



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

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y  
NEUROCIENCIAS**

**“Papel del receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> en el dolor  
neuropático en un modelo de prediabetes en  
ratas macho”**

**T E S I S**

Que presenta

**MÉDICO CIRUJANO MAURICIO HERNÁNDEZ  
CONTRERAS**

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE  
NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**Director de la tesis:  
Dr. José Rodolfo Delgado Lezama**

Ciudad de México

Noviembre 2023

## CONTENIDO

CONTENIDO .....	1
AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT .....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Prediabetes.....	6
1.1.1 Definición.....	6
1.1.2 Epidemiología.....	6
1.1.3 Diagnostico.....	7
1.1.4 Fisiopatología de la prediabetes.....	7
1.2 Neuropatía diabética.....	9
1.3 El modelo de estreptozotocina.....	11
1.4 El dolor.....	12
1.4.1 Clasificación del dolor.....	13
1.4.2 Dolor neuropático.....	13
1.5 Las fibras aferentes primarias.....	15
1.6 Transmisión nociceptiva.....	16
1.7 El GABA y el receptor GABA <sub>A</sub> .....	17
1.7.1 Inhibición fásica y tónica.....	19
1.8 Pérdida de la inhibición GABAérgica espinal.....	20
1.9 El receptor $\alpha_5$ GABA <sub>A</sub> .....	21
1.10 Dimorfismo sexual del dolor.....	23
1.11 El reflejo de Hoffmann.....	24
1.11.1 DDF del reflejo H.....	26
1.12 Análisis de la locomoción y neuropatía diabética.....	28
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
3. HIPOTESIS.....	33
4. OBJETIVO GENERAL.....	33
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
6. METODOLOGIA.....	33
6.1 Modelo de prediabetes.....	33
6.2 Medición de peso corporal y glucosa capilar.....	33
6.3 Prueba de tolerancia a la glucosa oral.....	34

6.4 Determinación de la alodinia mecánica .....	34
6.5 Prueba del reflejo de Hoffmann .....	34
6.6 Efecto del L-655,708 en la alodinia táctil .....	35
6.7 Evaluación de la marcha .....	35
6.8 Análisis de resultados.....	36
7. RESULTADOS .....	38
7.1 Peso y nivel de glucosa el modelo de prediabetes .....	38
7.2 Alodinia mecánica .....	39
7.4 Evaluación de la marcha .....	40
7.5 La DDF del reflejo de Hoffman .....	45
8. DISCUSIÓN.....	48
8.1 Modelo de prediabetes .....	48
8.2 Las ratas prediabéticas presentan alodinia mecánica.....	49
8.3 Papel del receptor $\alpha_5$ GABA <sub>A</sub> en el dolor por prediabetes en ratas macho .....	49
8.4 Alteraciones de la locomoción en ratas prediabéticas .....	51
8.5 Efecto de la estimulación del reflejo H a alta corriente en ratas prediabéticas.....	52
9. CONCLUSIONES .....	54
10.PERSPECTIVAS .....	55
11. REFERENCIAS .....	56

## **AGRADECIMIENTOS**

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

Agradezco también el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) por la beca académica con CVU 936102.

Asimismo, agradezco a Guadalupe Raya Tafolla, por su apoyo y consejos en la parte experimental de esta tesis.

Al Dr. Vinicio Granados Soto y al Dr. Benjamín Floran Garduño por tomarse el tiempo de asesorarme.

Finalmente agradezco al Dr. José Rodolfo Delgado Lezama por permitirme formar parte de su laboratorio y por permitirme aprender de él.

## RESUMEN

Anteriormente se consideraba que la neuropatía diabética se desarrollaba en pacientes diabéticos después de muchos años de un control metabólico deficiente. Sin embargo, estudios recientes sugieren que los pacientes prediabéticos ya pueden presentar neuropatía diabética. El dolor neuropático es uno de los principales síntomas de esta afección. Resultados anteriores de nuestro laboratorio indican que el receptor extrasináptico  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> tiene un papel antinociceptivo en ratas hembras sanas y un papel pronociceptivo en ratas hembras con diabetes mellitus tipo 1. Además, se descubrió que la depresión dependiente de la frecuencia (DDF) del reflejo de Hoffman (RH) podría ser un biomarcador del dolor neuropático. Varias investigaciones actuales sugieren que existe un dimorfismo sexual en el procesamiento del dolor. Las alteraciones en la marcha también pueden ser un indicador de neuropatía diabética (DN), aunque este aspecto ha sido poco estudiado. A raíz de esto, decidimos investigar el papel del receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> en un modelo de rata macho con prediabetes. Para este propósito, se inyectó estreptozotocina (STZ) en ratas neonatales. Los valores de glucosa presentados en estos animales concordaban con un modelo de prediabetes. En las ratas prediabéticas que mostraron alodinia mecánica, la aplicación intratecal de L-655,708, un agonista inverso del receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>, produjo una disminución en la alodinia. Se observó el efecto opuesto en ratas sanas; el bloqueo del receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> provocó alodinia. Al evaluar la marcha, se encontró una disminución en la flexión del tobillo durante la fase de apoyo en comparación con las ratas control. Con respecto al RH, se encontró una pérdida de DDF solo cuando se estimulaba con corriente que evocaba el máximo RH. Nuestros hallazgos parecen indicar que, al menos parcialmente, el receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> tiene un papel pronociceptivo en ratas macho con dolor neuropático debido a la prediabetes. Además, la DDF de RH y la locomoción podrían usarse como marcadores tempranos del dolor neuropático diabético.

## ABSTRACT

Previously, it was believed that diabetic neuropathy developed in diabetic patients after many years of inadequate metabolic control. However, recent studies suggest that prediabetic patients may already exhibit diabetic neuropathy. Neuropathic pain is one of the main symptoms of this condition. Prior results from our laboratory indicate that the extrasynaptic  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> receptor plays an antinociceptive role in healthy female rats and a pronociceptive role in female rats with type 1 diabetes mellitus. Furthermore, it was discovered that frequency-dependent depression (FDD) of the Hoffmann reflex (RH) might be a biomarker for neuropathic pain. Current research suggests there is a sexual dimorphism in pain processing. Gait alterations can also be an indicator of diabetic neuropathy (DN), though this has been little studied. Based on this, we decided to investigate the role of the  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> receptor in a male rat model of prediabetes. For this purpose, streptozotocin (STZ) was injected into neonatal rats. The glucose levels displayed in these animals were consistent with a prediabetes model. In prediabetic rats that exhibited mechanical allodynia, the intrathecal application of L-655,708, an inverse agonist of the  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> receptor, resulted in a decrease in allodynia. The opposite effect was observed in healthy rats; blocking the  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> receptor induced allodynia. When assessing gait, a decrease in ankle flexion during the stance phase was found compared to control rats. Regarding RH, a loss of FDD was observed only when stimulated with a current that evoked the maximum RH. Our findings seem to suggest that, at least in part, the  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> receptor plays a pronociceptive role in male rats with neuropathic pain due to prediabetes. Additionally, FDD of RH and locomotion could be used as early markers of diabetic neuropathic pain.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Prediabetes**

#### **1.1.1 Definición**

De manera general se define como prediabetes al estado intermedio entre el metabolismo normal de la glucosa y la diabetes manifiesta, caracterizado por la presencia de glucosa alterada en ayuno y/o tolerancia a la glucosa alterada<sup>1-3</sup>. El término surgió debido a la necesidad de identificar a aquellos individuos cuyos niveles de glucosa no cumplen los criterios de diabetes, pero que están en riesgo de padecerla <sup>2,3</sup>. La prediabetes al igual que la diabetes mellitus tipo 2 está asociada estrechamente con la presencia de obesidad, dislipidemia e hipertensión arterial, por lo que se considera un componente importante del síndrome metabólico<sup>1,4</sup>.

#### **1.1.2 Epidemiología**

A pesar de ser una entidad clínica subdiagnosticada, se estima que hasta el 2012 existían 840 millones de personas con prediabetes a nivel mundial, de las cuales, se calcula que entre el 5 y el 10% desarrollará DMT2 en algún momento de su vida<sup>3,5</sup>. Sin embargo, en países industrializados como Estados Unidos este porcentaje puede llegar hasta un 70%<sup>3,5</sup>.

Por otro lado, estudios epidemiológicos que comparan la prevalencia de la glucosa alterada de ayuno y la tolerancia a la glucosa alterada demuestran que estos conceptos definen dos poblaciones distintas con un traslape parcial, ya que solo un pequeño porcentaje de individuos con glucosa alterada de ayuno presentan tolerancia a la glucosa alterada y viceversa (20-25% aproximadamente)<sup>3</sup>. Además, se ha reportado que hay una diferencia de prevalencia en cuanto a edad, sexo y raza entre ambos grupos, lo que ha sugerido que aunque la glucosa alterada en ayuno y la tolerancia a la glucosa alterada corresponden a etapas intermedias de disfunción pancreática son condiciones distintas con etiología y fisiopatología diferente<sup>3</sup>.

### 1.1.3 Diagnóstico

La Asociación Americana de Diabetes (American Diabetes Association: ADA) considera tres criterios como diagnósticos de prediabetes: glucosa alterada en ayuno (definida como los valores de glucosa entre 100 y 125 mg/dl posterior a un ayuno mínimo de 8 hrs.), tolerancia a la glucosa alterada (definida como los valores de glucosa entre 140 y 199 mg/dl dos horas posteriores a la administración de un bolo de 75g de glucosa en un paciente en ayuno), o HgbA1c entre 5.7 y 6.4%. La presencia de cualquiera de estos datos se considera como prediabetes<sup>1</sup>(Figura 1).

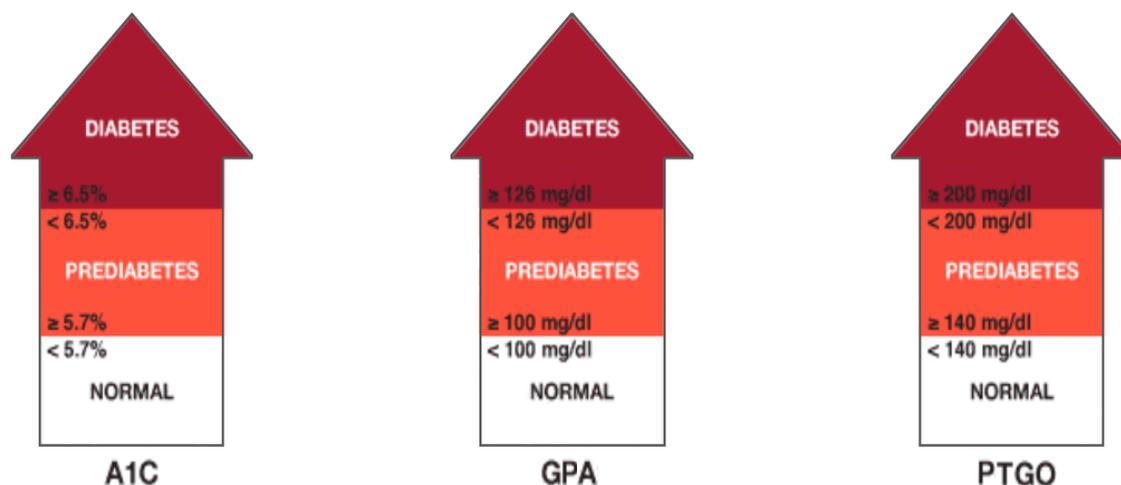


Figura 1. Criterios diagnósticos de prediabetes. Se muestran los criterios diagnósticos de normalidad, prediabetes y diabetes de la Asociación Americana de Diabetes, en las pruebas de Hgb A1c (A1C), glucosa plasmática de ayuno (GPA) y de prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO). Nótese que la prediabetes es un estado intermedio entre la normalidad y la diabetes mellitus. Modificado de <https://www.diabetes.org/a1c/diagnosis>

### 1.1.4 Fisiopatología de la prediabetes

La glucosa es la fuente principal de energía para el cuerpo humano, por lo que su homeostasis está fuertemente regulada por un conjunto de hormonas reguladoras y contrarreguladoras<sup>5</sup>. El metabolismo de la glucosa se compone de dos fases, una absorptiva o postprandial y otra postabsortiva o de ayuno<sup>6,7</sup>. En condiciones

fisiológicas, de manera postprandial (fase absorptiva) la glucosa ingerida se drena del intestino delgado por la vena mesentérica hacia la vena porta donde una parte es captada por el hígado para ser convertida en glucógeno o grasa<sup>8</sup>, la glucosa restante pasa a la circulación general donde el aumento en los niveles de glucosa plasmática induce la secreción de insulina por las células  $\beta$ -pancreáticas<sup>8,9</sup>. La combinación de hiperglucemia e hiperinsulinemia ocasiona la supresión de la producción de glucosa endógena y el aumento de la captación de glucosa por tejidos periféricos insulino-dependientes (músculo, tejido adiposo, vísceras) así como la inhibición de la lipólisis en los adipocitos, esto con el fin de evitar el aumento de la glucemia más allá de los niveles óptimos<sup>5,7-9</sup> (Figura 2A). Cuatro a seis horas posterior a la ingesta, el flujo de nutrientes desde el intestino cesa e inicia la fase postabsorptiva<sup>8</sup>. Al inicio de la fase postabsorptiva los niveles de glucosa descienden lo que da lugar a una disminución de los niveles de insulinemia y un aumento de las hormonas contrarreguladoras (glucagón, noradrenalina, cortisol) lo que permite que se pongan en marcha mecanismos para mantener las cifras de glucemia, como la disminución en el consumo de glucosa y la producción de glucosa endógena en el hígado por medio de la glucogenólisis y gluconeogénesis<sup>7,8</sup> (Figura 2B). En el ayuno la mayor captación de glucosa se da por tejidos insensibles a la insulina como el cerebro y los eritrocitos. En estos tejidos la captación está regulada por la concentración plasmática de glucosa. Por lo tanto, la glicemia en ayuno está dada principalmente por la tasa de liberación de glucosa hepática<sup>3,8,9</sup>.

