de la sinapsis, activa receptores GABA<sub>A</sub> del tipo extrasinápticos, que producen una corriente tónica inhibitoria en el SNC maduro (Farrant y Nusser, 2005).

Diversos estudios han comprobado que la corriente tónica GABAérgica regula la excitabilidad neuronal, cambiando las propiedades pasivas y activas de la membrana, como la disminución de la resistencia de entrada y la constante de tiempo membranal (Mitchell y Silver, 2003 ; Wlodarczyk et al., 2013 ).

Por ejemplo, Cantos-Bustos et al., en 2017, mediante registros electrofisiológicos en las motoneuronas de la médula espinal de la tortuga, demostraron que los  $R\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>

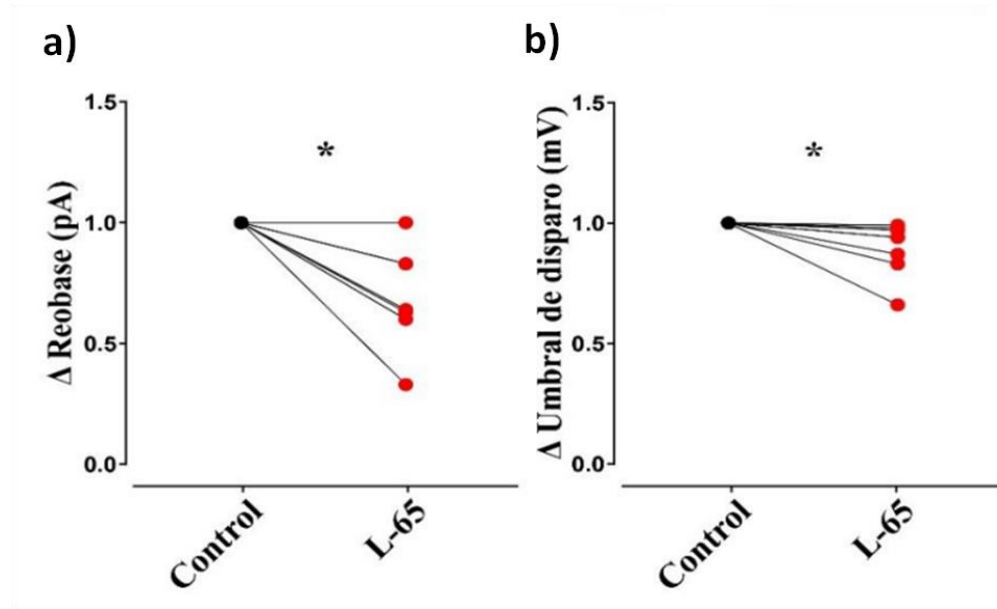
modulan las propiedades pasivas y activas de estas neuronas. Ya que, con el bloqueo de los  $R\alpha_5GABA_A$ , en presencia del agonista inverso L-655,708, hubo una disminución de la reobase (Fig. 4a) y un incremento del número de potenciales de acción (Fig. 4b). Esto es posible por el bloqueo de una corriente inhibitoria tónica presente en las motoneuronas, la cual genera una disminución en la resistencia de membrana. Un resultado semejante se demostró en las motoneuronas que expresan los receptores  $\alpha_6GABA_A$  extrasinápticos (Andrés et al., 2014). Mientras que, el efecto contrario se ha observado en animales con dolor por la activación con benzodiazepinas de los receptores  $GABA_A$  en el asta dorsal, que provocó una hiperexcitabilidad neuronal, un elemento característico del dolor neuropático (Sivilotti y Woolf, 1994).

Adicional a esto, Aguilar-Palomares (2022), al igual que en las motoneuronas de la tortuga, en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal de rata adulta, los  $R\alpha_5GABA_A$  participan en la modulación de la excitabilidad de estas neuronas, puesto que el bloqueo con L-65 incrementó su excitabilidad y disminuyó la reobase (Fig. 5).



**Figura 4. Los receptores  $GABA_A$  sensibles a L-655,708 modulan la excitabilidad de las motoneuronas.** a) Comparación de los valores medios de la reobase de siete motoneuronas en condiciones control y en presencia de L-65. b) La gráfica muestra el número de

potenciales de acción generados por la aplicación de pulsos de corriente en ambas condiciones (Modificado de Cantos-Bustos et al., en 2017).



**Figura 5.** El bloqueo de los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> disminuye la reobase e incrementa la excitabilidad de las neuronas de las láminas LI-LII del asta dorsal de la médula espinal lumbar. a) El gráfico representa el cambio ( $\Delta$ ) en la reobase normalizado con respecto al control en presencia de L-65. b) Gráfico que representa el cambio ( $\Delta$ ) en el umbral de disparo normalizado con respecto al control en presencia de L-65 ( $p < 0.05$ , prueba de t) (Modificado de Aguilar-Palomares, 2022).

## Planteamiento del problema

Se ha comprobado que el bloqueo de los receptores extrasinápticos  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> con L-655708, así como de los  $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub> con furosemida, de manera independiente, induce alodinia mecánica en las ratas sanas (Hernández-Reyes, et al., 2019; Rodríguez-Palma et al., 2022; Alvarado-Cervantes, 2023), lo que sugiere que estos receptores tienen una función antinociceptiva en los animales sanos.

En el caso de los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>, se sabe que la corriente tónica que generan al estar activados por el GABA ambiental, modula las propiedades pasivas y activas de las interneuronas, lo cual podría explicar su importante participación en el circuito que procesa la información nociceptiva en la médula espinal.

Mientras que, en el caso de los receptores  $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub>, se ha comprobado que se expresan en las láminas I-V del asta dorsal de la médula espinal y que su bloqueo con furosemida en animales sanos produce alodinia mecánica (Rodríguez et al., 2022; Alvarado-Cervantes, 2023), no obstante, se desconoce en qué tipo de interneuronas se expresa, así como su papel en la modulación de sus propiedades pasivas y activas.

## Hipótesis

Los receptores  $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub> regulan las propiedades pasivas y activas de las neuronas de las láminas I-III del asta dorsal de la médula espinal.

## Objetivo General

Caracterizar en animales sanos las neuronas de las láminas I-III por su patrón de disparo de potenciales de acción y determinar el papel de los receptores  $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub> en la regulación de su resistencia, rebase y excitabilidad.

## Objetivos particulares

- Caracterizar las neuronas de las láminas I-III, empleando la técnica de *patch-clamp* en la modalidad de fijación de corriente.
- Determinar si el bloqueo de los receptores  $\alpha_6\text{GABA}_A$  mediante la aplicación de su antagonista furosemida modifica las propiedades pasivas y activas de las neuronas de las láminas I-III.

## Materiales y métodos

### Preparación

Este estudio fue aprobado por el Comité Interno de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Cinvestav, Ciudad de México, México; Protocolo 0198-16). Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en ratas macho de la cepa Wistar de 180-200 g, que fueron mantenidas en un cuarto con ciclos de luz oscuridad (12h/12h), con agua y alimento *ad libitum*.

**Solución de corte:** la solución que émula al líquido cefalorraquídeo (LCR) fue preparada el mismo día para su uso, contiene en mM: sacarosa 200, KCl 2.5, NaCl 126, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 26, Tiourea 2, Ascorbato de sodio 4, CaCl<sub>2</sub> 0.5, MgCl<sub>2</sub> 5, N-Acetilcisteína 6, ácido quinurénico 1, Piruvato de sodio 2, D-Glucosa 20 y Mio-inositol 3; con pH a 7.4 y osmolaridad de 305 mOsmol/Kg. Esta solución se enfrió a una temperatura cercana al punto de congelación y se burbujeó con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>).

**Solución de registro:** fue preparada el mismo día para su uso, contiene en mM: NaCl 126, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 25, CaCl<sub>2</sub> 2.5, D-Glucosa 10, MgCl<sub>2</sub> 1.2 y Piruvato de sodio 2. Con pH de 7.4 y osmolaridad de 305 mOsmol/Kg.

**Solución de interna de los electrodos:** composición en mM: gluconato de potasio 130, KCl 5, HEPES 10, EGTA 1.1, CaCl<sub>2</sub> 0.1, fosfocreatina 7.6, Mg-ATP 4 y Mg-GTP 0.4. Con pH de 7.35 y osmolaridad de 295 mOsmol/Kg. Se almacenó en alícuotas de 1 ml a -20°C hasta su uso.

**Agar:** para la preparación del agar al 3%, se disolvió 0.75 g de agar en 30 ml de agua previamente calentada, al punto de ebullición. La solución se colocó en recipientes de 15 ml con forma de cubo. Una vez solidificada se perforó con un cilindro de 1.5 mm de diámetro para insertar la médula espinal.

### Obtención de la médula espinal

Las ratas fueron decapitadas a la altura de las vértebras cervicales, inmediatamente se realizó un segundo corte a la altura de las crestas iliacas, para exponer el agujero vertebral,

por donde se introdujo la aguja 18G con 10 ml de solución de corte, se extrajo la médula por presión hidráulica, sujetándola por el extremo cervical y se sumergió en la solución de corte previamente congelada.

Se aisló el engrosamiento lumbar (0.5-2 cm de largo), para poder realizar los cortes transversales de 300  $\mu\text{m}$  se fijó verticalmente en un bloque de agar, se pegó en el porta muestras (Fig. 7). Las rebanadas fueron colocadas en una solución de corte a temperatura ambiente durante 20 min y posteriormente en solución de registro en donde se estabilizaron durante al menos 1 hora con oxigenación constante a temperatura ambiente.

### **Registro electrofisiológico**

Las rebanadas se colocaron en una cámara de registro del microscopio Bx51 (Olympus) y se perfundieron con solución de registro a una velocidad de 2-4 ml/min. Para localizar el asta dorsal, las láminas I-II (Fig. 6) y los somas de las neuronas se utilizó el objetivo de inmersión 40x (Fig. 7).

Los microelectrodos (3-5  $\text{M}\Omega$ ) se obtuvieron a partir de capilares de borosilicato (1.17 mm de diámetro interno, 1.5 de diámetro externo y 100 mm de largo), se empleó un estirador (Sutter Instrument), se llenaron de solución interna filtrada con una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ .

Los protocolos de estimulación y registro se realizaron empleando el programa pClamp, con el amplificador Multiclamp-700B (Molecular Devices), los registros se digitalizaron con una tarjeta Digidata1440 (Molecular Devices) a 10 kHz, se empleó un filtro pasa bajas de 2 kHz. La resistencia en serie (2.5-4.5 $\text{M}\Omega$ ) se compensó al menos en un 80% (Chéry et al., 2000). La resistencia de acceso inicial menor a 20  $\text{M}\Omega$  y fue monitoreada en todo momento sin cambios superiores del 20%. Los datos se almacenaron en el disco duro de la computadora para su posterior análisis.

### **Protocolo de registro**

Cuando se pretende estudiar los cambios inducidos por un fármaco que no afecta el tamaño

de la célula, los protocolos de fijación de corriente generan estimaciones más precisas de parámetros como la capacitancia, en comparación con la fijación de voltaje (Golowaschet al., 2009). Además de permitir un análisis más amplio de la excitabilidad mediante el estudio de los potenciales de acción y el patrón de disparo.

**Potencial de membrana en reposo:** es el potencial o voltaje en estado de reposo (PMR) de la célula, sin aplicar corriente, depende de las concentraciones iónicas intra y extracelular. El PMR fue monitoreado en modo sin aplicación de corriente.

**La resistencia de entrada:** está determinada por los canales iónicos activos de la membrana, y por el tamaño de la célula. Por lo cual se considera una característica intrínseca. A pesar de esto, la resistencia no es estática, ya que varía en función de la actividad sináptica. Se determina aplicando pulsos de corriente hiperpolarizante de 20 pA durante 500 ms, que produzcan respuestas de voltaje lineales. La resistencia de entrada se calcula como la pendiente de la recta ajustada a los puntos que resulta de graficar la corriente (I) contra el voltaje (V).

**La constante de tiempo (tau):** es el tiempo en el que se alcanza el 63% del voltaje final después de la aplicación de un pulso de corriente rectangular. Se aplican pulsos hiperpolarizantes y despolarizantes de baja amplitud (sin que se alcance el potencial umbral de disparo de la célula), los cuales generan una respuesta de voltaje en forma exponencial. Esto permite evaluar el tiempo que tarda en cargar y descargarse la membrana.

**Patrón de disparo de potenciales de acción:** primero se administró una corriente hiperpolarizante de 50 pA con una duración de 1 s, posteriormente se inyectó una corriente despolarizante de 100 pA, para generar potenciales de acción e identificar el patrón de disparo (Fig. 6). El patrón de disparo se definió de acuerdo con la clasificación de Li et al. (2021).

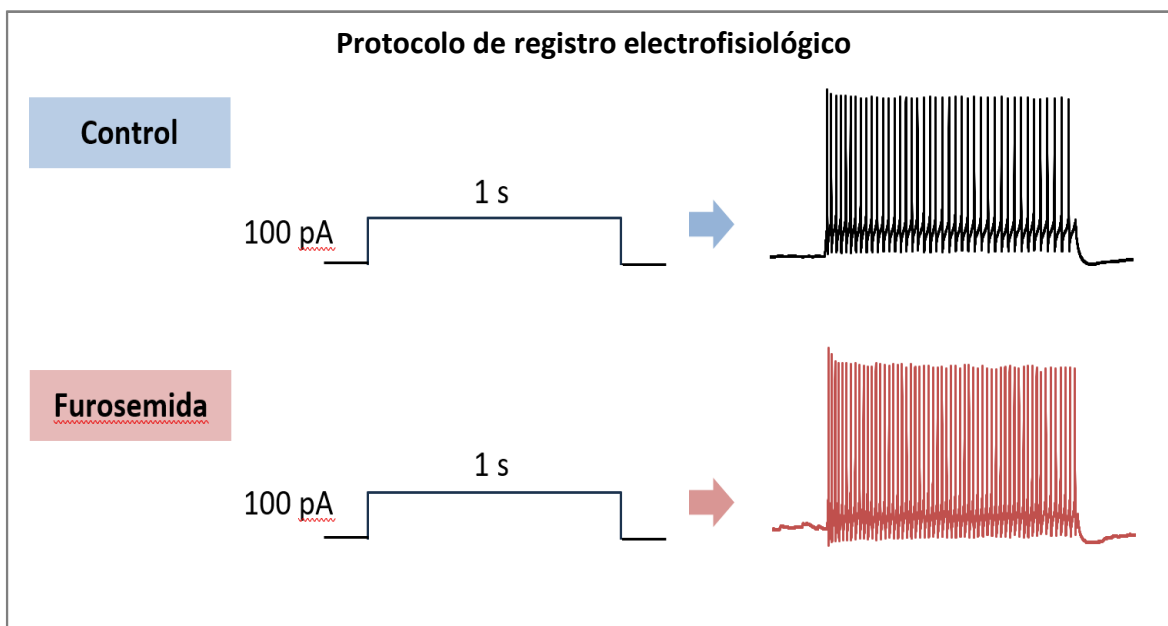
**La reobase:** se aplicó corriente despolarizante de forma creciente de 0 a 300 pA en incrementos de 10 pA con duración de 10 ms. La reobase se determinó como la corriente



mínima necesaria para activar un potencial de acción (PA), a partir del potencial de membrana en reposo ( $V_m$ ).

**Determinación de la excitabilidad de la neurona:** se aplicaron pulsos de corriente intracelular despolarizante umbral y supraumbral, en intervalos de 10 pA. Se graficó la corriente aplicada contra el número de PA producidos. Si al aplicar un fármaco la curva de excitabilidad se recorre hacia la izquierda significa que se incrementó la excitabilidad, si se corre hacia la derecha, disminuyó.