Sin embargo, en los pacientes con prediabetes hay una disminución de la sensibilidad a la insulina por los tejidos. Esto quiere decir que, a las concentraciones estándar de insulina no se produce la misma respuesta y se presenta una hiperglucemia transitoria que desencadenará que las células  $\beta$ -pancreáticas secreten una mayor cantidad de insulina para compensar<sup>3,5</sup>. A este estado fisiopatológico se le conoce como resistencia a la insulina<sup>2-5</sup>. Aunque en un principio se puede mantener la euglucemia, con el paso del tiempo la función de las células  $\beta$ -pancreáticas disminuye debido al estrés prolongado, con el correspondiente aumento progresivo de las cifras de glucosa<sup>2,3,5</sup>. Además, se ha

demostrado, en modelos tanto animales como humanos, que un aumento ligero pero persistente de las cifras de glucosa plasmática puede tener un efecto nocivo sobre las células  $\beta$ -pancreáticas<sup>5</sup>.

Si bien tanto en pacientes con glucosa alterada de ayuno como tolerancia a la glucosa alterada se ha encontrado resistencia a la insulina con elevación plasmáticas de la misma, varios estudios han encontrado que el sitio de la resistencia varía en ambos trastornos<sup>2,3</sup>. Los sujetos con glucosa alterada de ayuno presentan resistencia a la insulina hepática con una sensibilidad a la insulina normal en músculo y tejido adiposo, mientras que aquellos con tolerancia a la glucosa alterada se caracterizan por sensibilidad a la glucosa normal o ligeramente disminuida en tejido hepático con resistencia a la insulina moderada a severa en tejidos periféricos<sup>3</sup>. Además, varios estudios sugieren que la resistencia a la insulina muscular es, al menos en parte, hereditaria y precede al desarrollo de diabetes mellitus más directamente que la hepática<sup>3,10,11</sup>.

## **1.2 Neuropatía diabética**

La neuropatía diabética es un trastorno complejo y con una gran prevalencia, siendo una de las principales causas de neuropatía periférica a nivel mundial y la primera causa de discapacidad en el paciente diabético<sup>12,13</sup>. Se caracteriza por ser bilateral, simétrica y afectar a los nervios periféricos en un gradiente de severidad de distal a proximal, siendo las extremidades inferiores comúnmente las más afectadas<sup>14,15</sup>. Si bien en un principio afecta principalmente las fibras sensoriales, conforme el daño avanza también puede producir alteraciones autonómicas y motoras<sup>12,14,15</sup>. Clínicamente esto se traduce en entumecimientos, hormigueo, pérdida de la sensibilidad, dolor neuropático, síntomas autonómicos como hipotensión postural, dificultad para deglutir, alteraciones gastrointestinales y disfunción eréctil. También es común que se presente inestabilidad de la marcha, sobre todo en la oscuridad o en terrenos irregulares<sup>12,14</sup>

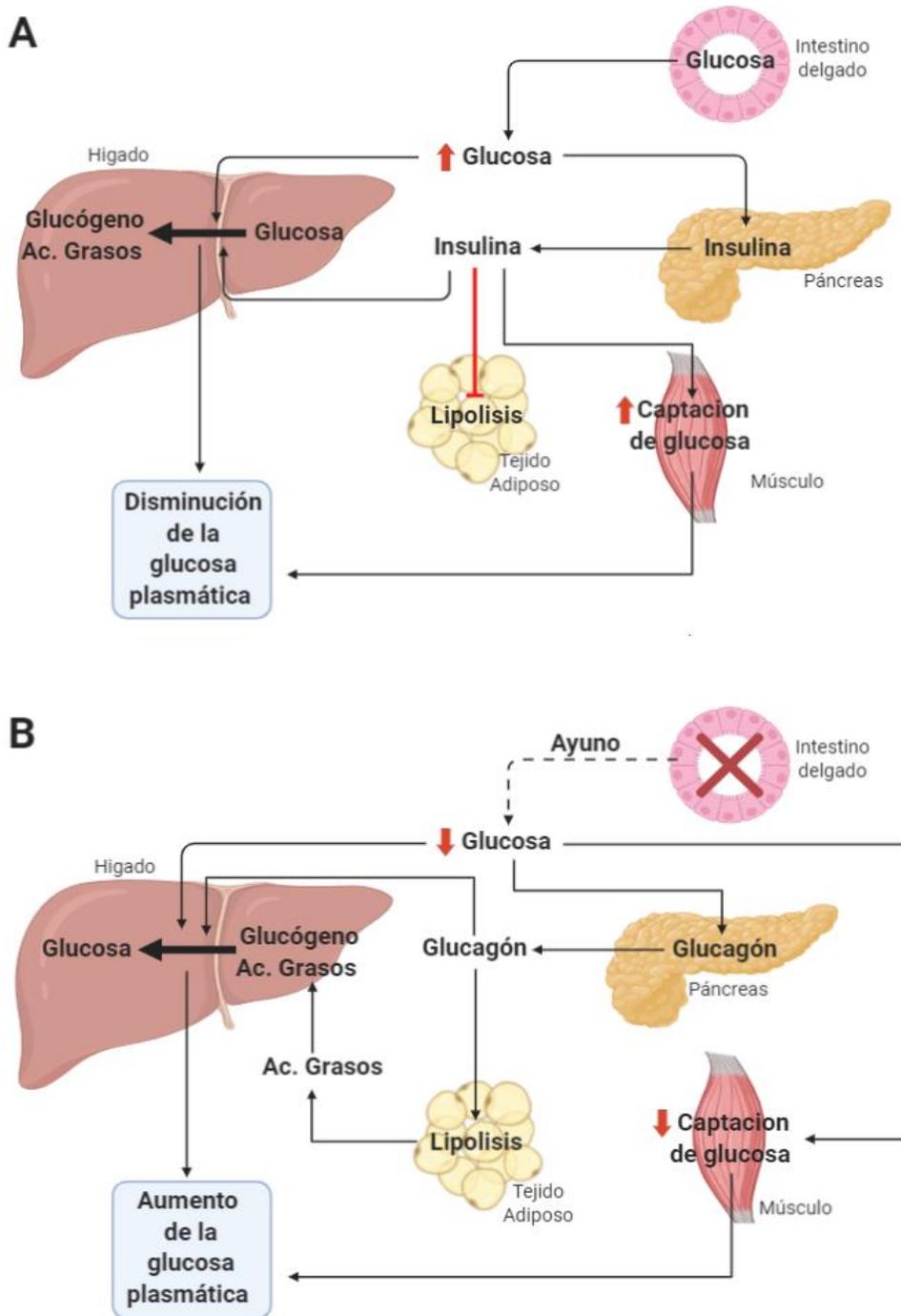


Figura 2. Metabolismo de la glucosa. Los niveles de glucosa se mantienen estables gracias a mecanismos de regulación que se ponen en marcha según sea necesario. (A) Fase postprandial, posterior a la ingesta, el aumento en los niveles de glucosa plasmática favorece la captación de ésta, así como su utilización y almacenaje. (B) Fase de ayuno, cuando el aporte de glucosa intestinal cesa se produce una disminución de la glucosa plasmática que echa a andar mecanismos para la producción de glucosa endógena y la disminución de su captación por tejidos periféricos. Imagen creada con BioRender.com

Por mucho tiempo se creyó que la neuropatía diabética era un proceso que se desarrollaba en el paciente diabético tras muchos años de un pobre control metabólico, sin embargo, varios reportes indican que esto no es así. Por ejemplo, hasta un 10% de los pacientes con diabetes mellitus presentan neuropatía periférica al momento del diagnóstico. Además varios estudios han encontrado que los pacientes con glucosa alterada de ayuno o tolerancia a la glucosa alterada tienen una mayor probabilidad de presentar neuropatía periférica en comparación con las personas sanas, lo que sugiere que el daño neuronal se presenta antes del establecimiento de la diabetes<sup>16-18</sup>.

El mecanismo fisiopatológico por medio del cual se produce este daño de los nervios periféricos es múltiple, siendo los factores principales las alteraciones microvasculares, la acumulación de productos de la glicosilación avanzada, la activación de las vías del poliol, la toxicidad por exceso de glucosa y ácidos grasos, así como cambios en el soporte trófico<sup>13,19,20</sup>. La presencia de resistencia a la insulina parece ser de especial importancia en el desarrollo del daño neuropático en el paciente prediabético y con DMT2 de reciente inicio. Esto explica al menos en parte, por ejemplo, que se haya encontrado evidencia de neuropatía en sujetos con otros componentes del síndrome metabólico como obesidad y dislipidemia, así como el hecho de que en los pacientes con DMT1, el control agresivo de las cifras de glucosa detiene la progresión de la neuropatía diabética, mientras que en los pacientes con DMT2 esto no ocurre<sup>12,13,20-23</sup>.

### **1.3 El modelo de estreptozotocina**

Debido a que la diabetes mellitus es un problema de salud pública a nivel mundial se han desarrollado múltiples modelos para tratar de mimetizar algunas características de la enfermedad. La estreptozotocina es ampliamente utilizada con este fin debido a su menor costo, mayor disponibilidad, y más facilidad para inducir diabetes que con los modelos genéticos<sup>24</sup>.

La estreptozotocina es un fármaco inestable, fotosensible, y con una vida media de 15 minutos aproximadamente<sup>25,26</sup>. Es común que se administre por vía intraperitoneal (i.p.)<sup>25,26</sup>. Se trata de un análogo citotóxico de la glucosa, que daña

de manera selectiva a las células  $\beta$ -pancreáticas debido a que ingresa a la célula por medio del transportador GLUT2 el cual se expresa de manera abundante en estas células<sup>25</sup>(Figura 3).

La administración de streptozotocina en animales adultos induce una destrucción pancreática extensa que dará lugar a una hiperglucemia severa como la que se produce en la DMT1. Sin embargo, su administración en la etapa neonatal produce un modelo con características similares a las que se presentan en la DMT2, como es tolerancia anormal a la glucosa, hipoinsulinemia moderada e hiperglucemia leve a moderada. Esta última, se establece de manera insidiosa y generalmente se pone de manifiesto durante la etapa adulta. Además, hay estudios que proponen que la administración de streptozotocina en la etapa neonatal puede inducir resistencia a la insulina secundaria a hiperglucemia crónica<sup>25-27</sup>.

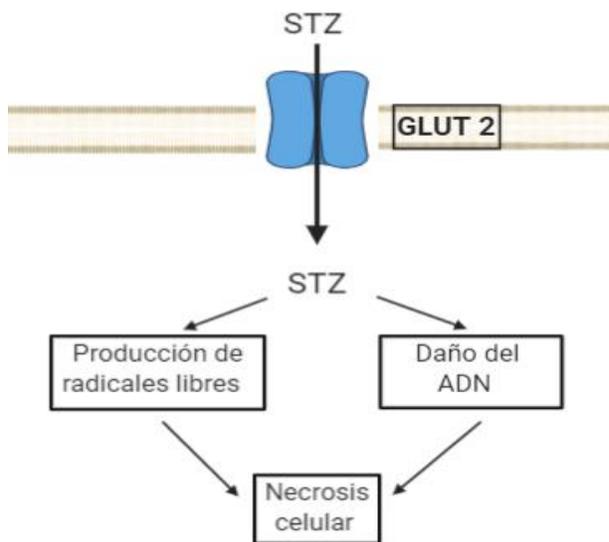


Figura 3. Mecanismo de acción de la Streptozotocina (STZ). La STZ ingresa a las células por medio del transportador de glucosa GLUT 2, el cual se expresa de manera importante en las células  $\beta$ -pancreáticas, una vez dentro induce la muerte celular por medio de la producción de radicales libres y daño al ADN.

#### 1.4 El dolor

El dolor está definido por la Asociación Internacional Para el Estudio del Dolor (International Association for the Study of Pain, IASP) como “Una vivencia sensitiva y emocional desagradable asociada, o semejante a ésta, con una lesión tisular real o potencial.”<sup>28</sup>.

### **1.4.1 Clasificación del dolor**

Con base en su duración el dolor se puede clasificar en agudo y crónico. El dolor agudo es aquel que tiene corta duración (menor a 3 meses) y generalmente tiene un propósito adaptativo<sup>28,29</sup>. El dolor crónico por su parte es un dolor de larga evolución (más de 3 meses) que dura más allá de la fase de curación de la herida y que suele no tener un origen fácilmente identificable<sup>28-30</sup>.

Otra forma de clasificar el dolor es en base a su etiopatogenia. Aquí se distinguen tres tipos de dolor, el nociceptivo, el inflamatorio y el neuropático<sup>30,31</sup>(Figura 4). El dolor nociceptivo se produce por la activación de receptores sensoriales por estímulos nocivos o potencialmente dañinos y su función es alertar al individuo con el fin de producir una acción de retirada<sup>28,30</sup>(Figura 4A). El dolor inflamatorio por su parte, como su nombre lo indica, está mediado por la activación del sistema inmune en un tejido lesionado y su fin es prevenir un daño mayor y promover la recuperación, suele estar acompañado de hipersensibilidad<sup>30</sup>(Figura 4B). Por último, tenemos al dolor neuropático, del cual hablaremos ampliamente a continuación debido a su relevancia para el trabajo actual.

### **1.4.2 Dolor neuropático**

El dolor neuropático se refiere al dolor causado por una lesión o enfermedad del sistema nervioso somatosensorial (Figura 4C). Junto con el dolor por osteoartritis corresponden a las dos causas más comunes de dolor crónico<sup>30,32,33</sup>. Se ha estimado que el dolor crónico puede llegar a afectar hasta a un sexto de la población<sup>33</sup>.

El cuadro clínico del dolor neuropático se caracteriza por dolor generalizado que no se puede explicar por otra causa (lesión, inflamación), se presenta ardor (urente), hiperalgesia (dolor exacerbado ante estímulos dolorosos), alodinia (dolor producido por estímulos inocuos) y ataques de dolor sin causa aparente (dolor paroxístico)<sup>32,33</sup>.

No se sabe porque no todos los individuos con lesión del sistema nervioso periférico desarrollan dolor neuropático. Sin embargo, se sabe que dentro de la

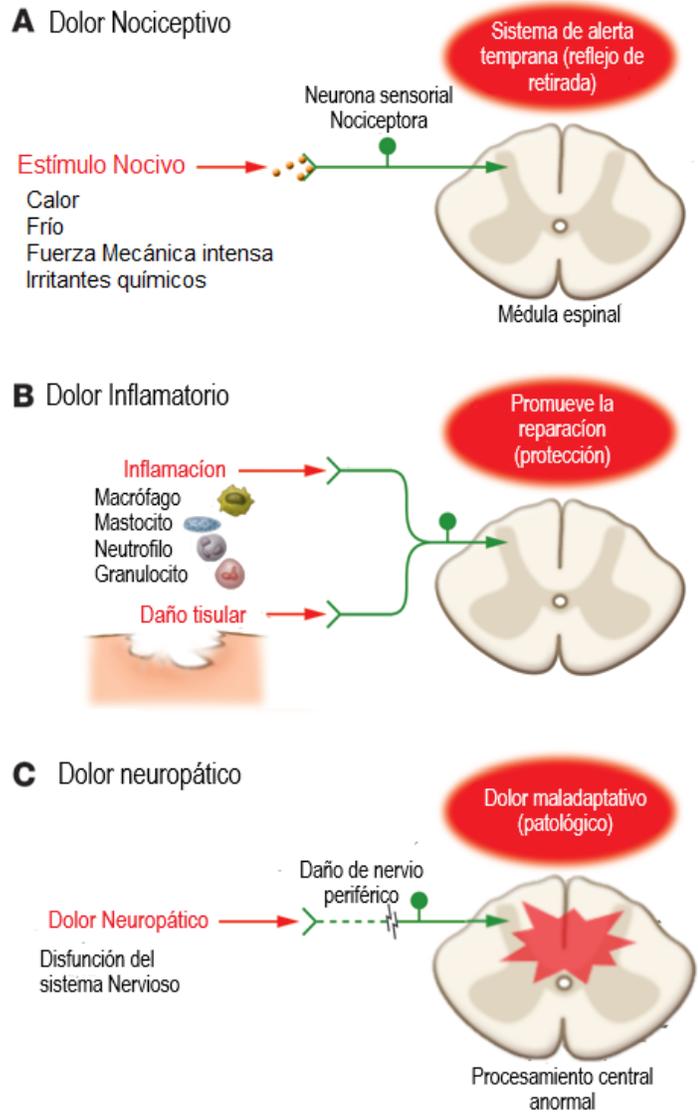


Figura 4. Clasificación del dolor. Con base en su etiopatogenia el dolor se puede clasificar en tres grandes grupos. (A) Dolor nociceptivo, se produce por un estímulo intenso y su función es de protección. (B) Dolor inflamatorio, se produce por activación del sistema inmune y favorece la reparación del tejido. (C) Dolor neuropático, se produce por el mal funcionamiento en las vías del dolor a nivel periférico o central, es un dolor patológico. Modificada de Clifford 2010.

fisiopatología del dolor neuropático es común que se produzcan alteraciones en varios sitios a lo largo del neuro eje del dolor<sup>32</sup>. Estos cambios en última instancia darán lugar a tres grandes alteraciones que constituyen la etiopatogenia del dolor

neuropático: el aumento de la sensibilidad nociceptiva, la producción de actividad neural ectópica aberrante y la pérdida de la inhibición espinal GABAérgica<sup>33-35</sup>.

### **1.5 Las fibras aferentes primarias**

Las fibras aferentes primarias son aquellas que transmiten información somatosensorial y propioceptiva y sus somas están localizados en el ganglio de la raíz dorsal (GRD) o en el ganglio del trigémino. Tienen una morfología pseudounipolar con una rama central que se conecta con la médula espinal o el tronco encefálico y una rama periférica, estas terminales nerviosas pueden ser libres como las que registran dolor y la temperatura o encapsuladas en ciertos tejidos, como las que registran el tacto o la propiocepción<sup>36,37</sup>. Las fibras aferentes primarias tienen dos funciones principales, la transducción de estímulos en señales eléctricas, y la transmisión de los mismos al asta dorsal de la médula espinal<sup>36</sup>.

La sustancia gris de la médula espinal está organizada anatómica y funcionalmente en regiones conocidas como láminas de Rexed. El asta dorsal corresponde a las láminas I a V. La lamina I está constituida principalmente por neuronas de proyección, la lámina II por interneuronas y de la III a la V por una combinación de las anteriores<sup>38,39</sup>. La lámina II a su vez se divide en porción interna y externa. Esto es importante ya que con base en su modalidad sensorial las fibras aferentes primarias hacen sinapsis en diferentes láminas de Rexed<sup>38</sup> (Figura 5).

#### **1.5.1 Clasificación de las fibras aferentes primarias**

Las FAP se clasifican de varias formas. Por ejemplo, con base en su adaptación (lenta o rápida), si registran estímulos internos o externos (interoceptivas o exteroceptivas), entre otros<sup>36,40</sup>. Sin embargo, la clasificación más común es la que está dada en relación a la velocidad de conducción y morfología de la fibra y que detallamos a continuación.

**Fibras A $\alpha$ / $\beta$  o tipo I y II:** son las fibras aferentes más grandes y mielinizadas, tienen la mayor velocidad de conducción (en el humano es de 35 hasta 120 m/s) y están relacionadas con la propiocepción, el tacto fino discriminativo y la

sensibilidad a la presión no nociceptiva<sup>36,39,40</sup>. Hacen sinapsis principalmente en las láminas III-V del asta dorsal<sup>38,39</sup>.

**Fibras A $\delta$  o tipo III:** tienen un diámetro menor que las fibras A $\alpha$ / $\beta$ , están mielinizadas aunque en menor proporción que las anteriores, su velocidad de conducción promedio es de 5 a 30 m/s y están implicadas en la sensibilidad a la temperatura y la transmisión de estímulos nociceptivos, sobre todo aquellos de tipo agudo y punzante<sup>36,39,40</sup>. Finalmente estas neuronas hacen sinapsis en las láminas I y II de Rexed<sup>38,39</sup>.

**Fibras C o tipo IV:** son las fibras aferentes de menor diámetro, no están mielinizadas por lo que su velocidad de conducción es lenta (0.5-2 m/s)<sup>40</sup>. Actualmente se acepta que las hay de dos tipos, las de bajo umbral (LTM por sus siglas en inglés), que se relacionan con el tacto placentero y las de alto umbral (HTM por sus siglas en inglés), que están implicadas en la nocicepción y su activación desencadena un dolor que puede perdurar en el tiempo<sup>40</sup>. Las HTM presentan algunas características que son importantes de resaltar, y que les permiten llevar a cabo su función. Por ejemplo, a diferencia de otras fibras que responden a estímulos bien definidos éstas suelen ser *polimodales*. Es decir, estas fibras responden a una gran cantidad de estímulos tanto físicos como químicos. Además, las HTM suelen contener sustancia P y CGRP que son péptidos que pueden desencadenar respuestas relacionadas con la inflamación<sup>40</sup>. Las fibras LTM hacen sinapsis en la lámina II mientras que las fibras HTM hacen sinapsis en las láminas I y II externa de Rexed<sup>38</sup>.

## 1.6 Transmisión nociceptiva

Como ya hemos especificado anteriormente, el proceso nociceptivo inicia con la transducción de estímulos sensoriales en las terminales libres<sup>36</sup>. Posteriormente la información nociceptiva se transmite al asta dorsal de la médula espinal. El asta dorsal no es una simple estación de relevo para los impulsos aferentes, la información entrante es procesada y regulada circuitos de interneuronas donde la inhibición GABAérgica juega un papel importante (de esto último hablaremos más adelante)<sup>38,39</sup>. Después, la información se conduce a través de neuronas de

proyección a varias estructuras supra espinales como la sustancia gris periacueductal, la médula rostro medial, el tálamo y la corteza cerebral, entre otras<sup>36,38,39</sup>. Es importante destacar que las neuronas de proyección nociceptivas se encuentran primordialmente en la lámina I y expresan el receptor de neurocinina 1 (NK1R) para sustancia P. Este neuropéptido es sintetizado y liberado por las fibras aferentes nociceptivas<sup>38,39</sup> (Figura 5).

### 1.7 El GABA y el receptor GABA<sub>A</sub>

El GABA es el neurotransmisor inhibitor más importante en el sistema nervioso central y periférico. Su acción está mediada por tres receptores, dos ionotrópicos (GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>) y uno metabotrópico (GABA<sub>B</sub>)<sup>41</sup>. El receptor GABA<sub>A</sub> pertenece a la familia de canales cys-loop activados por ligando y está constituido por cinco subunidades que forman un canal central selectivo a iones cloruro y bicarbonato<sup>41-43</sup>. Ignorando las variaciones de *splicing* y mutaciones puntuales, en el sistema nervioso central de los mamíferos se han clonado 19 subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>: seis subunidades  $\alpha$ , tres subunidades  $\beta$ , tres subunidades  $\gamma$ , tres  $\rho$  y una subunidad  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\epsilon$ , y  $\pi$  respectivamente<sup>41,43</sup>. Con estas subunidades se podría generar una inmensa cantidad de receptores diferentes. Sin embargo, no todas las combinaciones son posibles. Actualmente solo se ha identificado la expresión de 12 receptores GABA<sub>A</sub><sup>43</sup>. La estequiometría más común es la formada por dos subunidades  $\alpha$ , dos  $\beta$ , y una  $\gamma$ , que puede ser sustituida por las subunidades  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\epsilon$ , y  $\pi$ , siendo la isoforma  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  la más ampliamente distribuida<sup>41</sup> (Figura 6). El receptor GABA<sub>A</sub> suele tener diferentes propiedades en función de las subunidades que lo componen. Por ejemplo, la subunidad  $\alpha$  suele ser importante en la afinidad del receptor por el GABA, las subunidades  $\gamma$  se han implicado en la formación de “clusters” sinápticos, y la subunidad  $\delta$  parece ser exclusiva de los receptores extrasinápticos<sup>44</sup>. Estas características son las que hacen que el receptor GABA<sub>A</sub> pueda mediar dos tipos de inhibición, la fásica y la tónica<sup>42</sup>