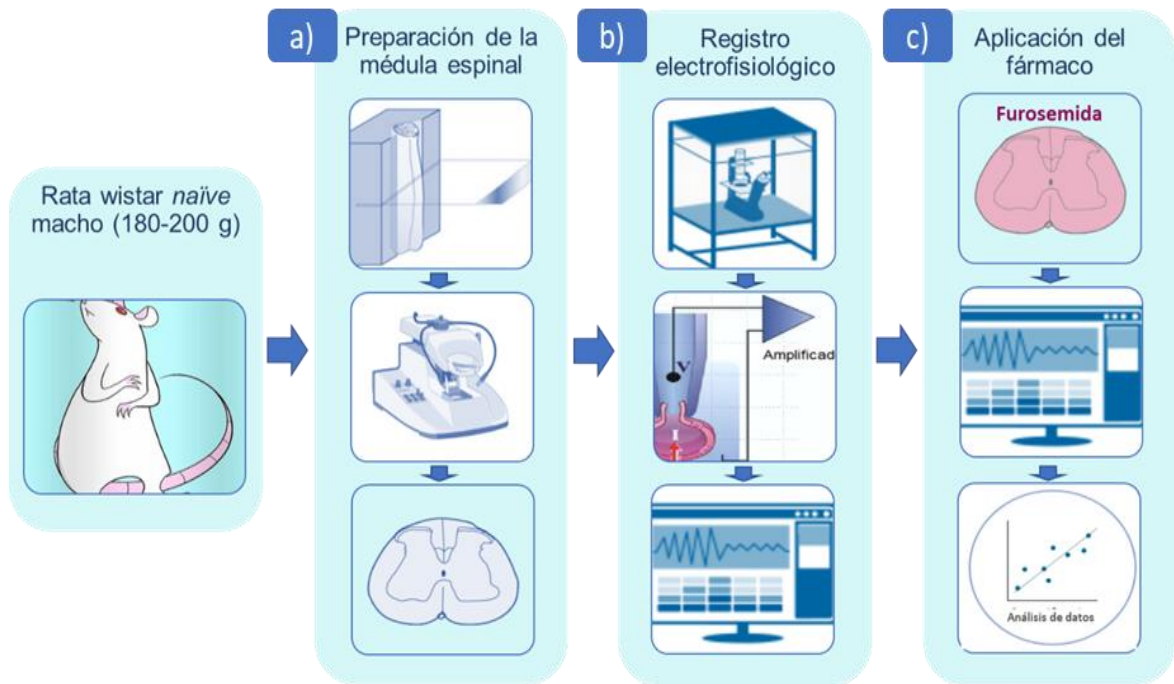
Todas las variables se determinaron registrando las neuronas en solución control y posteriormente en presencia de furosemida (200  $\mu$ M), concentración que bloquea a los receptores  $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub> (Guyon, 2002; Andrés et al., 2014).



**Figura 6.** Esquema del protocolo de registro en *patch-clamp* en configuración célula completa (*whole-cell*). A la derecha se muestra el protocolo de registro, el cual consiste en la inyección de un pulso cuadrado de 100 pA durante 1 s. Los trazos de la izquierda representan el patrón de disparo de potenciales de acción de la neurona en condiciones control y en presencia de furosemida.

## Aplicación del fármaco

La furosemida se obtuvo de SIGMA (Lot# 090M1301V) y se preparó a 10 mM con DMSO al 40 % y 60% de agua destilada. A la hora del registro la solución se diluyó en la solución de registro para llegar a la concentración de 200  $\mu$ M y se perfundió la rebanada con oxigenación constante. Se aplicaron los mismos protocolos para poder evaluar el efecto del fármaco: aumento o disminución de la probabilidad de disparo, cambios en el patrón de disparo, en la amplitud y frecuencia de potenciales de acción (Fig. 6).



**Figura 7. Representación esquemática de los métodos empleados.** El esquema muestra de manera resumida los materiales y métodos empleados en este trabajo.

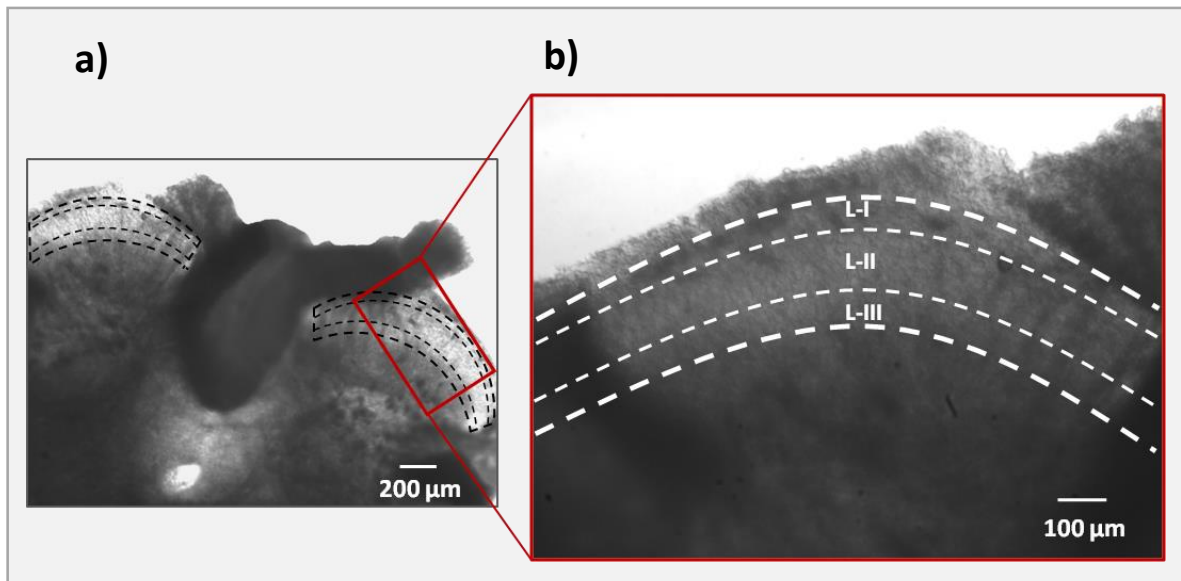
## Resultados

### Identificación de las neuronas en las láminas I-III

Una vez obtenidas las rebanadas de la médula espinal, se identificó el asta dorsal y se localizaron las láminas I-III (Fig. 8) de acuerdo con los criterios de Li et al. (2021), posteriormente se seleccionaron las neuronas a registrar (Fig. 9).

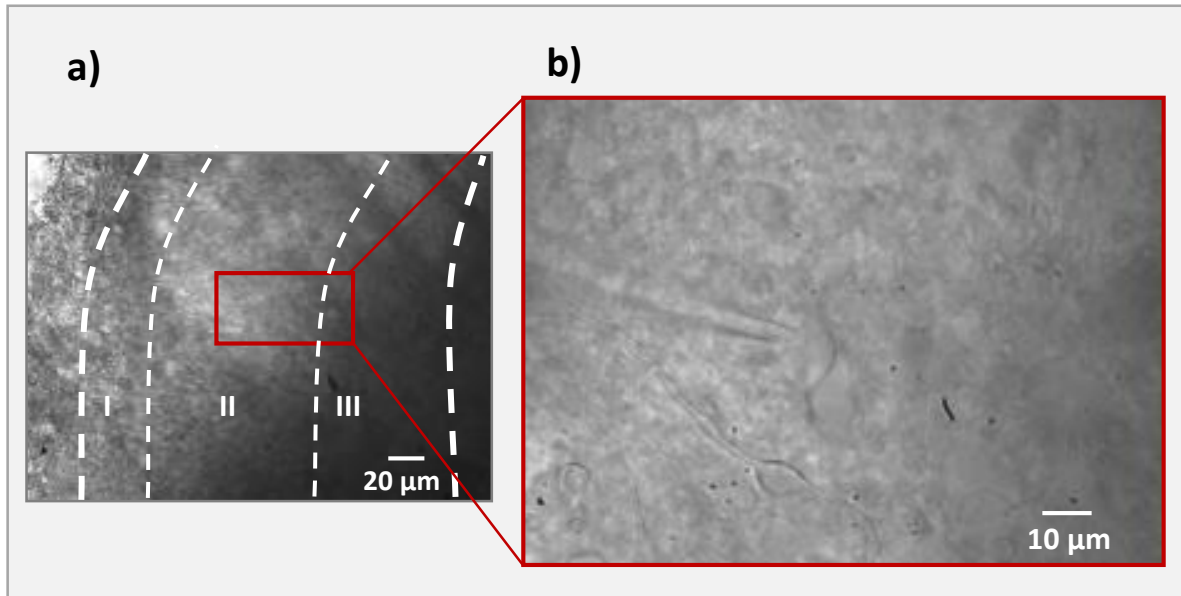
Para identificar la lámina I, fue necesario aumentar el contraste mediante la iluminación oblicua. Esta lámina resulta difícil de visualizar, la iluminación oblicua, permite tener un efecto de tercera dimensión, parecida al generado por la iluminación de campo oscuro, que facilita observar con cierta profundidad (Fig. 9a) (Chéry et al., 2000).

Mientras que la lámina II se identifica con mayor facilidad debido a que se trata de una banda translúcida bien definida, por lo que se puede identificar a bajos aumentos (Fig. 8a).



**Figura 8. Corte transversal del engrosamiento lumbar de la médula espinal.** a) La imagen muestra la parte central y dorsal de la médula espinal, en donde se pueden observar las láminas I-III (4X). b) Amplificación (8X) del área marcada por el recuadro rojo, las líneas punteadas indican los límites de cada una de las láminas I-III del asta dorsal.

Por su parte, las células viables, de acuerdo con Chéry et al. (2000) comparten generalmente las características de presentar una superficie lisa, que permite observar de manera fácil el soma, el cual es ovalado o fusiforme, sin ser completamente circular, con una longitud aproximada de 20-30  $\mu\text{m}$  (Fig. 9b). Estos criterios fueron considerados al seleccionar las células para registrarlas con la técnica de *patch-clamp*.

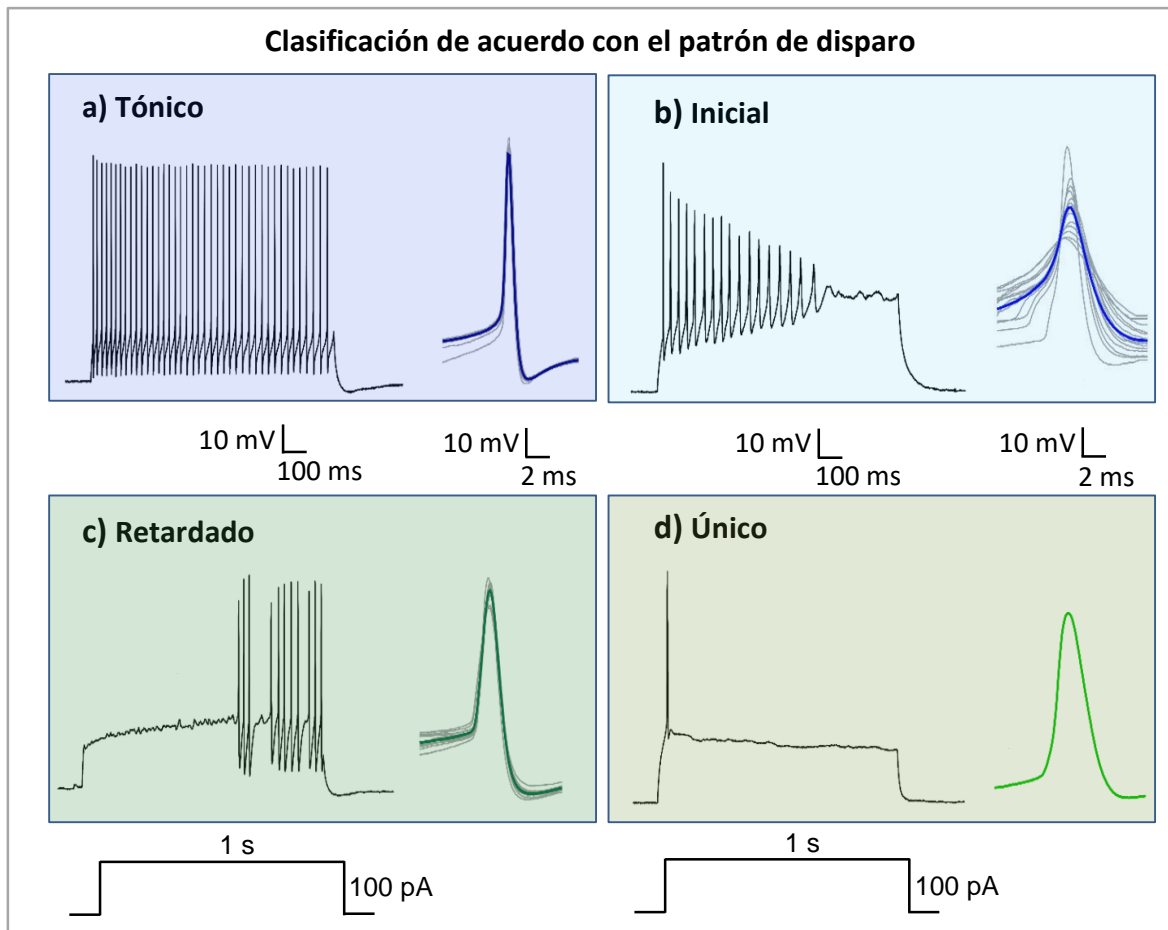


**Figura 9. Identificación de las neuronas de las láminas I-III.** a) Se muestra de izquierda a derecha, zona marginal, lámina I, lámina II externa, lámina II interna y lámina III; separadas por las líneas punteadas (40X). b) Microelectrodo haciendo contacto durante el registro electrofisiológico de una neurona presente en la lámina II interna (80X).

### **Clasificación de las neuronas de las láminas I-III de acuerdo con su patrón de disparo**

Las 57 neuronas registradas mostraron cuatro patrones de disparo diferentes y se calificaron de acuerdo con lo reportado por Punnakkal et al. (2014) y Li et al. (2021): patrón de disparo tónico, inicial, retardado, y único (Fig. 10).

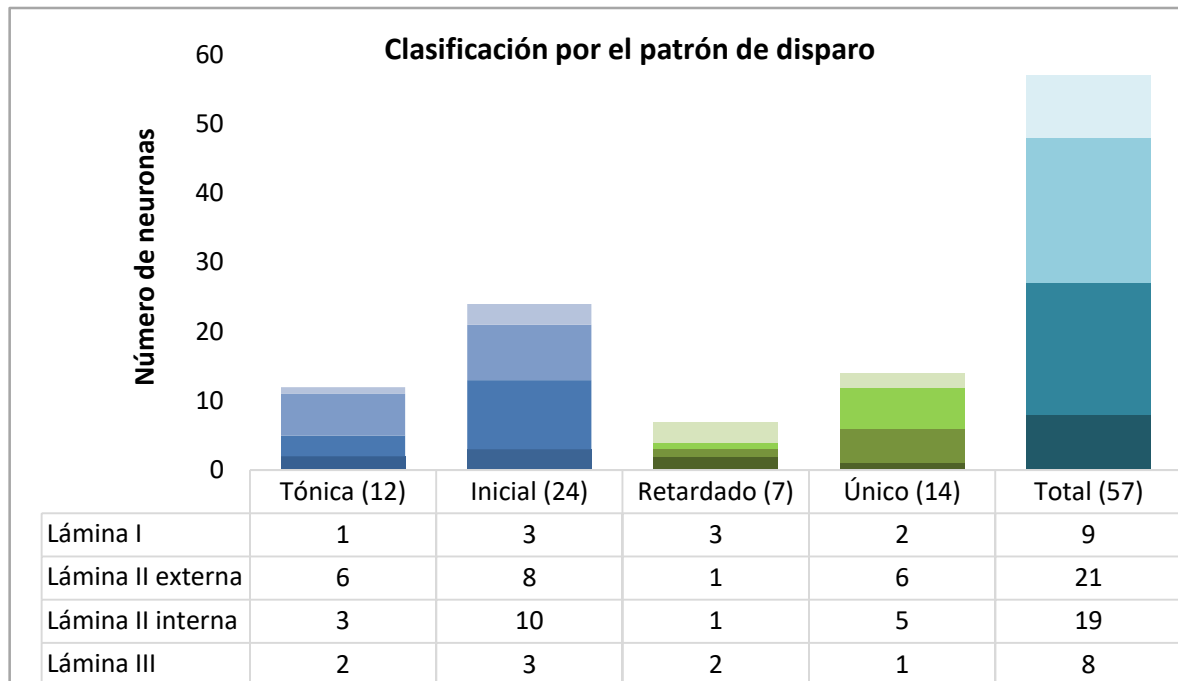
En la figura 11 se muestra la gráfica de la distribución de las neuronas en las láminas I-III en función del patrón de disparo.