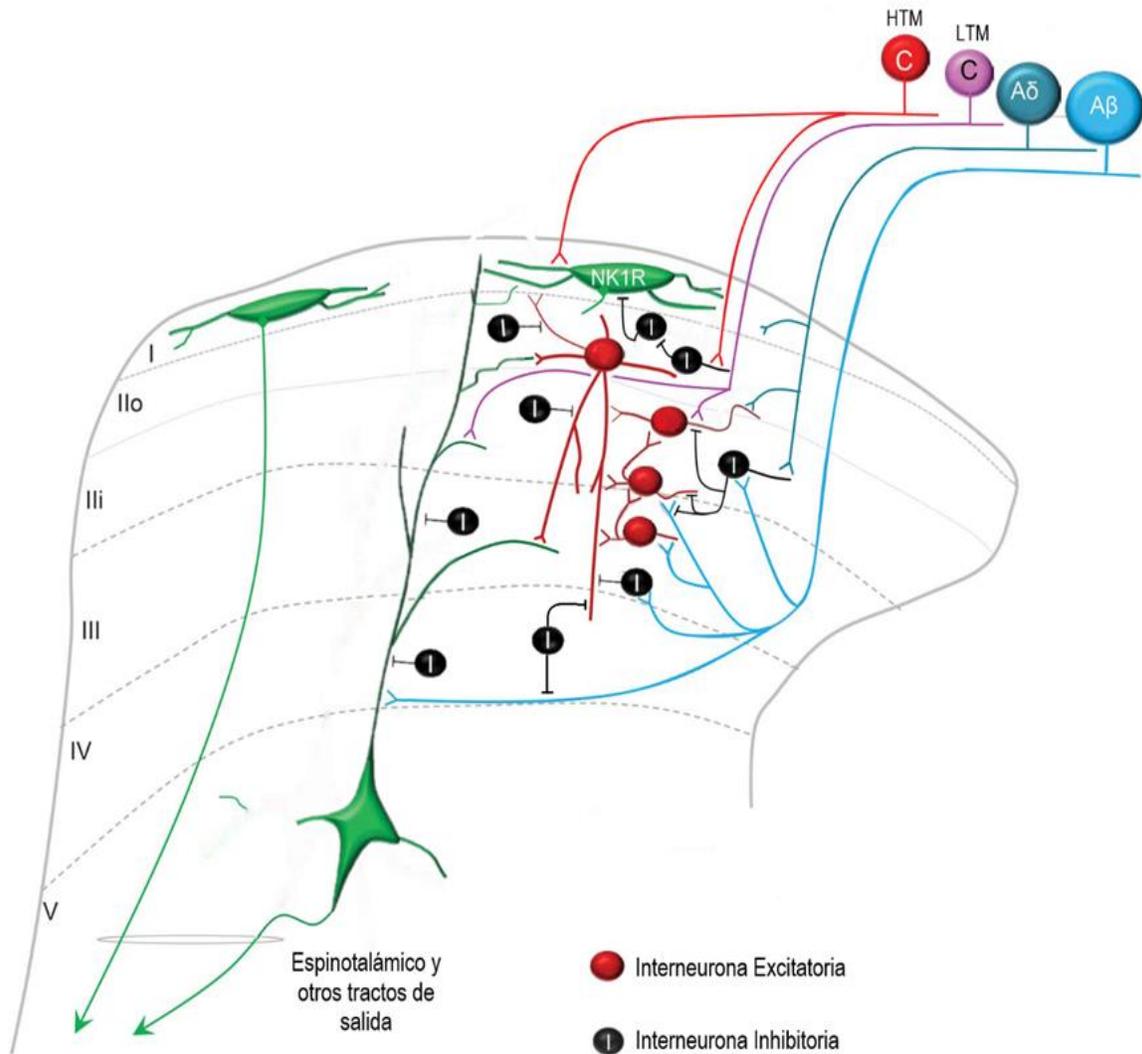


Figura 5. Las fibras aferentes primarias hacen sinapsis en las láminas I-V de la asta dorsal de la médula espinal. Nótese que la información proveniente de las fibras aferentes primarias se transmite de manera monosináptica o polisináptica hacia las neuronas de proyección (verdes) que transmiten la información de dolor por el tracto espino talámico de salida. Las neuronas de proyección nociceptiva suelen estar ubicadas principalmente en la lámina I y expresan el receptor NK1. Además, existe una red de interneuronas inhibitoria (negro) y excitadoras (rojo) que modulan la información entrante. Las fibras aferentes primarias tipo C de alto umbral (HTM) hacen contacto monosináptico con las neuronas de proyección, las tipo C de bajo umbral (LTM) hacen sinapsis con interneuronas de la lámina II externa (IIo) y II interna (IIi). Modificado de Benarroch 2016.

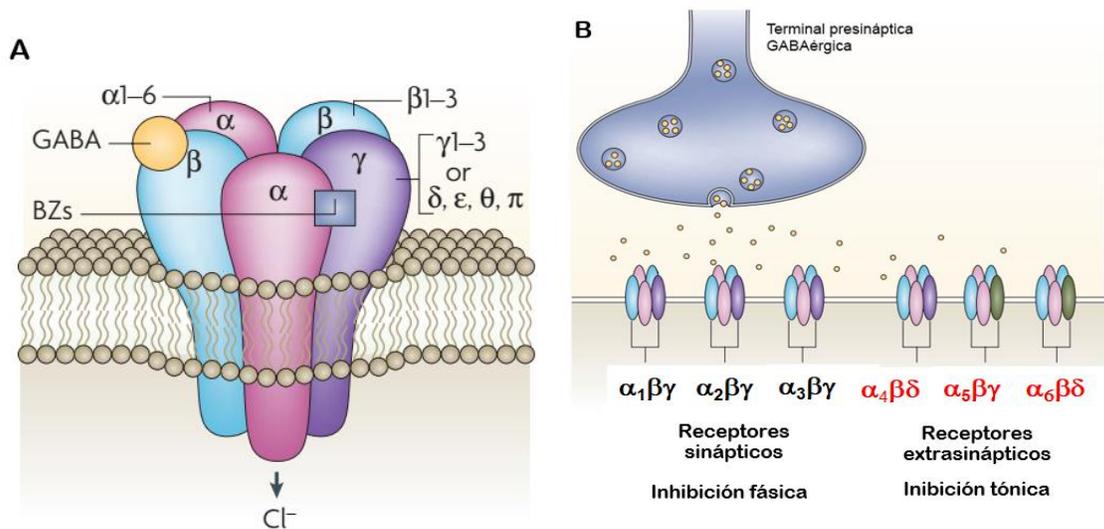


Figura 6. El receptor GABA<sub>A</sub>. (A) Subunidades que conforman al receptor GABA<sub>A</sub>. Para que el receptor sea funcional se necesita que cuente con una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$  donde se une el GABA. Algunos receptores cuentan con sitio de unión a las benzodiazepinas (BZs) localizado entre las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$ . (B) receptores sinápticos y extrasinápticos. Los receptores sinápticos y extrasinápticos se conforman de diferentes subunidades alfa y producen diferentes tipos de inhibición, fásica en el caso de los sinápticos y tónica producida por los extrasinápticos. Modificada de Jacob 2008.

### 1.7.1 Inhibición fásica y tónica

La función principal del GABA en el sistema nervioso central maduro es la inhibición de la actividad neural, esto se logra por medio de la hiperpolarización de las membranas neuronales secundaria a un influjo de iones cloruro<sup>42</sup>. Durante muchos años se creyó que este proceso se llevaba a cabo exclusivamente en las sinapsis y de manera transitoria. Sin embargo, actualmente hay evidencia de que existen dos tipos de inhibición GABAérgica: la fásica y la tónica.

**Inhibición sináptica o fásica:** como su nombre lo indica este tipo de inhibición es exclusiva de las sinapsis. Cuando un potencial de acción arriba a una terminal GABAérgica un influjo local de calcio permite el acople y unión de las vesículas sinápticas con la membrana presináptica. De esta forma, se produce una liberación rápida y masiva de neurotransmisor, lo que genera un pico de

concentración de GABA en la hendidura sináptica que puede llegar al rango de milimolar. Justo frente al sitio de liberación, en la membrana postsináptica, existen *clústers* de receptores GABA<sub>A</sub> que se activan de manera sincronizada ante este estímulo, permitiendo un influjo importante de cloruro, con la consecuente hiperpolarización de la membrana plasmática<sup>42</sup>. Estos receptores de la membrana postsináptica se inactivan rápidamente y se desensibilizan en presencia de GABA, lo que se previene por la recaptura rápida del GABA del espacio sináptico, lo que hace que la hiperpolarización sea breve pero de gran amplitud<sup>42</sup>. Estos receptores están conformados principalmente por las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  en combinación con dos  $\beta$  y una  $\gamma$ <sup>41,42</sup>.

**Inhibición Tónica:** no solo existen receptores GABA<sub>A</sub> agrupados en *clusters* en la membrana postsináptica, también se les puede encontrar de manera difusa a lo largo de toda la membrana neuronal. Estos receptores “dispersos” presentan propiedades especiales, como por ejemplo una mayor afinidad por GABA, una CE<sub>50</sub> diez veces mayor que la de los sinápticos, una inactivación muy lenta y poca o nula desensibilización<sup>21,42</sup>. Estos receptores están conformados principalmente por las subunidades  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$  en combinación con dos  $\beta$  y una  $\gamma$ , que puede ser sustituida por una subunidad  $\delta$ <sup>42,43</sup>.

### 1.8 Pérdida de la inhibición GABAérgica espinal

Melzack y Wall (1969) fueron quienes propusieron por primera vez que la estimulación sensorial puede ser modulada por circuitos inhibitorios que modifican la intensidad del mensaje que se recibirá e interpretará en el cerebro<sup>45</sup>. En la médula espinal esta inhibición está dada principalmente por interneuronas GABAérgicas y glicinérgicas, las cuales juegan un papel fundamental en la regulación de los procesos sensoriales<sup>46</sup>.

Múltiples estudios han mostrado que el bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> produce una disminución del umbral nociceptivo en animales sanos<sup>35,46,47</sup>. Esta disminución es semejante a la que se presenta en modelos de dolor neuropático, lo que llevó a concluir que la desinhibición GABAérgicas es un componente importante de la fisiopatología de este tipo de dolor<sup>48,49</sup>. La pérdida de neuronas

inhibitorias, incremento de la liberación de GABA y el deterioro de la actividad del receptor GABA<sub>A</sub> han sido propuestos como mecanismos subyacentes a esta pérdida de la inhibición<sup>46</sup>. Sin embargo, un estudio demostró que la lesión de nervios periféricos cambia la acción del GABA de inhibidora a excitadora por activación de los receptores GABA<sub>A</sub><sup>50</sup>. Más aún, Calcutt encontró que ratas con neuropatía diabética dolorosa presentaban niveles elevados de GABA a nivel de la médula espinal y que el bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> con bicuculina producía analgesia en estos animales<sup>49,51</sup>. Estos resultados aparentemente contradictorios llevaron a pensar que la respuesta debía estar en un cambio de la función del receptor GABA<sub>A</sub>. Posteriormente, Coull (2003) encontró que el dolor neuropático se relacionaba con una disminución de la expresión del transportador KCC2 secundario a la liberación de BDNF por la microglía activada<sup>34,52</sup>. El cotransportador KCC2 juega un papel fundamental para el mantenimiento de la inhibición espinal. Este transportador mantiene las concentraciones de cloruro intracelular bajas, lo que permite que en las neuronas del asta dorsal el potencial de equilibrio del cloruro llegue a -70 mV<sup>33,46</sup> (Figura 7A). De modo que al activarse los receptores GABA<sub>A</sub> producen un influjo de cloruro que hiperpolariza la membrana neuronal<sup>33</sup>. Ante la lesión de un nervio periférico se produce la liberación de BDNF por parte de la microglía activada. Este BDNF al unirse a su receptor TrkB, expresado en las neuronas del asta dorsal, produce una disminución de la expresión del KCC2, lo que ocasiona que haya una acumulación de iones cloruro al interior celular con la subsecuente despolarización del potencial de equilibrio de este ion<sup>34,52</sup>. Por lo tanto, al activarse los receptores GABA<sub>A</sub> el cloruro sale de la neurona, despolarizándola<sup>29,53</sup> (Figura 7). Esto explica porque el bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> produce antinocicepción en animales con neuropatía.

### **1.9 El receptor $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>**

El receptor GABA que contiene a la subunidad  $\alpha_5$  es un receptor extrasináptico que se expresa de manera importante en las fibras aferentes primarias, en el ganglio de la raíz dorsal (tanto en neuronas peptidérgicas como no peptidérgicas) y en las interneuronas del asta dorsal de la médula espinal, donde se procesa la

información nociceptiva<sup>53,54</sup>. Es uno de los receptores principales implicados en la inhibición tónica en la médula espinal<sup>53,55</sup>. Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que el bloqueo de este receptor con el agonista inverso L-655708 produce alodinia en ratas sanas, mientras que en ratas alodínicas por ligadura de los nervios L5 y L6, DMT1 e inflamación crónica produce analgesia, por lo que se puede concluir que este receptor juega un papel importante en la nocicepción<sup>54,55</sup>.

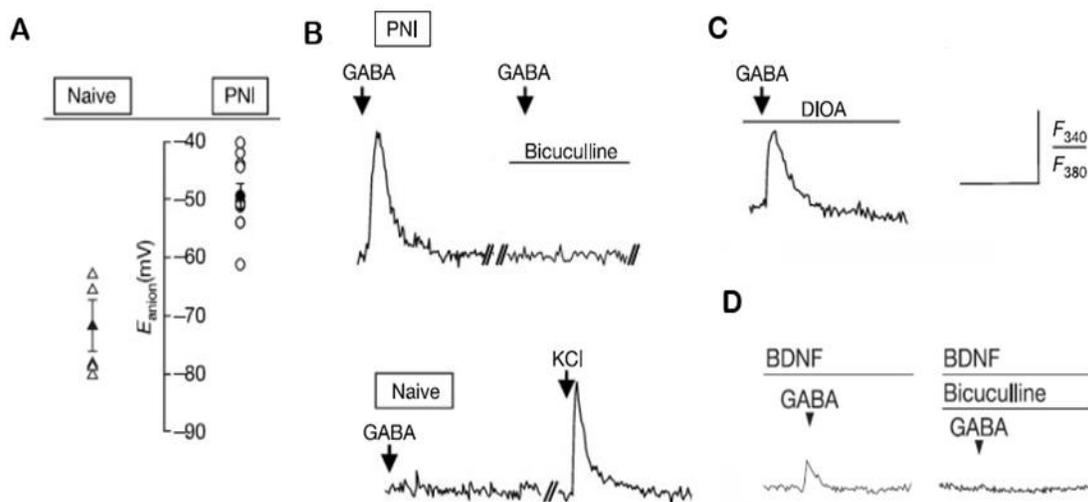


Figura 7. Pérdida de la inhibición espinal GABAérgica en el dolor neuropático. (A) Despolarización del potencial de equilibrio aniónico medido en neuronas de rebanadas de ratas con dolor neuropático inducido por la lesión de un nervio periférico. Se muestran los valores del potencial de equilibrio aniónico en el neuronas de las láminas I-II del asta dorsal de la médula espinal de ratas “naive” (triángulos abiertos) y con lesión del nervio periférico (*PNI por sus siglas en inglés*) (círculos abiertos), el triángulo y el círculo oscuro representan la media  $\pm$  SEM de las ratas “Naive” y PNI respectivamente. (B-D) Trazos representativos de la medición de  $[Ca^{2+}]_i$  en neuronas de la lamina I del asta dorsal. Cuando el GABA ejerce una influencia excitadora evoca potenciales de acción lo que se ve como un aumento del  $[Ca^{2+}]_i$ . (B) En ratas con PNI el GABA produce un aumento del  $[Ca^{2+}]_i$  el cual es sensible a bicuculina, esto no ocurre en ratas “Naive” (se agregó KCl para asegurarse de que la neurona estuviera viable y pudiera evocar potenciales de acción). (C) La aplicación de DIOA un bloqueador del KCC2 tiene el mismo efecto que la lesión del nervio periférico. (D) El BDNF también produce el aumento del  $[Ca^{2+}]_i$  tras la aplicación de GABA el cual es sensible a bicuculina. Tomado de Coull 2003 y 2005.

### **1.10 Dimorfismo sexual del dolor**

En 2011 Sorge y Mogil investigaron la importancia del sistema inmune innato en el dolor crónico, más en específico el papel del receptor TLR4 expresado en la microglía. Inyectaron el lipopolisacárido de manera intratecal en ratones macho y hembra<sup>56</sup>. Esto era algo inusual, ya que convencionalmente los investigadores utilizan solo animales de laboratorio del sexo masculino debido al problema de que los ciclos hormonales de las hembras puedan alterar los resultados<sup>57</sup>. Sorge y Mogil encontraron que en los machos la inyección de lipopolisacárido producía alodinia mecánica, mientras que en las hembras no se presentaban cambios en la nocicepción. Esto los hizo pensar que en las hembras debía existir una vía independiente de la microglía para el procesamiento del dolor<sup>56</sup>. Investigaciones posteriores mostraron que, en efecto, mientras que en el sexo masculino la activación de la microglía está implicada en el desarrollo de la hipersensibilidad al dolor, en el sexo femenino son las células inmunes adaptativas, posiblemente los linfocitos T, las que median este proceso<sup>58,59</sup>. Si bien actualmente todavía están en estudio los mecanismos por los cuales los linfocitos T producen hipersensibilidad al dolor, se sabe que, en última instancia, al igual que la microglía, provocan una disminución de la expresión del transportador KCC2<sup>59,60</sup>.

Este dimorfismo sexual en el procesamiento del dolor aparentemente está inducido por hormonas sexuales como los estrógenos y la testosterona. Alteraciones en los niveles hormonales, o deficiencias de la inmunidad celular pueden condicionar cambios en las vías neuro-inmunológicas del dolor. Por ejemplo, ratones macho que fueron sometidos a una castración con el fin de depletar sus niveles de testosterona adoptaron una respuesta al dolor similar a la que se observa en las hembras, mientras que las hembras que carecen de células T o que están embarazadas pueden cambiar a una vía dependiente de la microglía<sup>56-59</sup>. Además, las ratas hembra ovariectomizadas desarrollan una mayor hipersensibilidad cuando se les administra reserpina para inducir nocicepción en comparación con hembras intactas<sup>61</sup>.

Sin embargo, no todo se reduce a cambios hormonales o de la respuesta inmune. Un estudio clínico llevado a cabo por la universidad de Carolina del Norte encontró que en mujeres con dolor musculoesquelético crónico secundario a un accidente automovilístico se presentaba un aumento del ARNm proveniente del cromosoma X<sup>62</sup>. Un análisis posterior mostró que este material genético parece provenir de genes relacionados con la plasticidad neuronal<sup>62</sup>. Esto podría explicar por qué las mujeres son más propensas a desarrollar dolor crónico, ya que como sabemos las mujeres tienen dos copias del cromosoma (XX) mientras que los hombres solo tienen una (XY).

Desde un punto de vista práctico, el conocer estos cambios en la fisiopatología del dolor es fundamental para el desarrollo de tratamientos personalizados. Por ejemplo, se ha visto que usualmente las mujeres requieren dosis más altas de morfina para alcanzar el mismo grado de analgesia que los hombres<sup>57</sup>. Además, un estudio encontró que la metformina disminuye la hipersensibilidad nociceptiva secundaria a daño nervioso en ratones macho, mientras que en las hembras no tiene efecto<sup>57,63</sup>.

### **1.11 El reflejo de Hoffmann**

Se conoce como reflejo H o de Hoffmann (RH) al análogo electrofisiológico del reflejo miotático o de estiramiento<sup>64-66</sup>. Es evocado por la estimulación eléctrica de las fibras aferentes la que da como resultado la excitación monosináptica de las motoneuronas  $\alpha$ <sup>66</sup>, lo que permite evaluar la excitabilidad de los componentes neurales del arco reflejo de manera independiente a la sensibilidad de los receptores sensoriales musculares<sup>64</sup>. Es uno de los reflejos más estudiados en neurofisiología debido a que se puede evocar en una gran cantidad de músculos de manera sencilla y poco traumática, tanto en humanos como en modelos animales<sup>46,64</sup>.

Para producir el reflejo H se estimula de manera percutánea un nervio mixto (sensorial y motor) y por medio de un electrodo de registro se mide la respuesta electromiográfica del músculo homónimo<sup>46,65,66</sup>. Las fibras la tienen el umbral de activación más bajo de todas las fibras que componen el sistema nervioso

periférico<sup>36</sup>, de modo que la estimulación del nervio por encima del umbral de activación de las fibras motoras producirá dos respuestas<sup>66</sup>, una de corta latencia debida a la activación directa de los axones de las motoneuronas por el estímulo eléctrico, denominada onda M y una respuesta de latencia más prolongada debida a la activación monosináptica y polisináptica de las motoneuronas por las fibras Ia, conocida como reflejo H<sup>64,67</sup>(Figura 8). Tanto la onda M como el reflejo H aumentan conforme se va incrementando la intensidad de la estimulación. Sin embargo generalmente el reflejo H alcanza un pico de máxima amplitud y luego empieza a declinar hasta llegar a desaparecer, mientras que la respuesta M crece hasta alcanzar una máxima amplitud, mayor que la del reflejo H, que se mantiene, aunque se continúe incrementando la corriente eléctrica: El reflejo H va cayendo en amplitud conforme se va aumentando la intensidad de estimulación, muy probablemente debido a la colisión de los potenciales de acción antidrómicos y ortodrómicos activados en las fibras motrices <sup>46,64-66</sup>.

Si bien el reflejo H se considera un reflejo monosináptico principalmente por el tiempo de latencia entre la aplicación del estímulo y la aparición de la respuesta, actualmente se piensa que esto no es estrictamente cierto<sup>64</sup>. En 1983 Burke y colaboradores sugirieron que los potenciales postsinápticos excitadores compuestos (EPSP's por sus siglas en inglés) del RH en las motoneuronas del soleo presentan una fase ascendente suficientemente prolongada como para permitir que estímulos oligosinápticos contribuyeran al RH<sup>65,68</sup>. Actualmente hay evidencia de que tanto las fibras Ia como otras fibras pueden participar de manera oligosináptica en la conformación del RH<sup>46,65,69,70</sup>. Además se sabe que el RH tiene modulación tanto de interneuronas espinales como de vías descendentes<sup>35,49,64,66,71</sup>. Esto es importante, ya que es esta red de complejas interacciones la que permite que el RH presente una de sus características más destacadas, la depresión dependiente de la frecuencia (DDF), de la cual hablaremos a continuación.

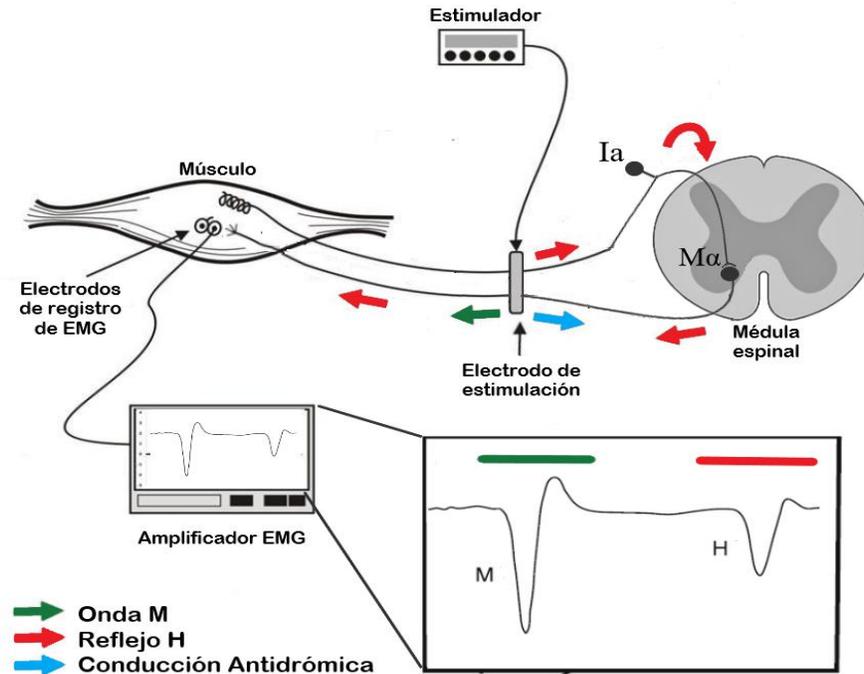


Figura 8. Esquema representativo del registro del reflejo de Hoffman (RH). Se evoca por la estimulación eléctrica de un nervio mixto y se registra en el músculo homónimo. La estimulación del nervio producirá dos respuestas. La excitación directa de la motoneurona (flecha verde) producirá una respuesta de corta latencia conocida como onda M. A su vez el estímulo también activará las fibras aferentes la las cuales excitarán de manera monosináptica y polisináptica a las motoneuronas produciendo una respuesta de mayor latencia conocida como reflejo de Hoffman (flechas rojas). Además, también es posible que el potencial de acción evocado en las motoneuronas (flecha rojo) colisione con el evocado por el estímulo eléctrico (flecha azul). (Ia) fibra aferente Ia, (Mα) motoneurona α. Modificado de Gajewski 2016.

### 1.11.1 DDF del reflejo H

La depresión dependiente de la frecuencia (DDF) es una disminución de la amplitud del RH (con relación a la respuesta que se produjo por la primera estimulación), que se presenta durante la aplicación de un tren de estímulos cuando éstos alcanzan una cierta frecuencia<sup>46,69</sup>. Cuando el RH se evoca con un

tren de estímulos eléctricos a baja frecuencia (0.1-0.2 Hz) estos se mantienen con una amplitud constante<sup>46,49</sup>. Sin embargo, si se evoca el RH con una frecuencia de 0.5 Hz o superior, el segundo reflejo y todos los posteriores tendrán una amplitud menor que la del RH evocado por el estímulo inicial, efecto que se mantiene durante el todo el tiempo que dure la estimulación<sup>46,49,69</sup>. LA DDF aumenta conforme aumenta la frecuencia de estimulación, a una frecuencia de 1 Hz se presenta una disminución del 40% de la amplitud del RH, mientras que una frecuencia de 5 Hz o superior la depresión puede ser de hasta el 70%<sup>69</sup>. Actualmente se desconoce el mecanismo fisiológico por medio del cual se produce la DDF<sup>46</sup>. Sin embargo, se ha demostrado ampliamente que se pierde posterior a una lesión de la médula espinal<sup>72,73</sup>. La pérdida de la DDF en personas con lesión medular generalmente se relaciona con espasticidad y rigidez de extremidades inferiores, esto es debido a daño en los sistemas inhibidores descendentes o en las interneuronas inhibitorias, de igual forma pacientes con enfermedad vascular cerebral o Parkinson también pueden presentar pérdida de la DDF<sup>68-71</sup>. Aunado a esto se sabe que el bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> con bicuculina en animales sanos produce pérdida de la DDF<sup>49,69</sup>. Por esta evidencia la DDF se ha considerado como un indicador de la función de los sistemas inhibitorios espinales. Sin embargo, Hernández-Reyes et al. (2019) mostraron que con solo bloquear los receptores extrasinápticos  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> en las ratas sanas se indujo la pérdida de la DDF (Figura 9).

Calcutt y colaboradores se propusieron investigar que sucedía con la DDF del RH en ratas con neuropatía dolorosa. Observaron que en ratas diabéticas con alodinia mecánica se presentaba pérdida de la DDF<sup>49,69</sup>. Esto también ocurría en ratas a las cuales se les inducía alodinia por bloqueo de la inhibición espinal GABAérgica<sup>49,69</sup>. Además, Calcutt y col. encontraron que cuando el dolor neuropático no estaba relacionado con una pérdida de la inhibición espinal, por ejemplo, ratas tratadas con paclitaxel el cual causa daño en los nervios periféricos, pero no atraviesa la barrera hematoencefálica, no se presentaba pérdida de la DDF<sup>69</sup>. Esto los llevo a proponer que se utilizara a la DDF como un biomarcador de la desinhibición espinal en el dolor neuropático<sup>46</sup>. Interesantemente, Hernández-Reyes et al.