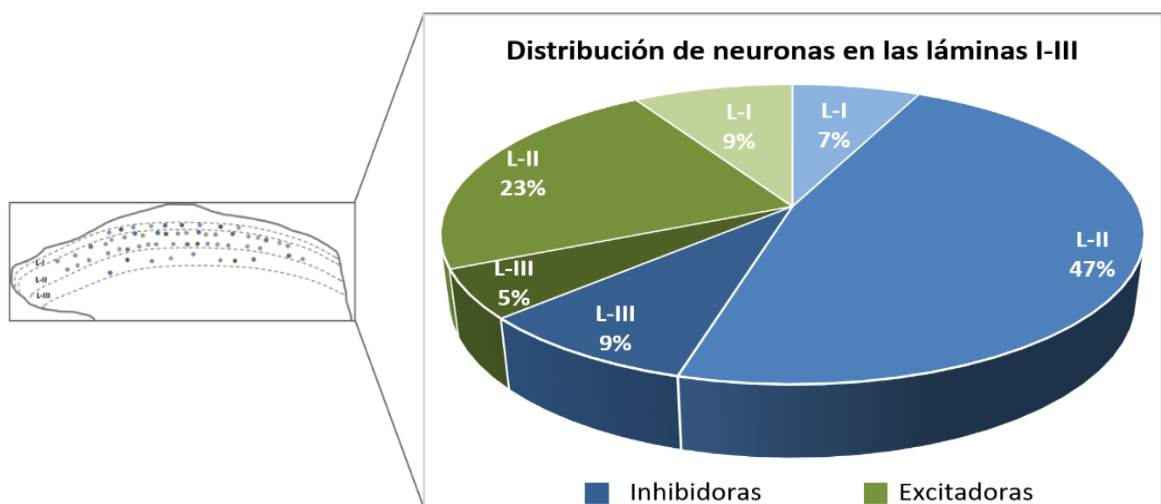
**Figura 10. Patrón de disparo de PAs de las interneuronas de las láminas I-III del hasta dorsal de la médula espinal.** Las neuronas registradas con la técnica de *patch-clamp* se clasificaron de acuerdo con Li et al. (2021) y Zhu et al. (2021): a) Tónico, b) Inicial, b) Retardado y d) Único. Los trazos de la izquierda muestra el patrón de disparo obtenido a partir de un pulso cuadrado de 100 pA con duración de 1 s (Fig. 6); mientras que los trazos de la derecha representan los potenciales de acción aislados y el promedio de estos (color azul y verde) respectivamente.

Adicionalmente, las neuronas registradas se clasificaron en dos grupos: excitadoras e inhibitoras de acuerdo con lo reportado por Yasaka et al. (2010) y Li et al. (2021), quienes proponen que el 38.9 % de las neuronas son glutamatérgicas (excitadoras) tienen un patrón de disparo de PAs del tipo retardado, mientras que el 43.3% de las GABAérgicas (inhibidoras) son tónicas, y el 8.3% presentan un solo PA.

Del total de 57 neuronas registradas, 36 se consideran inhibitoras (12 tónicas y 24 iniciales) y 21 excitadoras (7 de activación retardada y 14 de disparo único) (Fig. 11). Estos resultados concuerdan con los reportados por Li et al. (2021) en la lámina II del asta dorsal (Fig. 12).



**Figura 11. Gráfica de la distribución de las neuronas por su patrón de disparo y ubicación en las láminas I-III del asta dorsal de la médula espinal.** El patrón de disparo permitió clasificar a las neuronas de acuerdo con lo propuesto por Punnakkal et al. (2014) y Li et al. (2021).



**Figura 12. Gráfica de la distribución de las neuronas inhibitoras y excitadoras en las láminas I-III.** Se muestra la distribución en porcentaje del total de neuronas presentes en cada una de las láminas. El 63% del total de neuronas registradas son consideradas como inhibitoras y fueron localizadas en L-I el 7%, en L-II el 47% y el 9% en L-III; mientras que el 37% se clasificaron como excitadoras y fueron localizadas en L-I el 9%, en L-II el 23% y en L-III el 5% (Li et al., 2021).

## **Efecto de la furosemida en las propiedades pasivas y activas de la membrana**

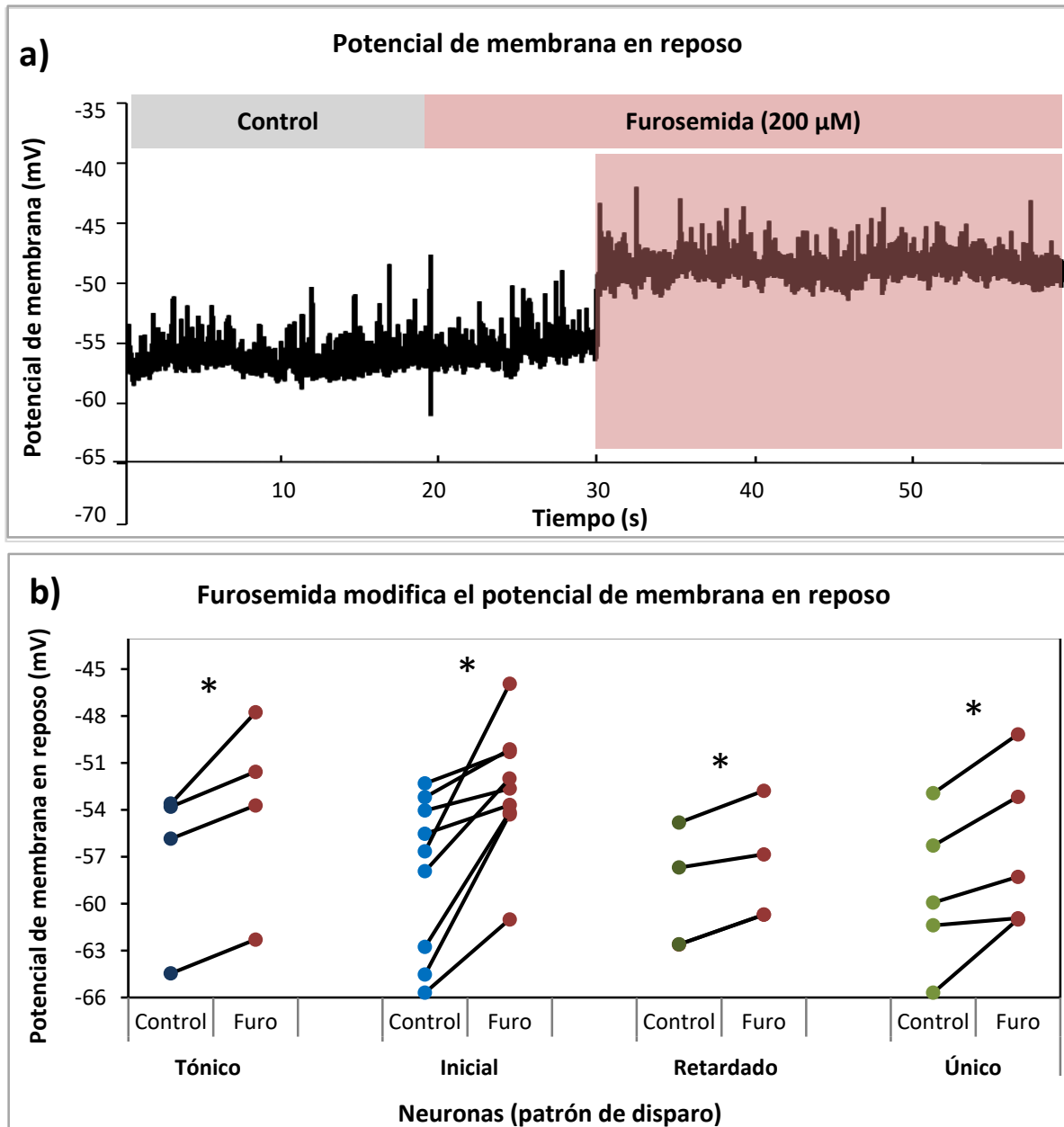
### **Potencial de membrana en reposo (PMR)**

Con la técnica de *patch-clamp* en fijación de corriente, se registraron en solución control un total de 57 células ubicadas en las láminas I-III, posteriormente se aplicó furosemida para poder evaluar el papel de los receptores  $\alpha_6\text{GABA}_A$  en las propiedades pasivas y activas de la neurona. El análisis de datos que se presenta a continuación se obtuvo de los registros en los que fue posible aplicar todos los protocolos en condiciones control y en presencia de furosemida.

Se registraron células con un potencial de membrana en reposo igual o inferior a -50 mV en condiciones control (Figs. 13 y 20), dicho parámetro fue considerado para la inclusión de las neuronas a registrar y para su posterior análisis.

De acuerdo con Li et al. (2021) el PMR no difiere entre neuronas excitadoras e inhibitoras, lo cual concuerda con los resultados obtenidos. Posteriormente se registró el potencial de membrana en presencia de furosemida (Fig. 13a), observando un cambio significativo entre el PMR en condiciones control y en presencia de furosemida (control:  $-58.38 \pm 0.97$  mV vs. furosemida:  $-54.68 \pm 1.03$  mV) (Fig. 13 b). El análisis estadístico se realizó en cada uno de los grupos de neuronas, el mayor incremento del PMR se observó en las neuronas de disparo inicial (control:  $-58.07 \pm 1.68$  mV; furosemida:  $-52.68 \pm 1.35$  mV) (Fig.13b). Esta despolarización, podría deberse a que la furosemida al bloquear los receptores  $\alpha_6\text{GABA}_A$  tónicamente activos por el GABA del medio extracelular se reduce la conductancia y por lo tanto aumenta la resistencia de la membrana, dando como resultado

su despolarización (Figs. 13 y 20), seguido de un aumento de la probabilidad de disparo de PAs de la neurona (Fig. 20) debido a la disminución de la rebase (Fig. 17), lo que se traduce en una mayor excitabilidad.



**Figura 13. Efecto de la furosemida en el potencial de membrana en reposo.** a) El registro muestra el efecto de la furosemida en el PMR (sombreado), en donde se observa la despolarización del PMR en condiciones control (-57 mV) después de la aplicación de furosemida (-51 mV). b) Se muestra el potencial de membrana en reposo en condiciones



control (círculos de colores) y en presencia de furosemida (círculos rojos) de cada una de las neuronas registradas, agrupadas de acuerdo con su patrón de disparo. Se observa una despolarización estadísticamente significativa del total de las 22 neuronas (control:  $-58.38 \pm 0.97$  mV; furosemida:  $-54.68 \pm 1.03$  mV,  $n = 22$ ; prueba de *t pareada*,  $p = 0.0000068$ ). De igual manera, se analizaron las neuronas por grupo de acuerdo con su tipo de disparo: tónico (control:  $-56.93 \pm 2.56$  mV; furosemida:  $-53.83 \pm 3.07$  mV,  $n = 4$ ; prueba de *t pareada*,  $p = 0.042$ ); inicial (control:  $-58.07 \pm 1.68$  mV; furosemida:  $-52.68 \pm 1.35$  mV,  $n = 9$ ; prueba de *t pareada*,  $p = 0.0023$ ); retardado (control:  $-59.43 \pm 1.92$  mV; furosemida:  $-57.75 \pm 1.89$  mV,  $n = 4$ ; prueba de *t pareada*,  $p = 0.0095$ ); único (control:  $-59.25 \pm 2.17$  mV; furosemida:  $-56.51 \pm 2.32$  mV,  $n = 5$ ; prueba de *t pareada*,  $p = 0.022$ ). \*Diferencia estadísticamente significativa.

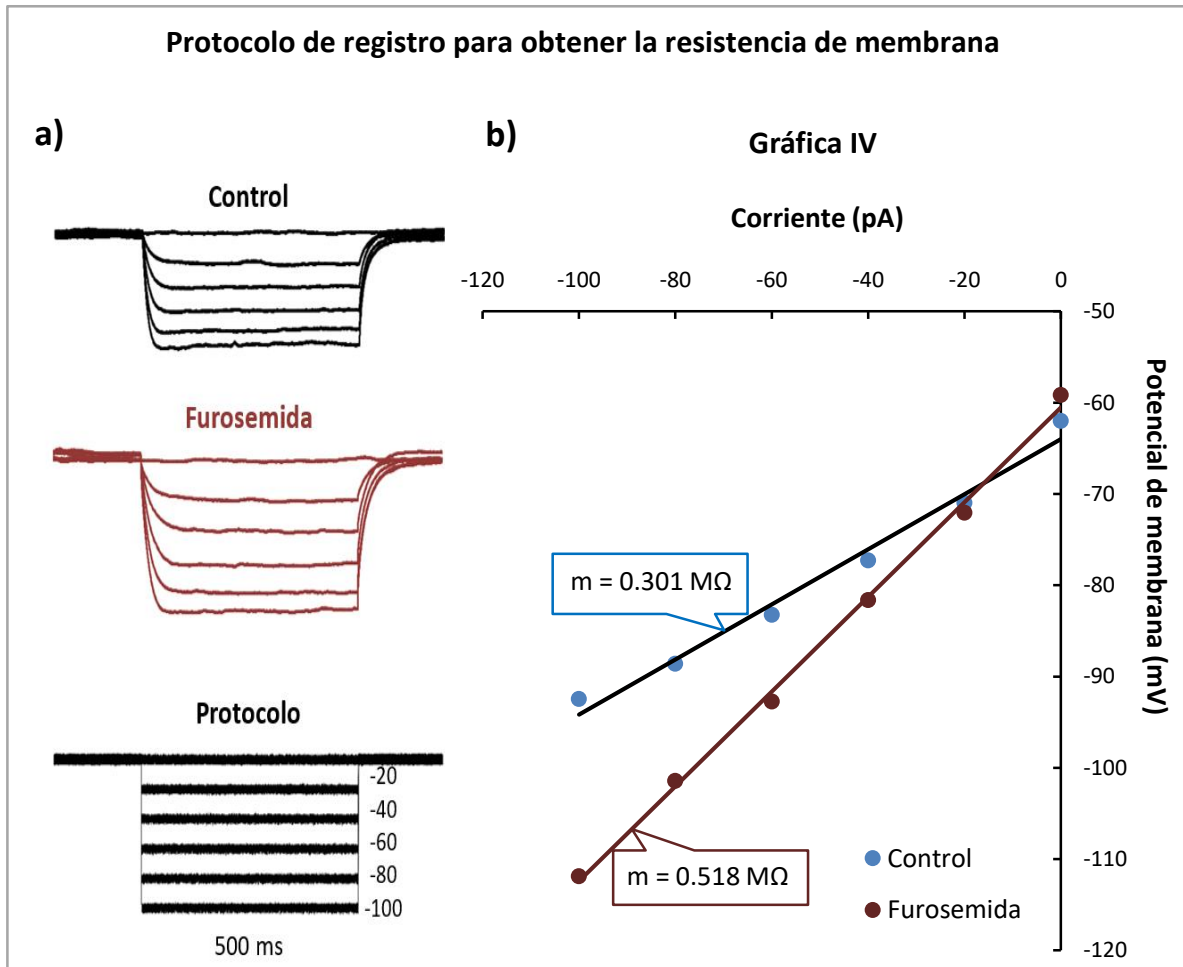
### **Resistencia de membrana**

En cuanto a la resistencia de entrada, al tratarse de interneuronas y debido a que su tamaño es pequeño su resistencia tiende a ser alta, (Tremblay et al., 2016); de acuerdo con la ley de Ohm ( $V=IR$ , donde  $V$  es el voltaje,  $I$  la corriente y  $R$  la resistencia) se considera que las interneuronas son altamente excitables, ya que presentan una respuesta en voltaje alta ante las entradas excitadoras.