(2019) demostraron que tanto la alodinia como la pérdida de la DDF se eliminaban por el bloqueo únicamente de los receptores extrasinápticos  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> (Figura 10). Lo que demostró que estos receptores modulan la DDF y tienen un papel antinociceptivo en animales sanos y en animales con dolor neuropático reversionen la pérdida de la DDF y tienen un papel pronociceptivo.

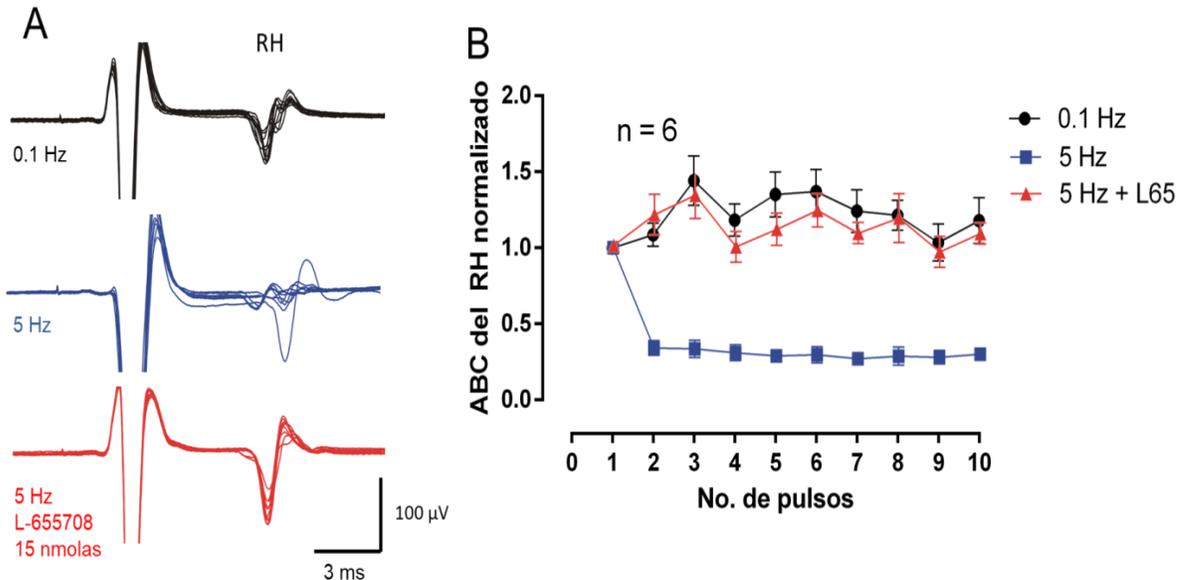


Figura 9. Características de la DDF del reflejo H en ratas sanas. (A) Se muestran los RH superpuestos evocados con un tren aplicado a 0.1 Hz (trazos negros) y a 5 Hz (trazos azules) en ratas sanas y a 5Hz posterior la administración intratecal de L-655708 una agonista inversa del receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> (trazos rojos). (B) Grafica que muestra el porcentaje de depresión del RH con relación a la frecuencia de estimulación en ratas normales, a la frecuencia de 0.1 Hz (símbolos negros) no hay depresión, mientras que a 5 Hz (símbolos azules) la depresión es del orden del 60 %, la depresión se perdió por bloqueo de los receptores extrasinápticos  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> (símbolos rojos). Tomada de Hernández-Reyes et al. 2019

### 1.12 Análisis de la locomoción y neuropatía diabética

Se conoce como locomoción o marcha al proceso por medio del cual se logra la propulsión hacia adelante del centro de gravedad del cuerpo a través de movimientos coordinados de las extremidades<sup>75,76</sup>. Si bien requiere del funcionamiento adecuado de múltiples sistemas como el músculo esquelético, y el

cardiovascular, la marcha “normal”, depende en gran parte de mecanismos neurológicos complejos como el equilibrio, la propiocepción, los reflejos posturales y la integración sensoriomotora <sup>77-79</sup>. Siendo de tal relevancia que un estudio llevado a cabo en Bruneck, Italia encontró que de las personas afectadas por trastornos de la marcha dos terceras partes se debía a causas neurológicas<sup>78,80</sup>.

El estudio de la locomoción en ratas se ha usado de manera extensiva en las neurociencias con el fin de estudiar alteraciones motoras debidas a enfermedades neurodegenerativas, así como su posible tratamiento<sup>81,82</sup>. Esto debido a que la locomoción genera datos consistentes, y fácilmente cuantificables<sup>81</sup>. Por otra parte, debido a que las ratas son animales cuadrúpedos, existe la cuestión de si los datos obtenidos en estos animales pueden ser aplicados a los humanos. Sin embargo, ya se ha demostrado que cuentan con las mismas características básicas y fases de la marcha que los humanos. Además, en la rata son las patas traseras las que producen la mayor parte del trabajo necesario para el desplazamiento<sup>83</sup>.

El ciclo del paso o zancada es la unidad básica de medida en el análisis de la marcha. Se puede definir como un ciclo de paso al periodo de tiempo entre dos eventos nominalmente idénticos ocurridos de forma sucesiva, por convención, este evento corresponde al momento en el que la extremidad entra en contacto con el suelo (contacto inicial)<sup>76,79</sup>. De manera general se considera que la marcha tiene dos grandes fases, la fase de apoyo y la fase de balanceo (Figura 11)<sup>76,78,79,82</sup>. La fase de apoyo constituye aproximadamente el 60% del ciclo de la marcha y corresponde a todo el periodo de tiempo en el cual la extremidad está en contacto con el suelo. Se subdivide en contacto inicial (golpe de talón), respuesta de carga, postura media, postura terminal y pre-swing.<sup>78</sup> Su duración suele variar en relación a la velocidad de la marcha, ya que a medida que aumenta la velocidad de locomoción la duración de la fase de apoyo disminuye<sup>78,81</sup>. La fase de balanceo ocupa aproximadamente el 40% del ciclo de la marcha y corresponde al tiempo que la extremidad pasa en el aire<sup>78,79</sup>. Se subdivide en balanceo inicial (despegue), balanceo medio (tibia vertical) y balanceo terminal<sup>78</sup>. Suele

permanecer constante a pesar de los cambios en la velocidad de la locomoción<sup>78,81</sup>.

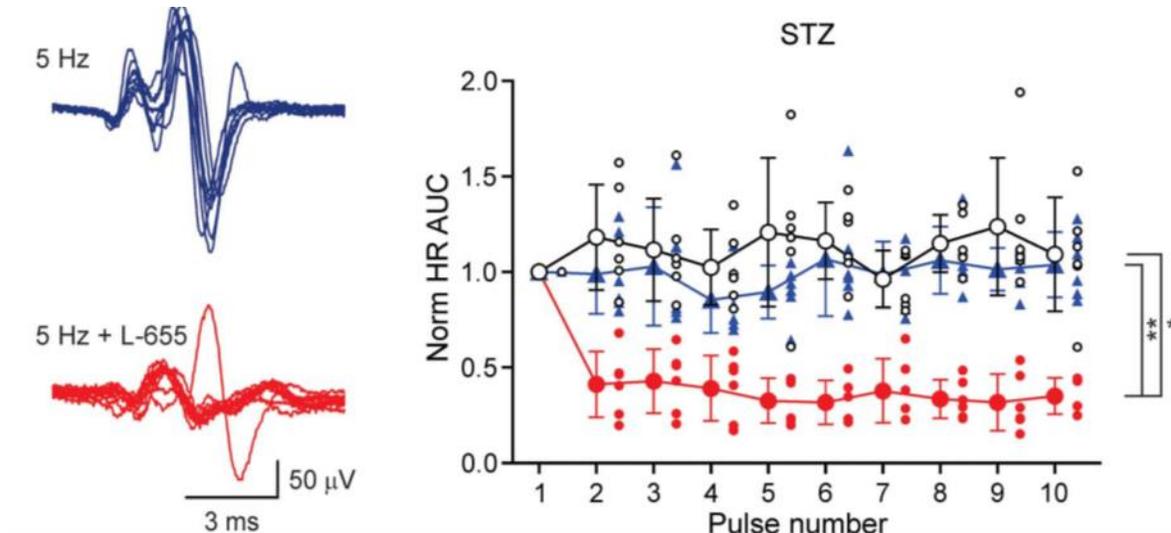


Figura 10. Características de la DDF del reflejo H en ratas diabéticas. (A) Se muestran los RH superpuestos evocados con un tren aplicado a 5 Hz en ratas diabéticas antes (trazos azules) y en presencia del bloqueador de los receptores extrasinápticos  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> (trazos rojos). En la gráfica se muestran los valores promedio del área bajo la curva de los RH rectificadas evocados por un tren a 0.1 Hz (símbolos negros) y 5Hz antes y después de bloquear los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> registrados en 6 ratas diabéticas.

Las medidas comúnmente valoradas en la locomoción incluyen: la velocidad de la marcha, la cadencia (número de pasos por unidad de tiempo), el ancho de la base de la marcha, la longitud de la zancada (distancia lineal cubierta por un ciclo de marcha), la duración de la fase de apoyo, y la cinemática de las articulaciones en el plano sagital<sup>78,79,81,82</sup>.

Se sabe que la neuropatía diabética produce déficits somatosensoriales, alteraciones del equilibrio, y disminución de la fuerza de las extremidades (sobre todo en su porción distal)<sup>75</sup>. Estos cambios inducen alteraciones de la locomoción en los pacientes diabéticos como disminución de la velocidad de la marcha y disminución de la longitud de la zancada con aumento de la fase de apoyo<sup>75,84,85</sup>.

En cuanto a la cinemática articular se ha encontrado una disminución del rango de movimiento de las articulaciones, sobre todo en el tobillo y la rodilla así como una mayor variabilidad entre zancada y zancada<sup>75</sup>.

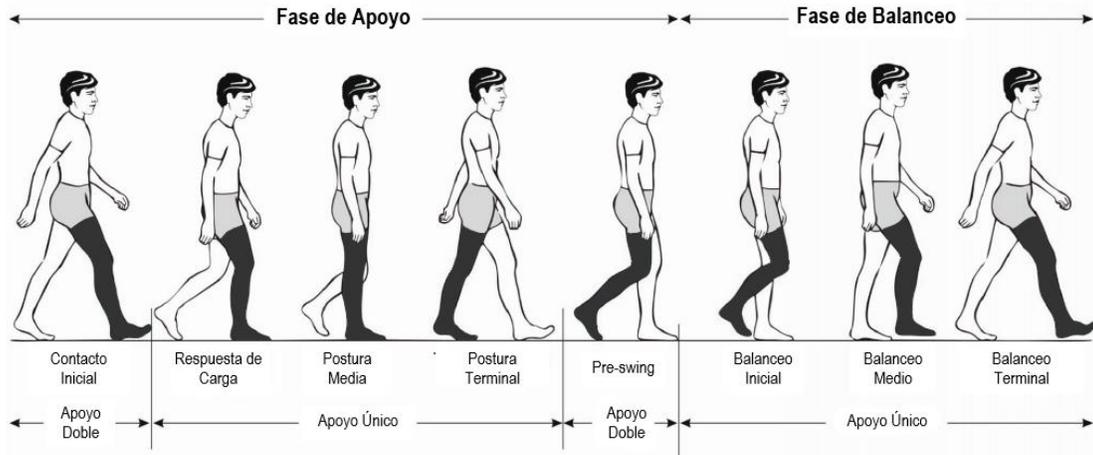


Figura 11. Ciclo de la marcha normal. Se muestran las fases y subfases así como el número de puntos de apoyo durante el ciclo. Tomado de Pirker 2016.

Actualmente hay poca información sobre las alteraciones de la marcha en la prediabetes. Un estudio de 2017 llevado a cabo por Almurthi y colaboradores encontró que los pacientes con prediabetes presentaban un aumento del ancho de base de la marcha, de igual forma encontraron que estos pacientes tendían a tener una velocidad de locomoción y longitud de zancada menores a los sujetos sanos, sin embargo, los resultados no fueron estadísticamente significativos<sup>86</sup>.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La prediabetes es un problema de salud pública que va en aumento. Contrario a lo que se pensaba anteriormente, se ha encontrado que los pacientes prediabéticos ya presentan neuropatía diabética, que afecta tanto a la percepción de estímulos sensoriales como a la locomoción, lo que desencadenará el desarrollo de la neuropatía dolorosa de manera temprana.

Actualmente no se han descrito todos los mecanismos fisiopatológicos que están involucrados en el desarrollo del dolor neuropático en los pacientes diabéticos. La etiología o causas subyacentes de la diabetes parecen influir en cómo se desarrolla la neuropatía, siendo la hiperglucemia el factor más importante en la DMT1, mientras que en la DMT2 la resistencia a la insulina estaría jugando el papel principal. Más aún, no sabemos si hay diferencias en cómo se produce el daño neuropático en pacientes prediabéticos en relación con los que presentan diabetes franca, o hasta qué punto el daño por prediabetes es reversible. Esto ha influido en que no se haya podido desarrollar un tratamiento que pueda mejorar la calidad de vida de los pacientes, ni medidas de prevención secundaria eficaces para detener la progresión del daño.