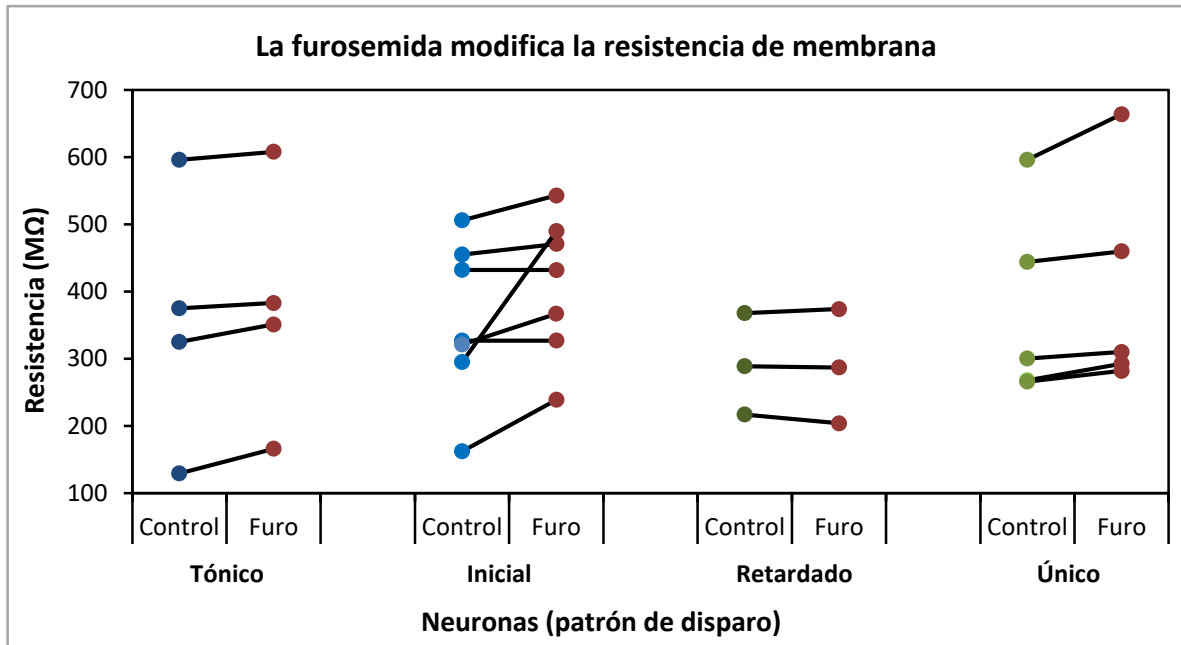
El protocolo que se empleó para determinar la resistencia en condición control y en presencia de furosemida, consiste en la aplicación de pulsos cuadrados hiperpolarizantes, considerando los resultados de cambio de voltaje lineales. Posteriormente se realizó la gráfica IV para determinar la resistencia a través de la ecuación de la recta, donde la pendiente  $m =$  resistencia, como se detalla en la figura 14, en donde se presenta a manera de ejemplo, el cambio en la resistencia de una de las neuronas registradas.

Los valores de la resistencia que se obtuvieron con variables entre neuronas del mismo tipo de disparo, por lo cual no fue posible realizar un análisis estadístico para cada uno de los cuatro grupos de neuronas. Por lo cual se realizó un análisis global del de las 19 neuronas registradas.

En presencia de furosemida se observó un incremento estadísticamente significativo de la resistencia (Control:  $351.10 \pm 29.61 \text{ M}\Omega$ ; furosemida:  $381.62 \pm 30.58 \text{ M}\Omega$ ,  $n = 19$ ; prueba *t* pareada:  $p = 0.0099$ ) (Fig. 15), lo que sugiere que este fármaco incrementa la excitabilidad de la neurona al aumentar la resistencia.



**Figura 14. Protocolo de registro para la obtención de la resistencia.** a) Se muestra la respuesta evocada en mV a la aplicación escalonada de pulsos de corriente negativa desde  $-20 \text{ mV}$  a  $-100 \text{ mV}$ , en condiciones control (trazos en negro) y en presencia de furosemida (trazo en rojo). b) La gráfica IV muestra la línea ajustada a los puntos obtenidos a partir de la relación entre la corriente aplicada (pA) y la respuesta en voltaje (mV); en donde la pendiente ( $m$ ) es la resistencia, podemos observar el aumento de la resistencia generada por la furosemida ( $1 \text{ G}\Omega = 1000 \text{ M}\Omega$ ).

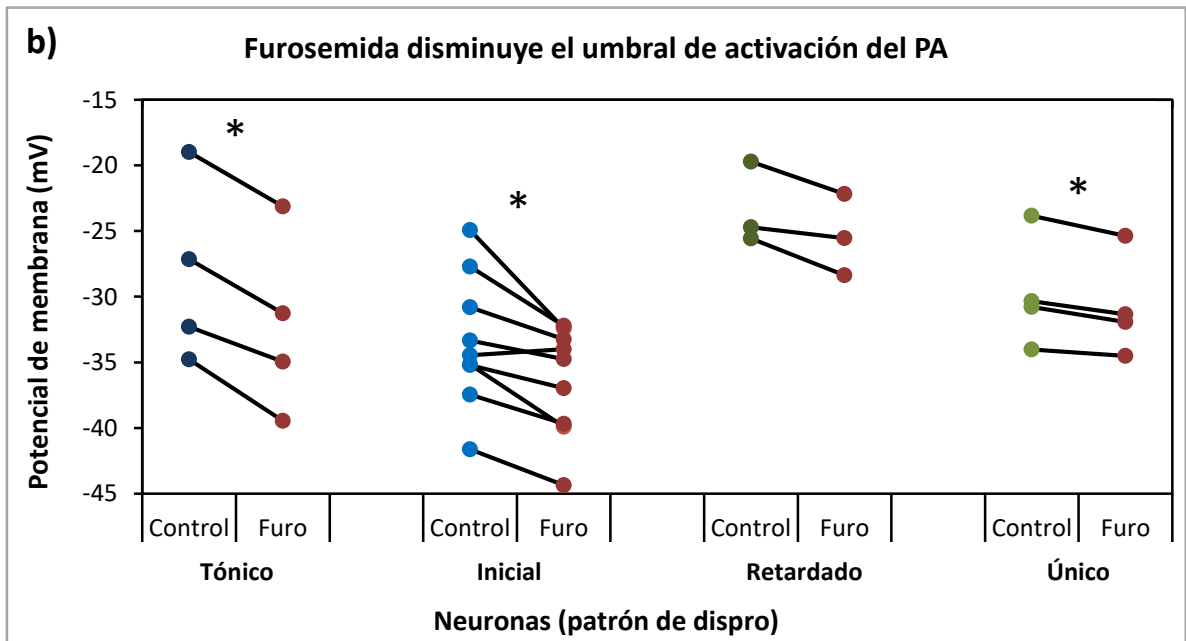
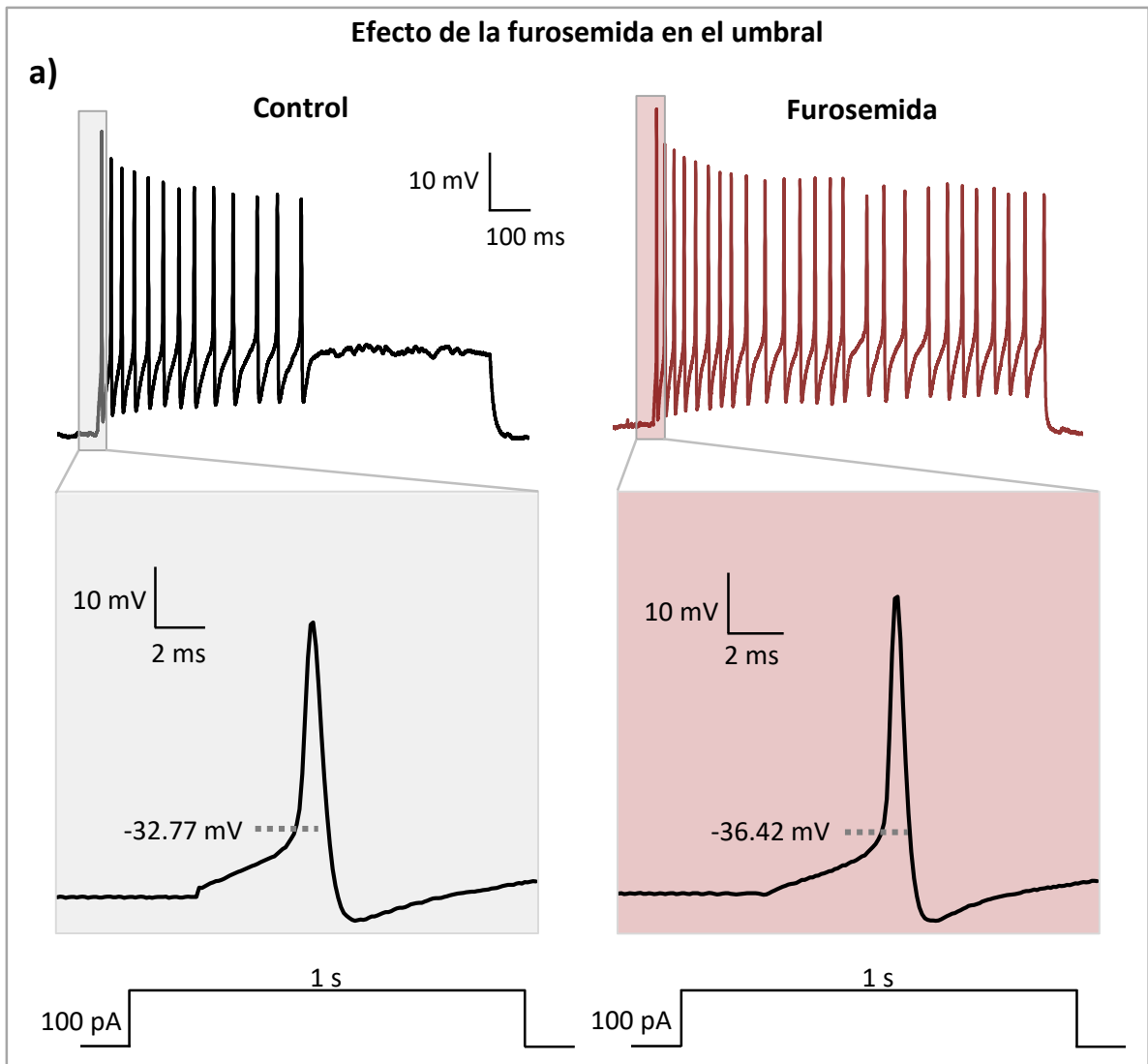


**Figura 15. Efecto de la furosemida en la resistencia de la membrana.** Furosemida aumentó la resistencia en las 19 neuronas registradas (Control:  $351.10 \pm 29.61 \text{ M}\Omega$ ; furosemida:  $381.62 \pm 30.58 \text{ M}\Omega$ ,  $n = 19$ ; prueba *t* pareada:  $p = 0.0099$ ). Los datos fueron analizados únicamente de manera global, debido a que las muestras de cada patrón de disparo no siguen una distribución normal.

### Umbral de activación de un potencial de acción

Los resultados concuerdan con lo propuesto por Punnakkal et al., (2014), ya que las neuronas de disparo único y de disparo retardado presentan un umbral más despolarizado que el de las neuronas de disparo tónico e inicial (Fig. 16), lo cual está relacionado con sus respectivos valores de reobase. El umbral se obtuvo analizando el primer potencial de acción de los trazos de la caracterización del patrón de disparo (Fig.16a)

Del total de las 20 neuronas, en 19 de ellas la reobase disminuyó (control:  $-30.14 \pm 5.94 \text{ mV}$  vs. furosemida:  $-32.77 \pm 5.82 \text{ mV}$ ) (Fig. 14b). Adicionalmente se realizó el análisis estadístico para cada uno de los cuatro grupos, encontrando una disminución del umbral mayor en el grupo de neuronas tónicas (control:  $-28.30 \pm 3.48 \text{ mV}$ ; furosemida:  $-32.19 \pm 3.45 \text{ mV}$ ) e iniciales (control:  $-33.40 \pm 1.67 \text{ mV}$ ; furosemida:  $-36.39 \pm 1.38 \text{ mV}$ ).