Hay evidencia de que el receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> tiene un papel pronociceptivo en la neuropatía por diabetes tipo I inducida en ratas hembra y que su bloqueo por L-655708, agonista inverso del receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>, revierte la pérdida de la DDF. Sin embargo, no se conoce si este receptor tiene el mismo papel en la neuropatía por prediabetes y si su función es dependiente del sexo.

Por otra parte, hasta donde es de nuestro conocimiento, no existen estudios que evalúen la locomoción en animales prediabéticos. Determinar si existen cambios en la locomoción en un modelo murino de prediabetes puede ser importante, ya que se podría utilizar como un marcador de dolor neuropático producido por esta patología, además de que permitiría analizar intervenciones farmacológicas que influyan sobre el componente motor de la neuropatía producida por prediabetes y que no se podrían realizar de primera instancia en humanos.

### **3. HIPOTESIS**

El bloqueo de los receptores espinales espinales  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> producirá analgesia y recuperación de la depresión dependiente de la frecuencia del reflejo H en ratas macho con dolor neuropático secundario a prediabetes.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si el bloqueo de los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> por medio de la administración intratecal de L-655708 produce analgesia y restaura la DDF del reflejo H en ratas prediabéticas con dolor neuropático.

### **5. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Estandarizar un modelo de prediabetes en ratas Wistar macho.
- Evaluar si existen cambios en la marcha en ratas prediabéticas.
- Caracterizar la DDF del reflejo H antes y después de la aplicación de L-655,708.
- Evaluar la presencia de alodinia táctil antes y después de la aplicación de L-655,708.

### **6. METODOLOGIA**

#### **6.1 Modelo de prediabetes**

Ratas neonatas Wistar macho de 3 a 4 días de edad se dividieron en dos grupos: las ratas control recibieron una inyección intraperitoneal de vehículo (0.1M buffer de citrato pH 4.5)<sup>26</sup> mientras que las ratas de prueba recibieron una dosis única de estreptozocina (50mg/kg) i.p., posteriormente las ratas se regresaron a su madre y se mantuvieron en ciclos de luz oscuridad de 12h, a 23°C. Tres semanas después las ratas fueron destetadas y colocadas en cajas de acrílico con agua y alimento a libre demanda<sup>87,88</sup>.

#### **6.2 Medición de peso corporal y glucosa capilar**

A partir de la octava semana de vida se realizó la medición del peso corporal y del nivel de glucosa capilar en ayuno. La medición de la glucosa capilar se realizó en sangre de la cola del animal la cual se analizó por medio de un glucómetro OneTouch®.

### **6.3 Prueba de tolerancia a la glucosa oral**

A las 20 semanas de vida se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa tanto en el grupo control como en el grupo prediabético. Los animales se pusieron en ayuno de 12 h. Posteriormente los animales recibieron solución de D-glucosa al 50% a razón de 2g/Kg, se realizó la medición de glucosa capilar antes y a los 30, 60, 90 y 120 min posterior a la administración de la solución<sup>87</sup>.

### **6.4 Determinación de la alodinia mecánica**

A partir de la octava semana de vida se realizó la determinación de la alodinia mecánica en ratas control y prediabéticas. Con este fin se colocó a las ratas en una caja con piso de rejilla de metal y se permitió que se aclimataran por 20 minutos antes de realizar la medición. Por medio de filamentos de von Frey se determinó el 50% del umbral de retiro de cada extremidad. Se inició con el filamento de 2 g, aplicado en la extremidad posterior. El retiro de la extremidad de manera abrupta o el comportamiento antinociceptivo posterior a la aplicación se consideró como una respuesta positiva. Ante una respuesta positiva, se aplicó el filamento con el gramaje inmediatamente inferior, mientras que si la respuesta fue negativa se aplicó el filamento con el gramaje inmediatamente superior. Esto continuó hasta que se realizaron cuatro mediciones más a partir del primer cambio de comportamiento o hasta que se produjeron cuatro respuestas negativas a 15 g o cuatro respuestas positivas a 0.25 g<sup>48</sup>. Con estos resultados se calculó el umbral de retiro de la extremidad usando la ecuación propuesta por Chaplan et al.<sup>48</sup>. Se consideró como alodinia aquellos valores por debajo de 5 g de acuerdo a lo establecido por Jolivald et al. (2008)<sup>49</sup>.

### **6.5 Prueba del reflejo de Hoffmann**

Entre las semanas 24 y 25 de vida, bajo anestesia con ketamina/xilaxina (80/5 mg/kg), la extremidad posterior izquierda de los animales se aseguró en posición horizontal, posteriormente se procedió a colocar a nivel del maléolo un electrodo de aguja (cátodo) para estimular eléctricamente la rama del nervio tibial que inerva el músculo plantar, en el que se insertaron dos electrodos de aguja para registrar el RH. En la cola se insertó un electrodo conectado a tierra<sup>54</sup>.

Se realizó la curva de reclutamiento de la respuesta M y del RH estimulando con un pulso rectangular de 0.3 ms en pasos de 20 a 50  $\mu$ A a partir de 0 A, hasta que se observó la máxima respuesta H y M. Los electrodos de registro de la actividad muscular se conectaron a un amplificador diferencial de AC WPI (ISO-DAM8A) con una ganancia de x100, con filtros de 0.1 Hz a 3 KHz. Las respuestas se digitalizaron a 50 KHz con una tarjeta Digidata (Molecular Devices) y se visualizaron en una computadora con el programa AxoScope (Molecular Devices).<sup>54</sup>

La prueba de la DDF del RH se realizó aplicando la intensidad de la corriente que produjo el RH de 50% y 100% de la máxima amplitud. Se estimuló con trenes de 10 pulsos a las frecuencias de 0.1, 1 y 5 Hz. Los RH registrados se rectificaron para calcular el área bajo la curva con el programa Clampfit (Molecular Devices). Se graficaron los 10 RH, normalizados con respecto al primero, en función del orden de activación.

### **6.6 Efecto del L-655,708 en la alodinia táctil**

Entre las semanas 23 y 24 de vida del animal, se evaluó el papel del receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> en la nocicepción, se realizó la valoración de la alodinia mecánica en ratas control y tratadas con STZ, como ya se explicó previamente. Posteriormente se procedió a aplicar 10  $\mu$ l del agonista inverso L-655,708 (15 nmoles) a ambos grupos y se evaluó la alodinia mecánica a los 30 minutos y posteriormente cada hora hasta completar 6 horas.

### **6.7 Evaluación de la marcha**

Se realizó la evaluación de la marcha a las semanas 12 y 16. Para esto se recortó el pelo alrededor de las extremidades posteriores y se colocaron sobre la piel discos reflejantes de aproximadamente 2 mm de diámetro en cuatro puntos de referencia anatómicos: la cresta ilíaca, el trocánter mayor, el maléolo lateral y la cabeza del quinto metatarsiano. La posición de la rodilla se calculó indirectamente superponiendo dos círculos (con centro en los pivotes de la cadera y el tobillo) con un radio igual a la longitud de la tibia y el fémur respectivamente. Posteriormente se colocó la rata en una pasarela montada en una caja de acrílico de 100 cm de

longitud iluminada con luces led. Con el fin de alentar la locomoción se acopló una jaula oscura al final del corredor para atraer al animal. La marcha se grabó con dos cámaras Go-pro ubicadas a ambos lados de la pasarela, la grabación se realizó a 120 cps, con una resolución de 1080 pixeles, modo de grabación lineal, para su posterior análisis con el programa tracker.<sup>82</sup>

## **6.8 Análisis de resultados**

El peso, los valores de glucosa tanto en ayuno como en la curva de tolerancia, así como los valores de alodinia mecánica se expresan como la media  $\pm$  el error estándar (ee). El análisis estadístico se realizó aplicando la Anova de dos vías seguido de pruebas post hoc, en este caso corrección de Bonferroni.

Para realizar el análisis del efecto del L-655,708 sobre la alodinia mecánica se graficó la media  $\pm$  ee de los valores de la prueba antes y después de la aplicación del compuesto, esto se realizó de manera independiente para cada grupo, posteriormente se realizó la Anova de una vía y se realizaron pruebas post hoc (Bonferroni) para comparar el valor de la media antes de la aplicación del compuesto contra cada una de las medias de las mediciones realizadas posterior a la aplicación del agonista inverso.

Para analizar el reflejo H se realizó la rectificación de los trazos mediante el programa Clampfit y se calculó el área bajo la curva (ABC), los valores del ABC se normalizaron en relación al valor del primer estímulo, debido al escaso número de repeticiones (n=1 a 3) los resultados se representan como el promedio y el diagrama de dispersión de los datos obtenidos. Para determinar la significancia de los cambios entre cada frecuencia se aplicó la prueba de Anova de dos vías seguido de pruebas post hoc (Bonferroni).

En cuanto al análisis de la locomoción, este se limitó al plano sagital. Para cada rata se analizaron tres pasos, se consideraron como satisfactorios para el análisis aquellos pasos que se realizaron de manera continua (sin pausas) y que tuvieran una velocidad que estuviera entre los 30 y 50 cm/s<sup>82</sup>. Con ayuda del programa Tracker se realizó la medición de los ángulos de la cadera, rodilla y tobillo para cada fotograma y se realizó una interpolación *spline* cúbica para obtener 101

muestras. Los resultados se muestran como la posición angular de cada articulación contra el porcentaje del ciclo del paso. Además, se calculó el rango de movilidad de cada articulación, la velocidad de locomoción, la longitud de la zancada, y el porcentaje de la fase de apoyo. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  E.E. Para para determinar la significancia estadística de los cambios entre los grupos control y tratado se aplicó la prueba de Anova de dos vías seguido de prueba de Bonferroni.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Peso y nivel de glucosa el modelo de prediabetes

Con el fin de valorar la acción de la STZ, se realizó de manera semanal la medición del peso y de los niveles de glucosa en ayuno, a partir de la semana 8 y hasta la semana 24 de vida de las ratas (Figura 12). En cuanto al peso no se observaron cambios significativos entre el grupo control y el grupo tratado con STZ. En el caso de las cifras de glucosa en ayuno, se observa que los niveles de glucosa de las ratas tratadas con STZ son consistentemente superiores a los de las ratas control durante todo el tiempo que se realizó la medición. La prueba de ANOVA de dos vías mostró diferencia significativa del grupo tratado con relación al grupo control con un valor de  $p=0.009$ , las pruebas post hoc mostraron que había diferencias significativas a las semanas 15 y 24. Además, cabe destacar que posterior a la semana nueve el promedio de las cifras de glucosa de las ratas tratadas se mantuvo por encima de 100 mg/dl, cifra considerada como diagnóstica de prediabetes en humanos (Figura 12).

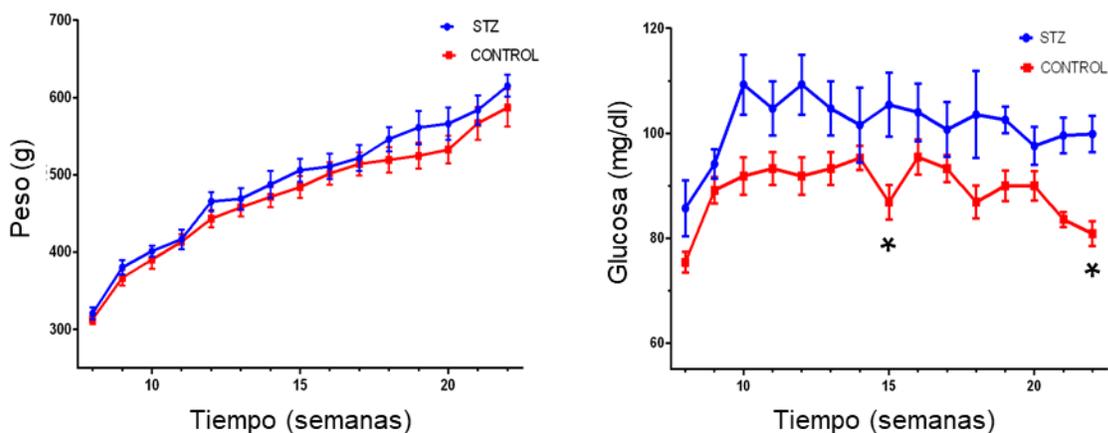


Figura 12. Peso y la glucemia en ayuno de ratas control y tratadas con estreptozocina. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  ee. Se realizó ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni,  $n=7$ ,  $*p<0.05$ . STZ: estreptozocina.

Respecto a la curva de tolerancia a la glucosa oral se observó cambio significativo en las mediciones realizadas a los 30, 60 y 90 minutos posterior a la administración de la carga de glucosa. En ambos grupos el pico se alcanzó a los 60 minutos. A los 120 minutos si bien el promedio de glucosa de las ratas tratadas era superior al de las ratas control no se observaron cambios significativos. Se calculó además el ABC para ambos grupos encontrándose que el área fue significativamente mayor para el grupo STZ con relación al grupo control (Figura 13).