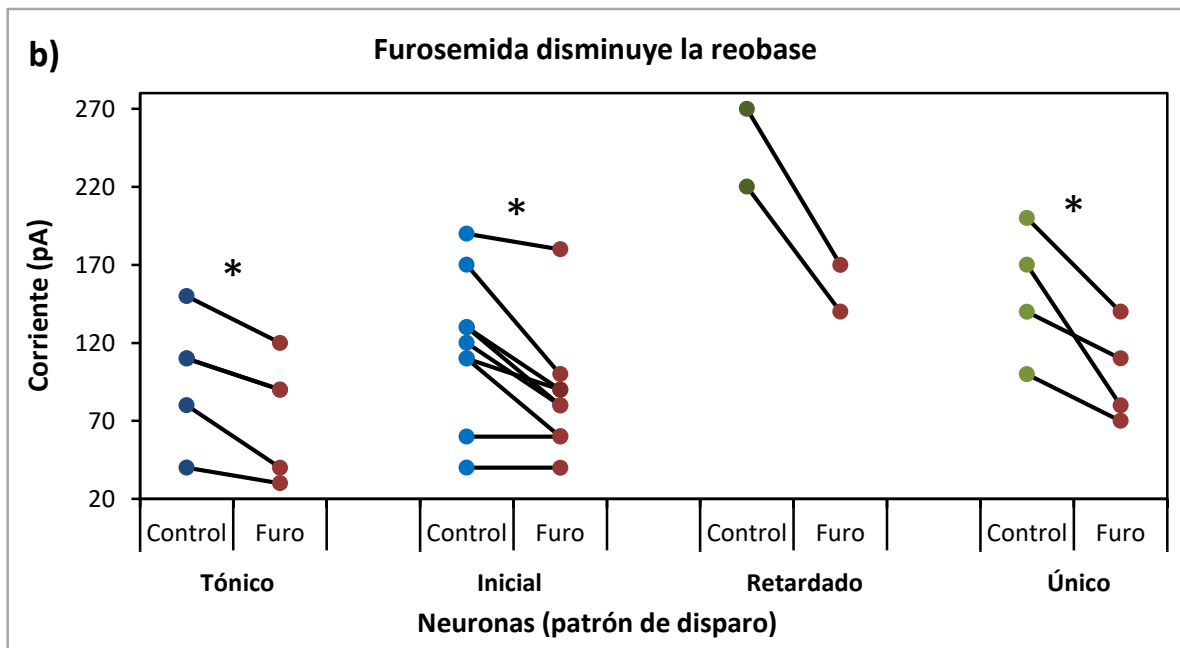
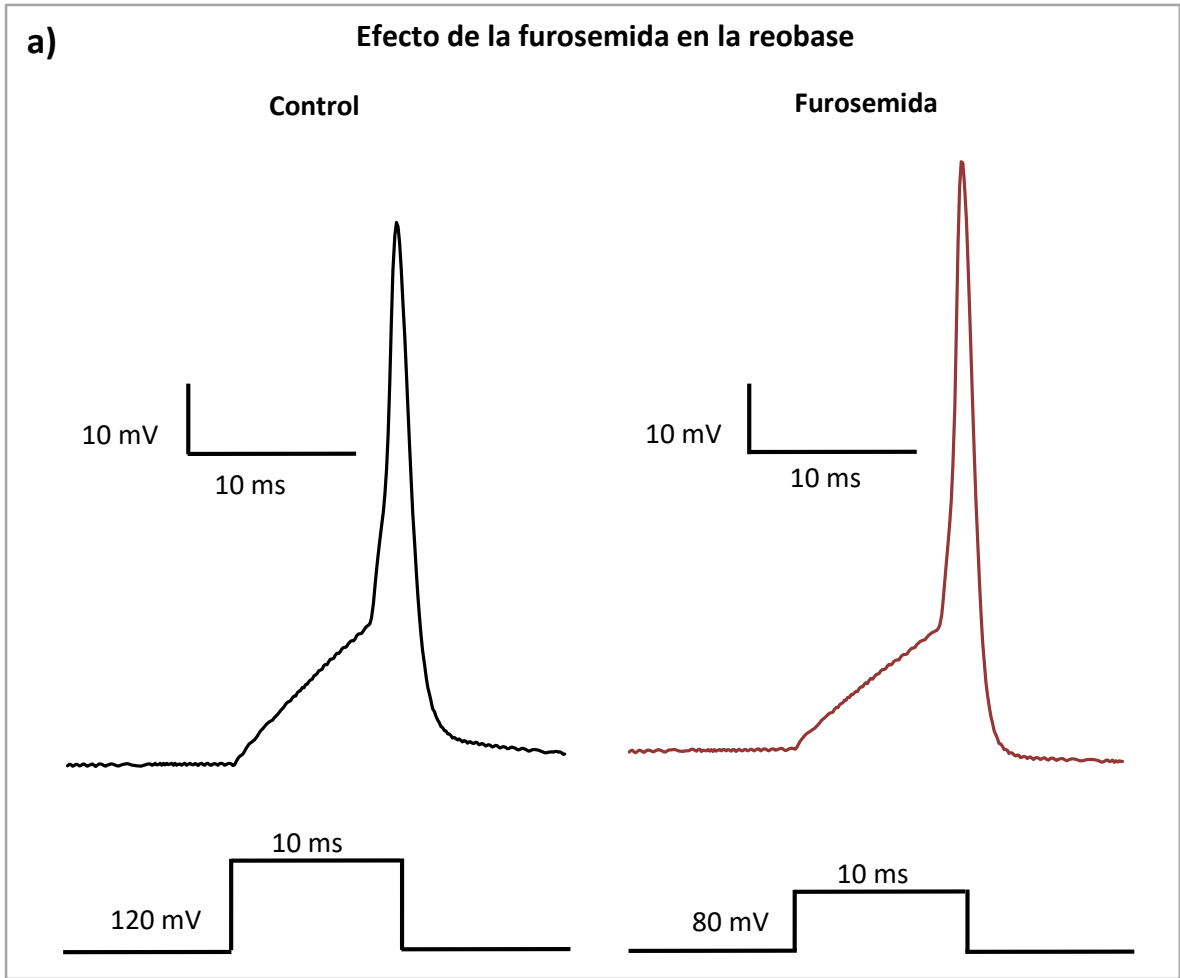
### **Figura 16. Efecto de la furosemida en el umbral de activación del potencial de acción.**

a) Se muestran los trazos de una neurona de disparo inicial en condiciones control (izquierdo) y en presencia de furosemida (derecho), para el análisis del umbral se amplificó el primer potencial de acción para poder encontrar el punto en que el voltaje incrementa rápidamente (imágenes sombreadas). Además de la disminución del umbral, se observa un incremento en el número de potenciales de acción en presencia de furosemida. b) Se observa que el umbral de activación del PA se hace más negativo después de la aplicación de furosemida, es decir, que las neuronas se hacen más excitables (control:  $-30.14 \pm 1.33$  mV,  $n = 20$  vs. furosemida:  $-32.77 \pm 1.30$  mV,  $n = 20$ ; prueba *t pareada*:  $p = 0.0000046$ ). De igual manera, se analizaron las neuronas por grupo de acuerdo con su tipo de disparo: tónico (control:  $-28.30 \pm 3.48$  mV; furosemida:  $-32.19 \pm 3.45$  mV,  $n = 4$ ; prueba de *t pareada*,  $p = 0.0029$ ); inicial (control:  $-33.40 \pm 1.67$  mV; furosemida:  $-36.39 \pm 1.38$  mV,  $n = 9$ ; prueba de *t pareada*,  $p = 0.0045$ ); retardado (control:  $-23.33 \pm 1.82$  mV; furosemida:  $-25.36 \pm 1.79$  mV,  $n = 3$ ; prueba de *t pareada*,  $p = 0.08$ ); único (control:  $-29.74 \pm 2.13$  mV; furosemida:  $-30.78 \pm 1.93$  mV,  $n = 4$ ; prueba de *t pareada*,  $p = 0.016$ ). \*Diferencia significativa.

### **La Reobase**

De acuerdo con Li et al (2021), tanto las neuronas excitadoras como inhibitoras comparten las mismas propiedades intrínsecas, como potencial de membrana, resistencia y reobase. Sin embargo, las neuronas registradas en este trabajo concuerdan con los resultados de Punnakkal et al. (2014), ya que las neuronas de disparo único y de disparo retardado (excitadoras) presentan en promedio una reobase mayor (Fig. 17) que el de las neuronas de disparo tónico e inicial (inhibidoras).

El efecto de la furosemida sobre los receptores  $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub> se evidenció en la disminución de la reobase, ya que, de las 19 neuronas registradas, en 17 de ellas el potencial de acción se activó con una menor cantidad de corriente (control:  $-132.5 \pm 13.18$  pA vs. furosemida:  $-93 \pm 9.15$  pA), después de haber aplicado el fármaco. Se analizaron los resultados por grupos de acuerdo con su patrón de disparo, excepto en el caso de las neuronas de disparo retardado, ya que sólo se cuenta con dos registros con éste protocolo.

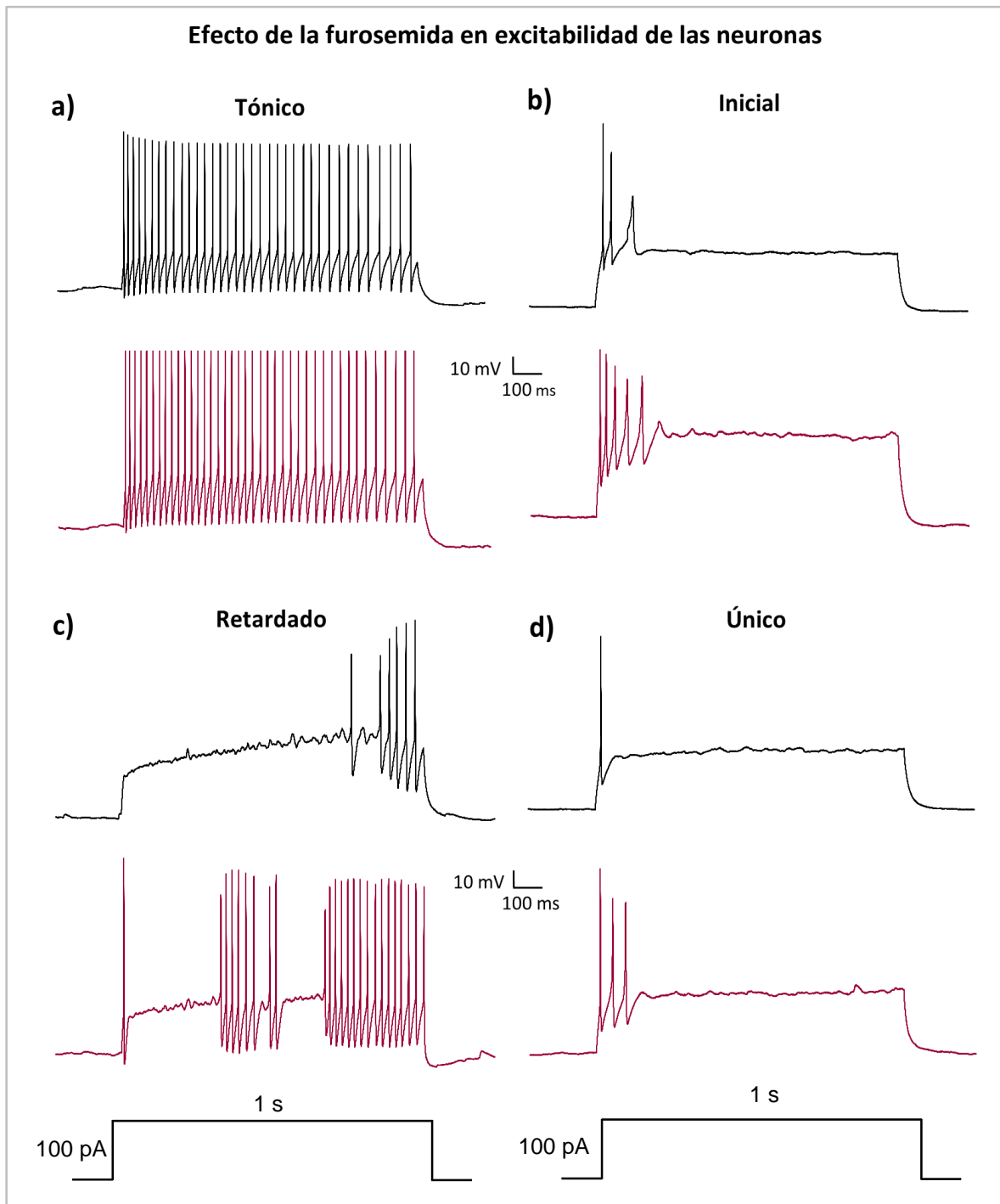


**Figura 17. Efecto de la furosemida en la reobase.** a) Se muestra el protocolo para determinar la reobase, el cual consiste en aplicar pulsos despolarizantes de 10 ms en incrementos de 10 pA, considerando como reobase el valor de la corriente mínima necesaria para producir el potencial de acción; en el ejemplo se observa un valor de reobase de 120 pA en condiciones control, el cual disminuyó en presencia de furosemida a 80 pA. b) La gráfica muestra la reobase (pA) en condición control y en presencia de furosemida (círculos rojos). Observándose una disminución significativa en la reobase entre ambas condiciones de registro (control:  $132.5 \pm 13.18$  pA,  $n = 20$  vs. furosemida:  $93 \pm 9.15$  pA,  $n = 20$ ; prueba *t* pareada,  $p = 0.0000065$ ). Así mismo, se analizaron las neuronas por grupo de acuerdo con su tipo de disparo: tónico (control:  $98 \pm 18.28$  pA; furosemida:  $74 \pm 16.9$  pA,  $n = 5$ ; prueba de *t* pareada,  $p = 0.009$ ); inicial (control:  $117.77 \pm 15.7$  pA; furosemida:  $86.67 \pm 13.2$  pA,  $n = 9$ ; prueba de *t* pareada,  $p = 0.0054$ ); retardado (no se realizó análisis estadístico debido a que la  $n = 2$ , pero sí fueron consideradas en el análisis global); único (control:  $152.5 \pm 21.36$  pA; furosemida:  $100 \pm 15.8$  pA,  $n = 4$ ; prueba de *t* pareada,  $p = 0.035$ ). \*Diferencia estadísticamente significativa.

### Potenciales de acción

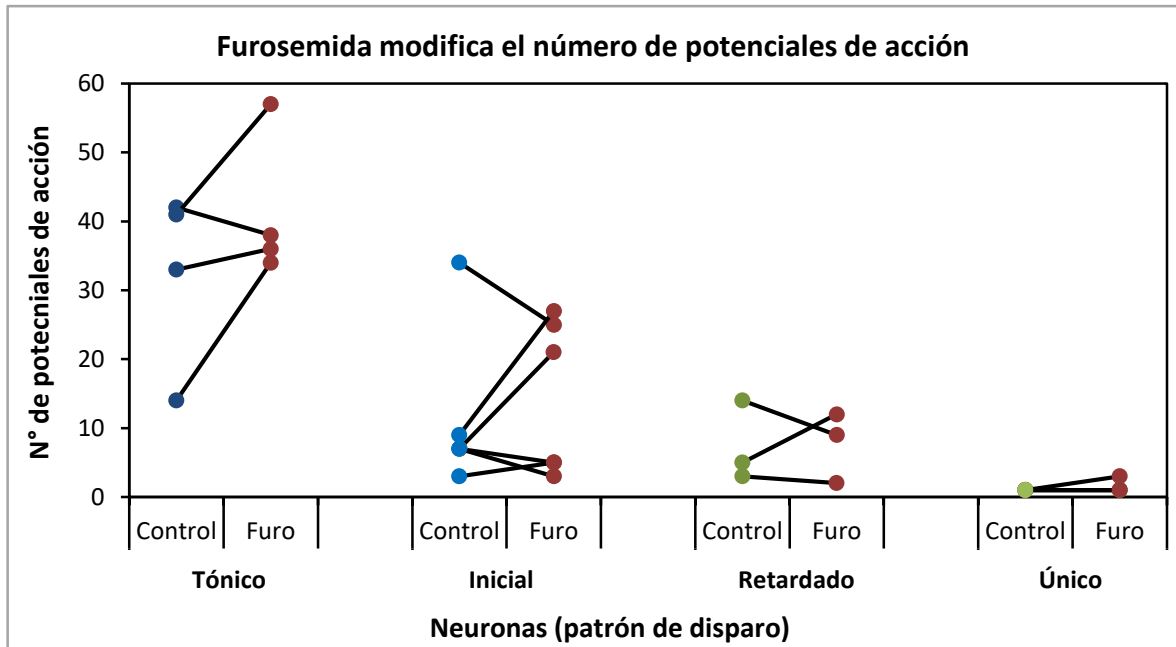
Se determinó el número de potenciales de acción que se presentaron ante la aplicación de un pulso corriente despolarizante de 100 pA durante 1 s a partir del PMR en condición control y en presencia de furosemida (Fig. 18).

Los resultados indican que el patrón de disparo tónico está compuesto por un mayor número de potenciales de acción (Fig. 20), seguido del patrón inicial y el retardo. La imagen 18 muestra un ejemplo de cada tipo de patrón de disparo en condiciones control y en presencia de furosemida. La cantidad de potenciales de acción incrementó en 3 de las 4 tónicas, 3 de las 6 iniciales, 1 de las 3 de disparo retardado y 1 de las 4 de disparo único; es decir, del total de 17 neuronas, en 8 incrementaron los PA (Fig. 19). El número de registros, así como la dispersión del número de potenciales de acción, dificulta el análisis estadístico, por lo que es necesario incrementar el número de neuronas para llegar a un resultado concluyente sobre el efecto de furosemida en la cantidad de PA de la neurona.

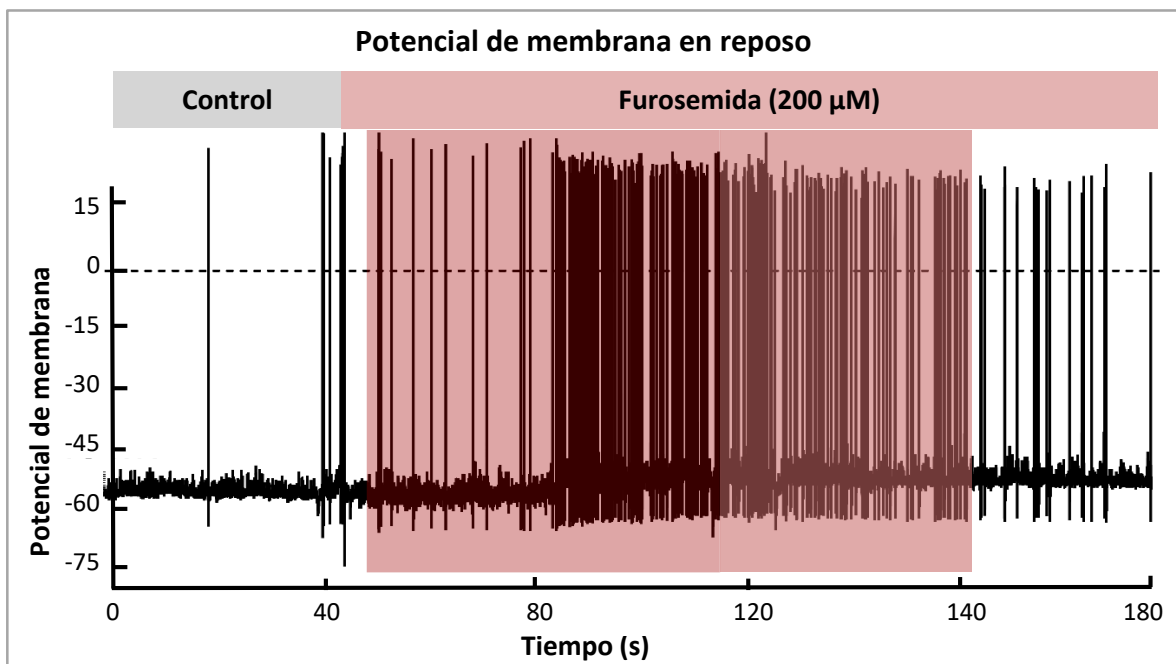


**Figura 18. Efecto de la furosemida en la excitabilidad neuronal.** Los trazos en negro muestran los cuatro tipos de neuronas en condiciones control (a: tónica, b: inicial, c: retardado y d: único), comparado con los efectos de la furosemida (trazos en rojo); en donde se observa un aumento en el número de potenciales de acción, despolarización del potencial de membrana en reposo y disminución en el umbral.



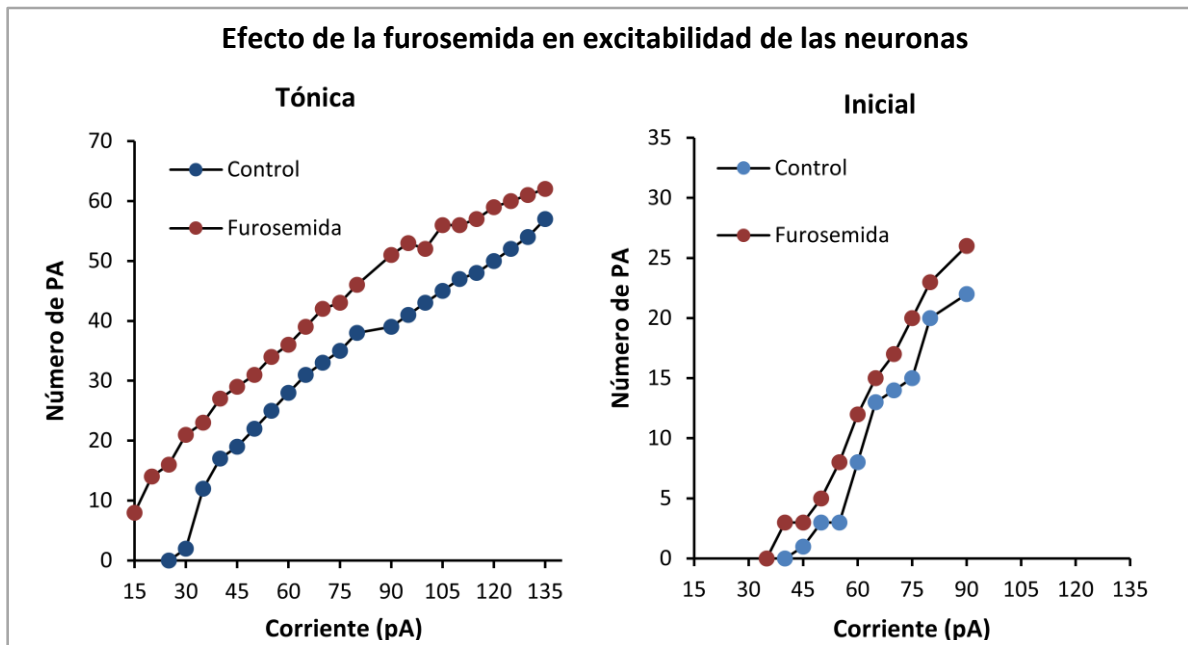


**Figura 19. Efecto de la furosemida en el número de potenciales de acción.** Se presenta el número de potenciales de acción evocados por un estímulo de corriente despolarizante de 100 pA durante 1 s a partir del PMR. Se analizaron 4 neuronas tónicas, 6 iniciales, 3 de disparo retardado y 4 de disparo único. Del total de las 17 neuronas, el número de PA aumentó en 8, se mantuvo en 4 y disminuyó en 5 (control:  $13.12 \pm 3.55$  PA furosemida:  $16.59 \pm 4.10$  PA,  $n = 17$ ; prueba *t* pareada:  $p = 0.113$ ).



**Figura 20. Comportamiento del potencial de membrana en reposo en presencia de furosemida.** Se muestra el registro del PMR (-50.23 mV) de una neurona (de disparo tónico) con actividad espontánea irregular, se observa que al aplicar furosemida (rojo) el número de potenciales de acción se incrementa después de 6 s, alcanzando un máximo en su frecuencia de disparo 30 s después, tiempo que coincide con una despolarización >2 mV.

Adicionalmente, con el objetivo de evaluar el efecto de furosemida en la excitabilidad de las neuronas, se determinó el número de potenciales de acción evocados por pulsos escalonados de corriente despolarizante de 1 s de duración. Se encontró que la gráfica de corriente contra el número de potenciales de acción obtenida en condición control se corrió a la izquierda en presencia de furosemida, lo que implica un aumento en la excitabilidad (Fig. 21).



**Figura 21. Potenciales de acción en respuesta a pulsos despolarizantes.** Las curvas muestran el número de potenciales de acción generados por la aplicación escalonada de pulsos cuadrados (1 s) de 5 pA. Se puede observar un incremento en el número de potenciales de acción en las dos neuronas que se presentan. En el caso de la neurona de

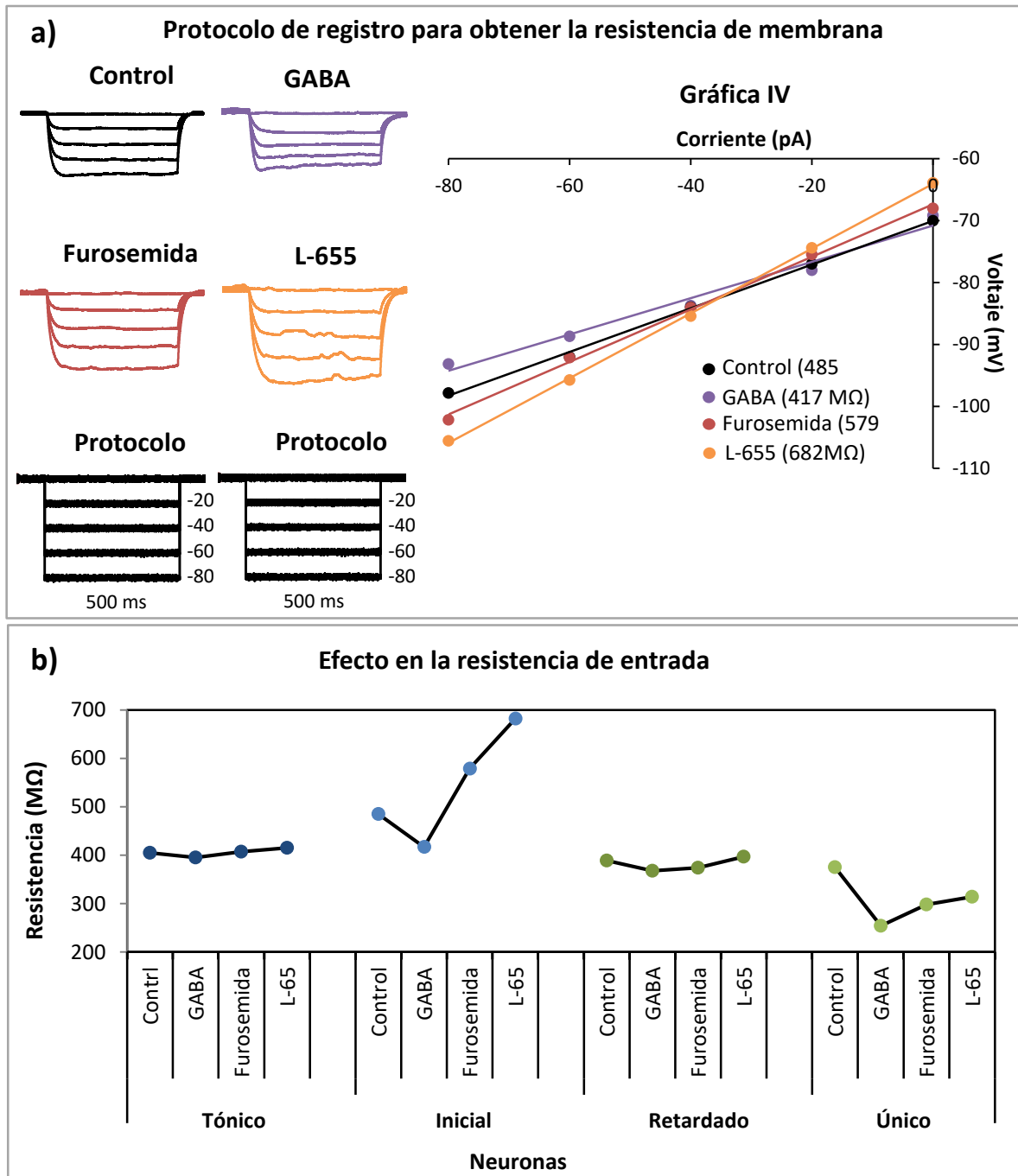
disparo tónico se puede apreciar un desplazamiento de la curva de furosemida a la derecha, evidenciando un incremento en los potenciales y en el umbral.

### **Efecto de la furosemida en las propiedades pasivas y activas de la membrana en presencia de GABA**

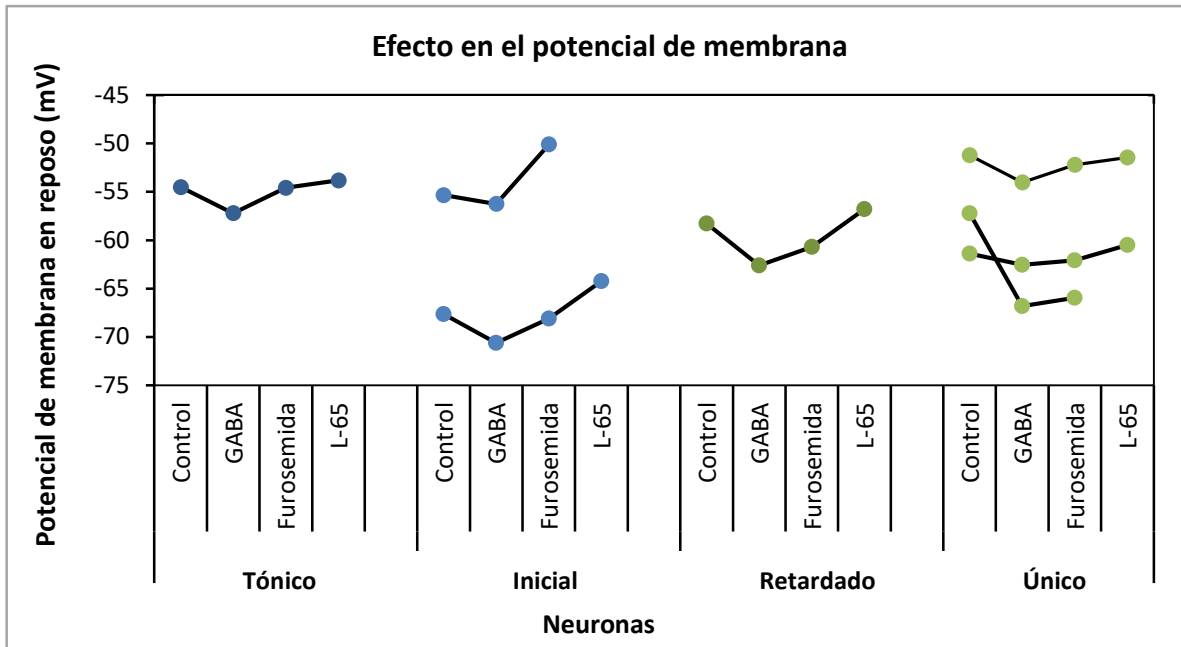
Diversos estudios han comprobado la existencia de receptores GABA<sub>A</sub> que no se desensibilizan en presencia de GABA por lo que son del tipo extrasináptico, en particular se ha reportado una mayor activación de estos receptores en presencia de GABA a una concentración de 5  $\mu$ M, y que fueron bloqueados con furosemida 200  $\mu$ M (Guyon et al., 2022). Con el objetivo de reproducir dichas condiciones, se realizaron registros de interneuronas del asta dorsal de la médula espinal en presencia de GABA (5  $\mu$ M) más furosemida (200  $\mu$ M). Adicionalmente, con el fin de determinar la activación conjunta de los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> se aplicó L-655,708 (agonista inverso del receptor).

En el caso del GABA, se une a los receptores GABA, provocando la entrada de Cl<sup>-</sup>, disminuyendo la resistencia de membrana (Fig. 22a). Al activarse más receptores GABA extrasinápticos se incrementa la conductancia de la membrana lo que produjo la hiperpolarización del potencial de membrana (Fig. 23), que a su vez incrementó la reobase (Fig. 24a), incrementándose en paralelo el umbral de disparo del PA (Fig. 25).

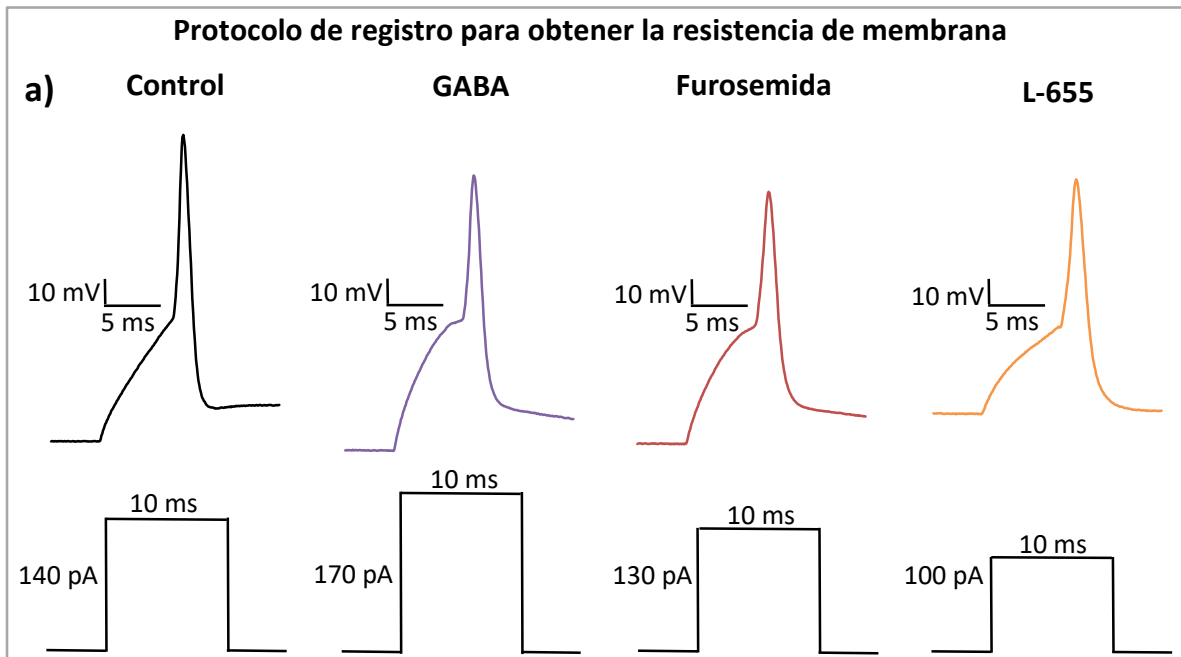
De manera interesante, los efectos de GABA fueron contrarrestados primero por el bloqueo de los receptores  $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub> con furosemida, y todavía más con el bloqueo de los receptores extrasinápticos  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> con L-655708. Se incrementó la resistencia de membrana celular (Fig. 22), se despolarizó el PM (Fig. 23), disminuyó la reobase (Fig. 24) y disminuyó el umbral del PA (Fig. 25). Todos estos efectos se deberían de traducir en un incremento de la excitabilidad de las neuronas. Sin embargo, al evaluar el número de potenciales de acción activados con un solo pulso de corriente despolarizante de 100 pA, solo se registró un incremento en las neuronas de tipo tónico y retardado, pero no en las de disparo inicial y único (Fig. 26), por lo que se deben de evaluar en el futuro la excitabilidad aplicando una secuencia de pulsos crecientes de corriente supraumbral.

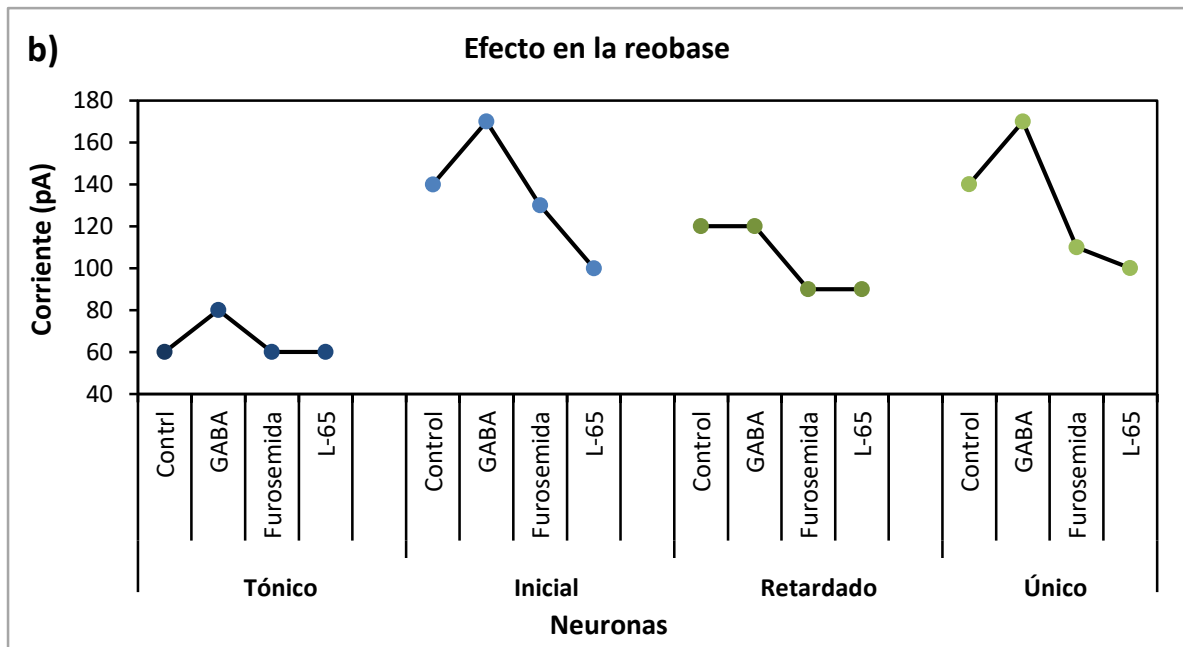


**Figura 22. Efecto en la resistencia de entrada en presencia de GABA, furosemida y L-655708.** a) Se muestran los trazos obtenidos con el protocolo de pulsos escalonados de corriente negativa, mismo que se describe previamente (Fig. 14). b) La gráfica muestra los cambios en la resistencia de entrada en medio control, en presencia de furosemida más L-655708 para los cuatro tipos de neuronas registradas en función de su patrón de disparo de PA.

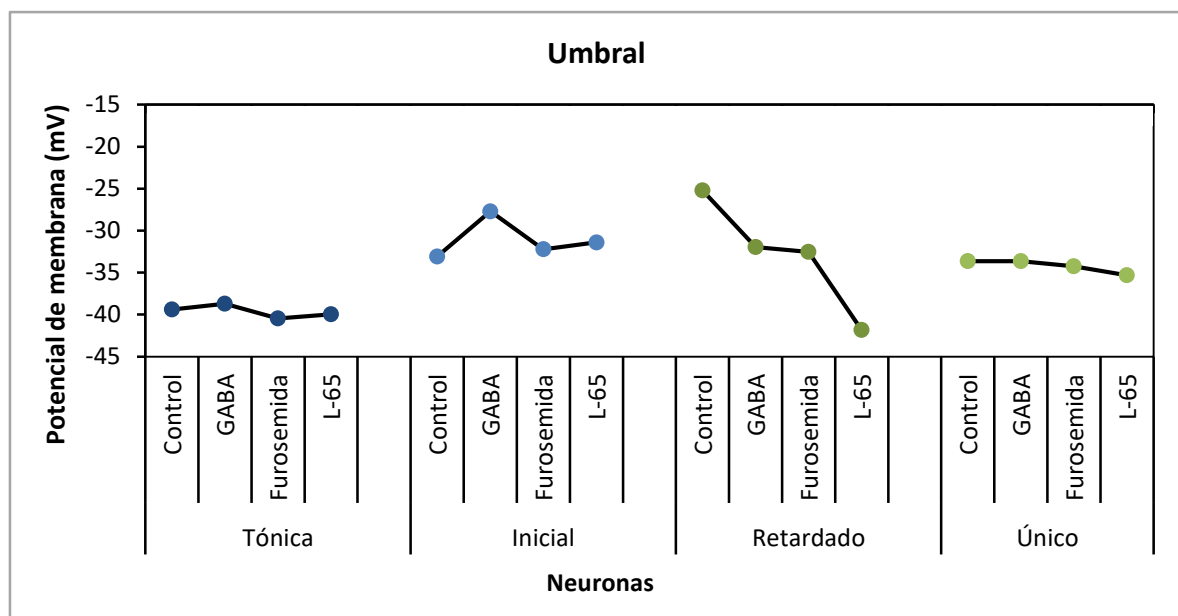


**Figura 23. Efecto de GABA, furosemida y L-655708 en el potencial de membrana.** La gráfica muestra los cambios en el potencial de membrana en reposo de 7 neuronas en cuatro condiciones, de izquierda a derecha: control, +GABA (5  $\mu$ M), GABA+furosemida (200  $\mu$ M) y GABA+Furosemida+L-65 (20  $\mu$ M). Observando hiperpolarización en presencia de GABA; posteriormente se aplicó furosemida, la cual generó despolarización; finalmente se agregó L-65, lo que indujo una mayor despolarización de membrana.

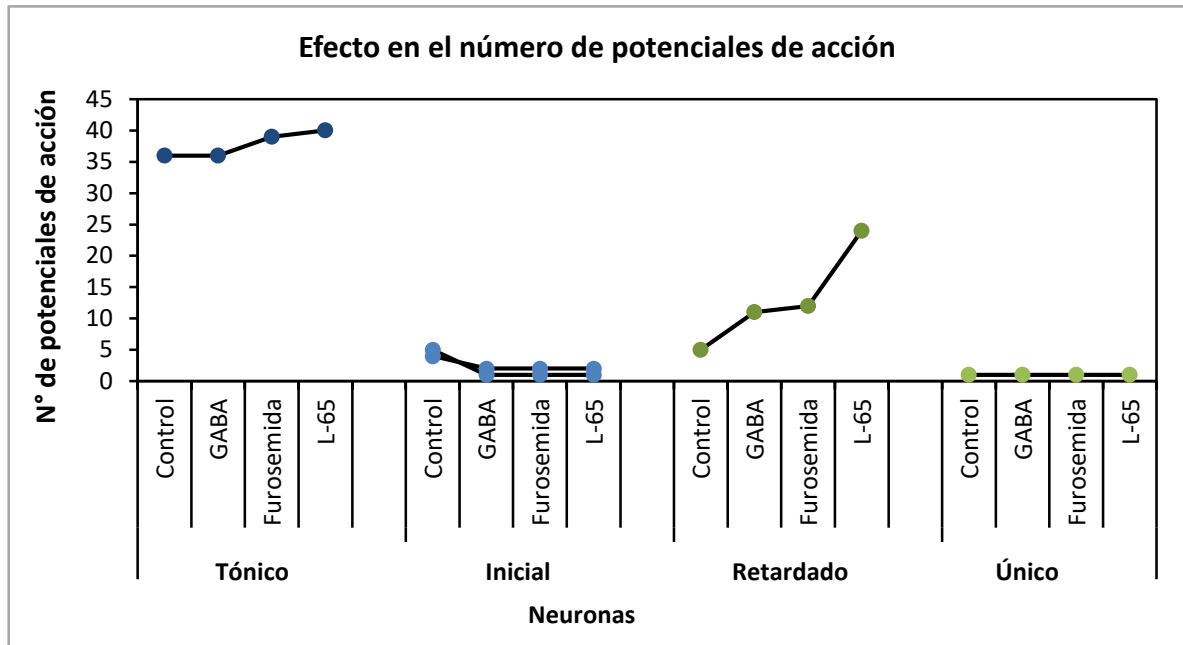




**Figura 24. Efecto de GABA, furosemida y L-655708 en la reobase.** a) Se presentan los trazos obtenidos en una neurona de disparo inicial; en condiciones la reobase fue de 140 pA, con la aplicación del GABA la reobase aumentó a 170 pA, después de la aplicación de furosemida la reobase disminuyó a 130 pA y en presencia de L-655 disminuyó a 100 pA. b) La gráfica muestra el efecto de GABA, furosemida y L-655 en la reobase de cada tipo de neurona.



**Figura 25. Efecto de GABA, furosemida y L-655708 en el umbral de activación del PA.** El umbral del potencial de acción aumentó con GABA, disminuyó con furosemida y disminuyó aún más con L-65 en dos de las cuatro neuronas.



**Figura 26. Efecto de GABA, furosemida y L-655708 en el número de potenciales de acción.** En la neurona con disparo tónico y retardado se presenta un aumento en el número de los potenciales de acción en presencia de furosemida y L-65. Mientras que en la neurona de disparo inicial, al igual que la de disparo único no parece haber efecto de los bloqueadores, por lo cual, los resultados no pueden ser concluyentes.

## Discusión

El objetivo principal de este trabajo fue realizar registros electrofisiológicos con la técnica de *patch-clamp* en fijación de corriente para determinar la participación de los receptores  $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub> en la excitabilidad de las interneuronas que participan en el circuito que procesa la nocicepción, presentes en las láminas I-III de la médula espinal de ratas adultas; para lo cual fue necesario evaluar sus propiedades pasivas y activas en condiciones y en presencia de furosemida.

### Registros electrofisiológicos en ratas adultas

Se logró mejorar la técnica de extracción de la médula espinal, así como la obtención de rebanadas del engrosamiento lumbar de ratas adultas (180-200 g), encontrando células viables en cada una de las láminas de interés. Lo cual representa la posibilidad de realizar estudios posteriores en ratas adultas de modelos de diversos tipos de dolor crónico. Este resultado representa un gran avance técnico ya que la mayoría de los estudios biofísicos se han realizado en ratas jóvenes de 14 a 21 d, edad en la que la expresión de canales, tamaño y complejidad de las ramas dendríticas aún se encuentran en desarrollo y por lo tanto la función integradora difiere con las propiedades de un sistema nervioso adulto (Johnston, D. et al., 1996).

Li y colaboradores (2021) son considerados como el único grupo que ha logrado realizar registros *de patch-clamp* en la lámina II del asta dorsal de la médula espinal de ratas adultas de 10 meses de edad (300-350 g), usando solución N-metil-D-glucamina (NMDG) como método para proteger el tejido y asegurar la viabilidad celular. Sin embargo, en este trabajo se logró el registro estable de células de las láminas I-III utilizando solución estándar, con lo cual se disminuye la posibilidad de factores externos que pudieran alterar el comportamiento celular.

Se obtuvieron registros electrofisiológicos estables, con una duración de más de 25 min, lo cual hizo posible la reproducción de los patrones de disparo de PA semejantes a los



reportados previamente por Zhu et al. (2021), Li et al. (2021) y Hughes et al. (2012). Así mismo, se midieron las propiedades biofísicas de las neuronas: resistencia, reobase y umbral de activación del PA; en condiciones control y en presencia de furosemida.

### **Clasificación de las neuronas de las láminas I-III de la médula espinal**

Las neuronas fueron clasificadas de acuerdo con el patrón de disparo de potenciales de acción reportado por Punnakkal et al., (2014); Li et al., (2021) y Zhu et al., (2021). Una vez identificado el patrón de disparo, las neuronas fueron clasificadas en inhibitoras y excitadoras; característica importante a considerar para futuros estudios en la caracterización de estas neuronas dentro del circuito que procesa el dolor.

Los resultados concuerdan con los presentados por Punnakkal et al., (2014), ya que las neuronas excitadoras presentan una reobase y umbral de potencial de acción más despolarizados, por lo que se podrían considerar como menos excitables que las neuronas inhibitoras, debido a que necesita de una entrada excitadora más intensa para su activación. El efecto de la furosemida se observó tanto en inhibitoras como en excitadoras, lo que se concluyó de un análisis general para el total de éstas, por lo que, para poder determinar el efecto particular en cada tipo de neuronas sería necesario aumentar el número de registros.

### **Papel de los receptores $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub> en la excitabilidad de las neuronas de las láminas I-III**

Con la aplicación de furosemida se observó un incremento en la resistencia de entrada, una despolarización del potencial de membrana, un decremento en la reobase y una disminución en el umbral de disparo del PA. Todo esto muestra que los receptores  $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub> están tónicamente activos por el GABA del medio extracelular modulando la excitabilidad de las interneuronas. Estos resultados concuerdan con los reportados por Aguilar-Palomares (2002), quien mostró que se producen los mismos cambios por el bloqueo de los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> extrasinápticos. Por lo que se puede concluir que la excitabilidad de las interneuronas del circuito que procesa la información nociceptiva está reducida por estos

dos receptores extrasináptico tónicamente activados por el GABA del medio extracelular. Esto podría explicar porque en ratas sanas la aplicación intratecal de furosemida y L-655708 induce alodinia mecánica semejante a la observada en modelos de dolor neuropático inducido por diabetes tipo 1 (Hernández-Reyes et al., 2019), lesión de un nervio espinal (Bravo-Hernández et al., 2016; Rodríguez-Palma et al., 2022). Por lo que se considera que estos receptores tienen un papel antinociceptivo en animales sanos.

Es muy probable que esta acción antialodínica de estos receptores se deba a que están tónicamente inhibiendo a las interneuronas que conectan polisinápticamente a las fibras  $A_{\beta}$  con las neuronas de proyección, por lo que la activación de estas fibras aferentes solo produce una despolarización polisináptica de muy baja amplitud que no alcanza a producir PA en las neuronas de proyección del dolor, que a su vez también podrían estar reguladas por los mencionados receptores extrasinápticos (Takazawa y MacDermott, 2010).

Los patrones de disparo de PA son semejantes a los reportados por Punnakkal et al. (2014), quienes establecieron el protocolo para diferenciar los diferentes biofísicamente los diferentes tipos de neuronas: en el caso de las neuronas con potencial de acción retardado, el primero PA se presenta después de 100 ms del inicio de la aplicación de corriente. El efecto de la furosemida en este tipo de neuronas se observó principalmente en la disminución de la latencia (resultados no mostrados). No obstante, es necesario incrementar el número de registros para llegar a un resultado concluyente.

Sin embargo, es importante resaltar que, a pesar de que estamos considerando los patrones de disparo de las neuronas, ante la aplicación de diferentes protocolos de estimulación, para develar su patrón intrínseco, no podemos asegurar la fidelidad de estos patrones de disparo en el sistema integro, donde su activada está regulada por las constantes entradas excitadas e inhibitoras de las fibras aferentes primarias y de las aferentes de los tractos descendentes, así como por la variación de la concentración de GABA del medio extracelular que están modulando dinámicamente sus propiedades pasivas y activas. Sin embargo, los resultados obtenidos tienen una gran relevancia porque muestran que aun en un sistema reducido se demostró la importancia que tiene los receptores extrasinápticos en la modulación de la excitabilidad de las interneuronas del

circuito que procesa la nocicepción, lo que podría ayudar a entender la producción de la alodinia y por lo tanto, la posible implementación de fármacos que ayuden a tratar el dolor crónico tan presente en el humano.

En cuanto al muestreo de neuronas, es importante mencionar que en la elección de las que se registraron fueron las más grandes, de tipo fusiforme y con superficie lisa; lo que podría explicar la proporción más alta de neuronas de patrón inicial con respecto a las de disparo retardado. Por lo que se debe considerar dicho sesgo en estudios posteriores, con la implementación de técnicas de tinción o marcaje, que ayuden a describir y relacionar la estructura morfológica con su función.

## Conclusión

Los resultados obtenidos en este proyecto muestran la participación del receptor  $\alpha_6\text{GABA}_A$  en la excitabilidad de las neuronas de las láminas I-III del asta dorsal de la médula espinal que participan en el circuito que procesa el dolor.

## Perspectivas

- Evaluar la participación de los  $\alpha_6\text{GABA}_A$  en la corriente tónica inhibitoria en las neuronas de las láminas I-III.
- Caracterizar la relación entre los receptores los  $\alpha_6\text{GABA}_A$  y las corrientes dependientes de voltaje y su efecto en la integración sináptica en las neuronas de las láminas I-III.
- Evaluar electrofisiológicamente la participación de los receptores  $\alpha_6\text{GABA}_A$  en las propiedades activas y pasivas de neuronas de las láminas I-III del asta dorsal de la médula espinal en un modelo de dolor crónico.

- Determinar por medio de inmunofluorescencia la expresión de los receptores  $\alpha_6$ GABA<sub>A</sub> en neuronas de proyección, y en las interneuronas excitadoras e inhibitoras del asta dorsal de la médula espinal.

## Bibliografía

1. Abraira, V., y Ginty, D. (2013). *The sensory neurons of touch*. *Neuron*, 79(4), 618–639.
2. Aguilar, J. y Delgado-Lezama, R. (2022). *Papel del receptor  $\alpha 5$ GABAA en la regulación de la excitabilidad de las neuronas de las láminas I-II de la médula espinal*. Tesis de maestría, Cinvestav.
3. Alvarado-Cervantes, N. (2023). Tesis de doctorado.
4. Andres, C., Aguilar, J., González-Ramírez, R., Elias-Viñas, D., Felix, R., y Delgado-Lezama, R. (2014). *Extrasynaptic  $\alpha 6$  subunit-containing GABAA receptors modulate excitability in turtle spinal motoneurons*. *PloS one*, 9(12), e115378.
5. Basbaum A., Bautista D., Scherrer G., y Julius D. (2009). *Cellular and molecular mechanisms of pain*. *Cell*, 139(2):267-84.
6. Bautista, W., Aguilar, J., Loeza-Alcocer, J. E., y Delgado-Lezama, R. (2010). *Pre- and postsynaptic modulation of monosynaptic reflex by GABAA receptors on turtle spinal cord*. *The Journal of physiology*, 588(Pt 14), 2621–2631.
7. Bohlhalter, S., Weinmann, O., Mohler, H., y Fritschy, J. (1996). *Laminar Compartmentalization of GABAA-Receptor Subtypes in the Spinal Cord: An Immunohistochemical Study*. *The Journal of Neuroscience* 16 (1): 283–97.
8. Bravo-Hernández, M., Corleto, J., Barragán-Iglesias, P., González-Ramírez, R., Pineda-Farias, J., Felix, R., Calcutt, N., Delgado-Lezama, R., Marsala, M., y Granados-Soto, V. (2016). *The  $\alpha 5$  subunit containing GABAA receptors contribute to chronic pain*. *Pain*, 157(3), 613–626.
9. Brock, L., Coombs, J., y Eccles, J. (1952). Synaptic excitation and inhibition. *The Journal of physiology*, 117(2), 8p
10. Canto-Bustos, M., Loeza-Alcocer, E., Cuellar, C., Osuna, P., Elias-Viñas, D., Granados-Soto, V., Manjarrez, E., Felix, R., y Delgado-Lezama, R. (2017). *Tonically Active*

*$\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> Receptors Reduce Motoneuron Excitability and Decrease the Monosynaptic Reflex.* *Frontiers in cellular neuroscience*, 11, 283.

11. Chéry N., Yu X.H., y De Koninck, Y. (2000). *Visualization of lamina I of the dorsal horn in live adult rat spinal cord slices.* *J Neuroscience Methods*, 96:133–142.
12. Coull, J., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, A., Nault, F., Sík, A., De Koninck, P. y De Koninck Y. (2003). *Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain.* *Nature* 424, 938–942
13. Coull, J. A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M. W., y De Koninck, Y. (2005). *BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain.* *Nature*, 438(7070), 1017–1021.
14. Delgado-Lezama, R., Aguilar, J., y Cueva-Rolón, R. (2004). *Synaptic strength between motoneurons and terminals of the dorsolateral funiculus is regulated by GABA receptors in the turtle spinal cord.* *Journal of neurophysiology*, 91(1), 40–47.
15. Farrant, M. y 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.
16. Fishell, G., y Rudy, B. (2011). *Mechanisms of inhibition within the telencephalon: "where the wild things are".* *Annual review of neuroscience*, 34, 535–567
17. Golowasch, J., Thomas, G., Taylor, A., Patel, A., Pineda, A., Khalil, C., y Nadim, F. (2009). *Membrane capacitance measurements revisited: dependence of capacitance value on measurement method in nonisopotential neurons.* *Journal of neurophysiology*, 102(4), 2161–2175.
18. Gu, J., Zhuo, M., Caterina, M., MacDermott, A., Malmberg, A., Neugebauer, V., y Yoshimura, M. (2005). *Molecular pain, a new era of pain research and medicine.* *Molecular pain*, 1, 1.
19. Guyon, A., Cathala, L., Paupardin-Tritsch, D., y Eugène, D. (2002). *Furosemide modulation of GABA(A) receptors in dopaminergic neurones of the rat substantia nigra.* *Neuropharmacology*, 43(4), 750–763.

20. Guyon, A., Laurent, S., Paupardin-Tritsch, D., Rossier, J., y Eugène, D. (1999). *Incremental conductance levels of GABAA receptors in dopaminergic neurones of the rat substantia nigra pars compacta*. *The Journal of physiology*, 516 (Pt 3), 719–737.
21. Hernández-Reyes, J., Salinas-Abarca, A., Vidal-Cantú, G., Raya-Tafolla, G., Elias Viñas, D., Granados-Soto, V., y Delgado-Lezama, R. (2019).  *$\alpha$ 5GABAA receptors play a pronociceptive role and avoid the rate-dependent depression of the Hoffmann 43 reflex in diabetic neuropathic pain and reduce primary afferent excitability*. *Pain*, 160(6), 1448–1458.
22. Hughes, D., Sikander, S., Kinnon C., Boyle K., Watanabe M., Callister R. y Graham, B. (2012). *Morphological, neurochemical and electrophysiological features of parvalbumin-expressing cells: a likely source of axo-axonic inputs in the mouse spinal dorsal horn*. *J Physiol* 590:3927–3951
23. IASP Subcommittee on Taxonomy. (1979). *Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy*. *Pain*. 6:249–52.
24. International Association for the Study of Pain. (2021). *IASP Announces Revised Definition of Pain*. International Association for the Study of Pain (IASP).
25. Johnston, D., Magee, J., Colbert, C., y Christie, B. (1996). *Active Properties of Neuronal Dendrites*. *Annual Review of Neuroscience*, 19(1), 165–186.
26. Jolival, C., Lee, C., Ramos, K. y Calcutt, N. (2008). *Allodynia and hyperalgesia in diabetic rats are mediated by GABA and depletion of spinal potassium-chloride cotransporters*. *Pain*, 140(1), 48–57.
27. Korpi, E., Kuner, T., Seeburg, P. y Lüddens, H. (1995). *Selective antagonist for the cerebellar granule cell-specific  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor*. *Molecular Pharmacology*. 47:283–289.
28. Lee, H., Chen, C., Liu, Y., Aizenman, E. y Kandler, K. (2005). *KCC2 expression in immature rat cortical neurons is sufficient to switch the polarity of GABA responses*. *The European journal of neuroscience*, 21(9), 2593–2599.

29. Li, Y., Su, S., Yu, J., Peng, M., Wan, S., y 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.
30. Lynn B. (1994). *The fibre composition of cutaneous nerves and the classification and response properties of cutaneous afferents, with particular reference to nociception*. *Pain Rev*, 1:172–183.
31. Macdonald, R. y Twyman R. (1991) *Biophysical properties and regulation of GABAA receptor channels*. *Seminars in the Neurosciences* 3:219–235.
32. Macdonald, R., y Olsen, R. (1994). *GABAA receptor channels*. *Annual review of neuroscience*, 17, 569–602.
33. Malmberg, A., Chen, C., Tonegawa, S., y Basbaum, A. (1997). *Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC gamma*. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5336), 279–283.
34. Miranda, C., Hegedüs, K., Wildner, H., Zeilhofer, H., y Antal, M. (2022). *Morphological and neurochemical characterization of glycinergic neurons in laminae I-IV of the mouse spinal dorsal horn*. *The Journal of comparative neurology*, 530(3), 607–626.
35. Ramon-Móliner, E. (1968). *The morphology of dendrites*. In: *Bourne GH (ed) The structure and function of nervous tissue*. Volume I Structure I Academic Press, New York, London, pp 205–267
36. Nusser, Z., Sieghart, W., y Somogyi P. (1998). *Segregation of different GABA<sub>A</sub> receptors to synaptic and extra synaptic membranes of cerebellar granule cells*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(5), 1693–1703.
37. Pasantes-Morales, H. y Aréchiga, H. (1983). *Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas*. Universidad Nacional Autónoma de México. Cap. 1 y 3.
38. Punnakkal, P. von Shoultz, C., Haenraets, K. y Wildner, H. (2014). *Morphological, biophysical and synaptic properties of glutamatergic neurons of the mouse spinal dorsal horn*. *The Journal of physiology*, 592(4), 759-776.



39. Rexed, B. (1952). *The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat*. The Journal of Comparative Neurology, 96(3), 415–495.
40. Rodríguez-Palma, E., De la Luz-Cuellar, Y., Islas-Espinoza, A., Félix-Leyva, A., Shiers, S., García, G., Torres-Lopez, J., Delgado-Lezama, R., Murbartián, J., Price, T.J., y Granados-Soto, V. (2022). *Activation of  $\alpha 6$ -containing GABAA receptors induces antinociception under physiological and pathological conditions*. Pain.
41. Schmidt, R., Schmelz, M., Forster, C., Ringkamp, M., Torebjork, E., y Handwerker, H. (1995). *Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin*. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 15(1 Pt 1), 333–341.
42. Scholz, J., Finnerup, N., Attal, N., Aziz, Q., Baron, R., Bennett, M., Benoliel, R., Cohen, M., Cruccu, G., Davis, K., Evers, S., First, M., Giamberardino, M., Hansson, P., Kaasa, S., Korwisi, B., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Nurmikko, T. (2019). Classification Committee of the Neuropathic Pain Special Interest Group (NeuPSIG) *The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain*. Pain, 160(1), 53–59.
43. Seutin, V., y Johnson, S. (1999). *Recent advances in the pharmacology of quaternary salts of bicuculline*. Trends in pharmacological sciences, 20(7), 268–270.
44. Sieghart, W., Chiou, L., Ernst, M., Fabjan, J., Savić, M., y Lee, M. (2022).  *$\alpha 6$ -Containing GABA<sub>A</sub> Receptors: Functional Roles and Therapeutic Potentials*. Pharmacological reviews, 74(1), 238–270.
45. Sherrington, C. (1932). *Inhibition as a coordinative factor*. [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1932/sherrington-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1932/sherrington-lecture.html)
46. Sivilotti, L., y Woolf, C. (1994). *The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord*. Journal of neurophysiology, 72(1), 169–179.

47. Takazawa, T. y MacDermott, A. (2010). *Synaptic pathways and inhibitory gates in the spinal cord dorsal horn*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1198, 153–158.
48. Todd A. (2010). *Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn*. Nature reviews. Neuroscience, 11(12), 823–836.
49. Torsney, C. y MacDermott, A. (2006). *Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord*. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 26(6), 1833–1843.
50. Varju, P., Katarova, Z., Madarász, E., y Szabó, G. (2001). *GABA signalling during development: new data and old questions*. Cell and tissue research, 305(2), 239–246.
51. Woolf C. (1983). *Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity*. Nature, 306(5944), 686–688.
52. Woolf, C. y Doubell, T. (1994). *The pathophysiology of chronic pain--increased sensitivity to low threshold A beta-fibre inputs*. Current opinion in neurobiology, 4(4), 525–534.
53. Zeilhofer, H., Benke, D., y Yevenes, G. 2012. *Chronic pain states: Pharmacological strategies to restore diminished inhibitory spinal pain control*. Annual review of pharmacology and toxicology. Vol. 52:111-133
54. 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, 736879.