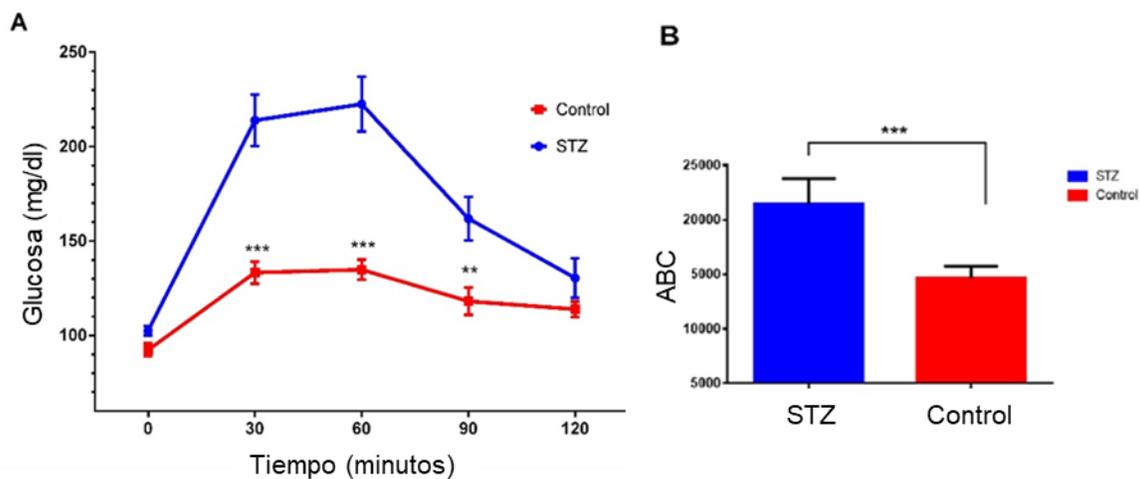


Figura 13. Análisis de tolerancia a la glucosa. (A) Curva de tolerancia a la glucosa oral. (B) Área Bajo la Curva (ABC) de la gráfica del panel A. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  ee. (A) Prueba de ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni. (B) Prueba de *t de student* de datos no pareados.  $n=7$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ . STZ: estreptozotocina

## 7.2 Alodinia mecánica

Los valores de umbral de retiro de la extremidad posterior en las pruebas de alodinia mecánica fueron similares para las dos extremidades. En ambas extremidades los umbrales de las ratas tratadas con estreptozotocina fueron inferiores a los de las ratas control desde la primera medición y se observó un cambio significativo en varias de las mediciones. Sin embargo, a partir de la semana 19 se observa un descenso constante en el umbral de retiro de las ratas tratadas, alcanzándose el umbral de alodinia a la semana 24 (Figura 14).

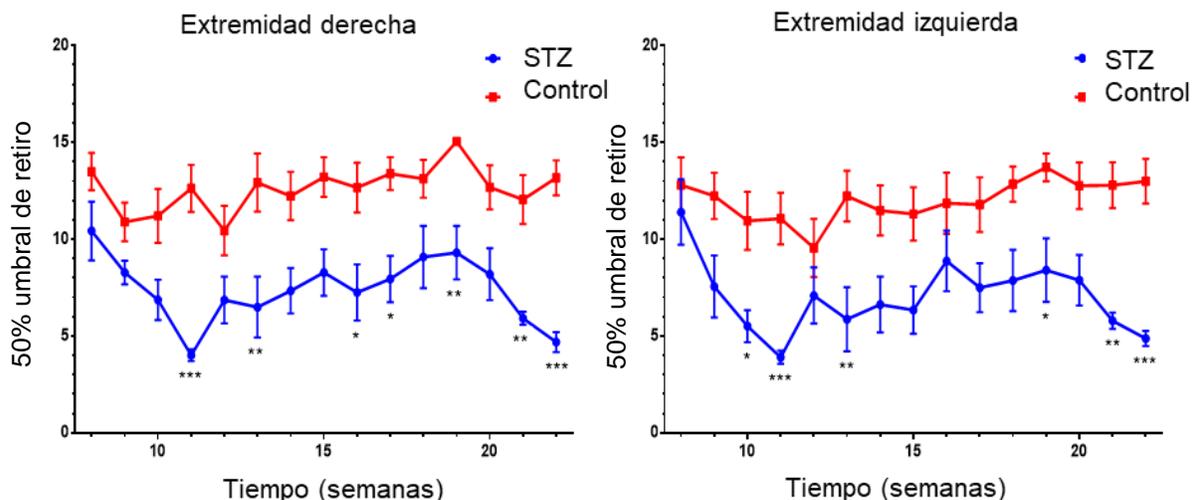


Figura 14. Umbral de 50% de retiro de las extremidades posteriores con filamentos de von Frey. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  ee. Se realizó la ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni,  $n=7$  \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ . STZ: estreptozotocina.

### 7.3 Efecto de L-65 sobre la alodinia mecánica

Como ya se mencionó antes entre la semana 23 y 24 de vida se aplicó intratecalmente L-655,708 a ratas control y tratadas con estreptozotocina. El efecto máximo para ambos grupos se observó a las dos horas. En el caso de las ratas control estas disminuyeron su umbral nociceptivo hasta valores cercanos a los considerados como alodínicos. En las ratas prediabéticas que presentaban alodinia mecánica, la aplicación del fármaco L-655,708 aumentó de manera considerable el umbral de retiro de la extremidad. Sin embargo, no se alcanzaron valores similares a los presentados por ratas control. A las seis horas de aplicado el fármaco las cifras de alodinia regresaron a su valor original. Los resultados fueron similares para ambas extremidades (Figura 15).

### 7.4 Evaluación de la marcha

Con el fin de determinar si se produjeron cambios en la locomoción inducidos por la aplicación de estreptozotocina, se realizó la valoración de algunos parámetros básicos. En cuanto a la longitud de la zancada, velocidad de la locomoción y

porcentaje de la fase de apoyo (%FP), no se encontraron cambios significativos entre ambos grupos (Figura 16). También se realizó la medición en el plano sagital del rango de movimiento articular en las principales articulaciones implicadas en la locomoción. Para realizar un mejor análisis se dividió el ciclo del paso en fases de apoyo y balanceo. No se encontraron diferencias significativas en el rango de movimiento para la cadera ni para la rodilla, sin embargo, en el caso del tobillo se encontró que las ratas tratadas con estreptozotocina mostraban una disminución en el rango de movilidad en la fase de apoyo, tanto en la semana 12 como en la 16 (Figura 17).

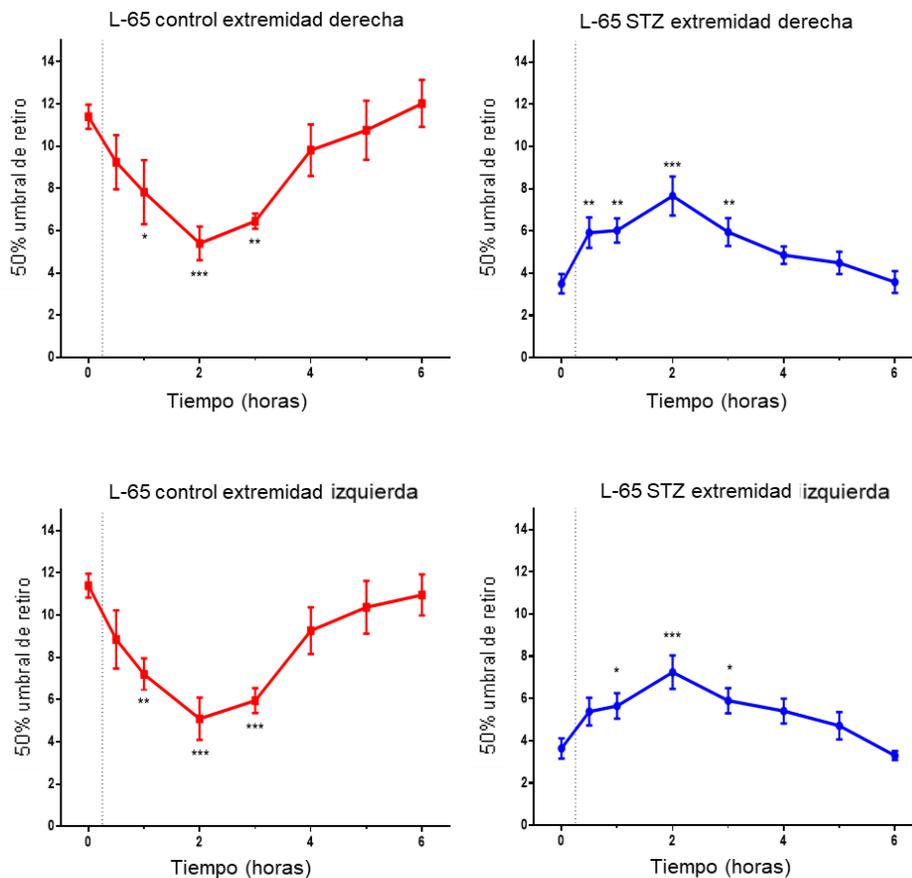


Figura 15. Efecto de L-65 en la alodinia mecánica en ratas sanas y prediabéticas. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  EE. El valor al tiempo cero (izquierda de la línea punteada) corresponde al valor antes de la aplicación de L-65. Se realizó prueba de ANOVA de una vía, seguido de prueba de Bonferroni para comparar el valor inicial de alodinia contra cada uno de los valores posteriores.  $n=6$ . \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

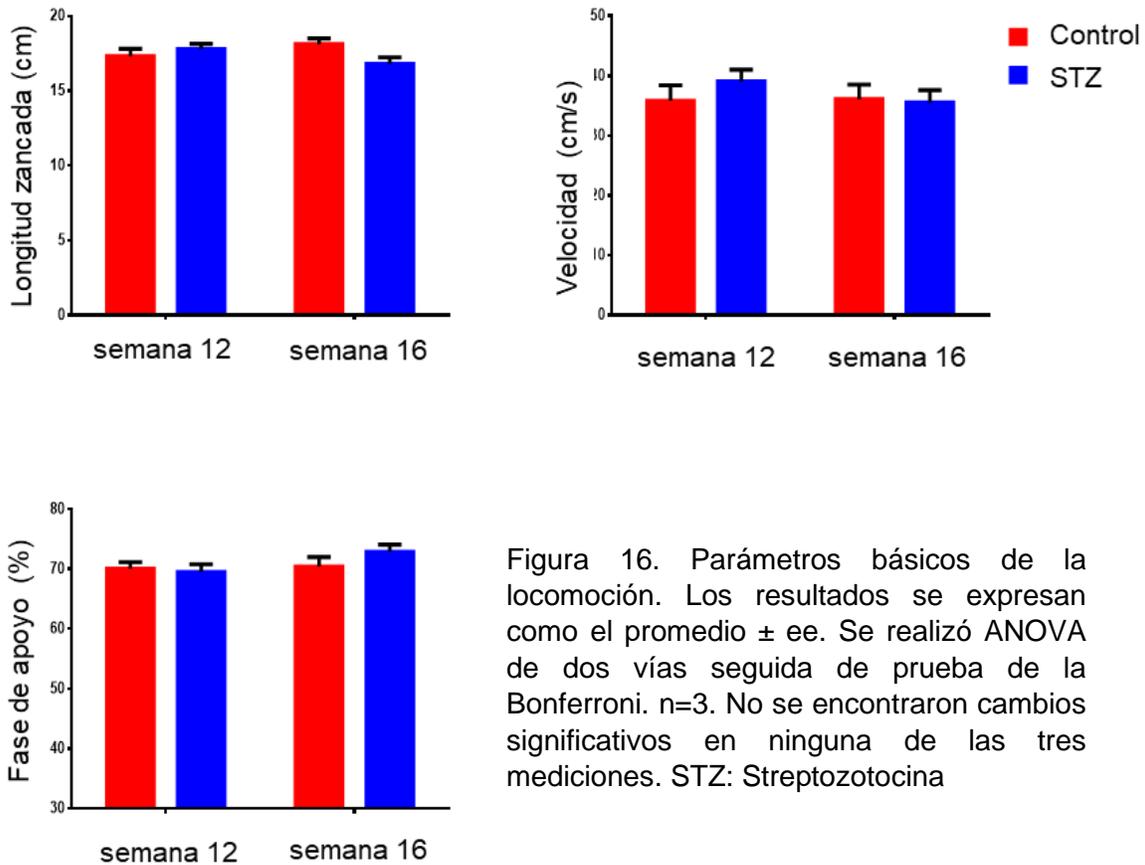


Figura 16. Parámetros básicos de la locomoción. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  ee. Se realizó ANOVA de dos vías seguida de prueba de la Bonferroni.  $n=3$ . No se encontraron cambios significativos en ninguna de las tres mediciones. STZ: Streptozotocina

Para evaluar los cambios en el rango de movilidad articular, se construyeron gráficas para la trayectoria angular de cada articulación. Se graficó el porcentaje del ciclo del paso contra la posición angular de la articulación en ese momento. Como era de esperarse, las gráficas fueron similares para las articulaciones de la cadera y rodilla en ambos grupos. En el caso de la gráfica de tobillo se observa que hay una menor flexión durante casi toda la fase de apoyo en el grupo tratado con estreptozotocina, esto es especialmente notorio entre el 30 y el 50% del ciclo de la marcha. En la fase de balanceo del tobillo también se observa una menor flexión del grupo tratado. Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa, además de que no hubo cambio significativo en el rango de movilidad durante esta fase, se requiere incrementar el número de registros para hacer la evaluación estadística (Figura 18).

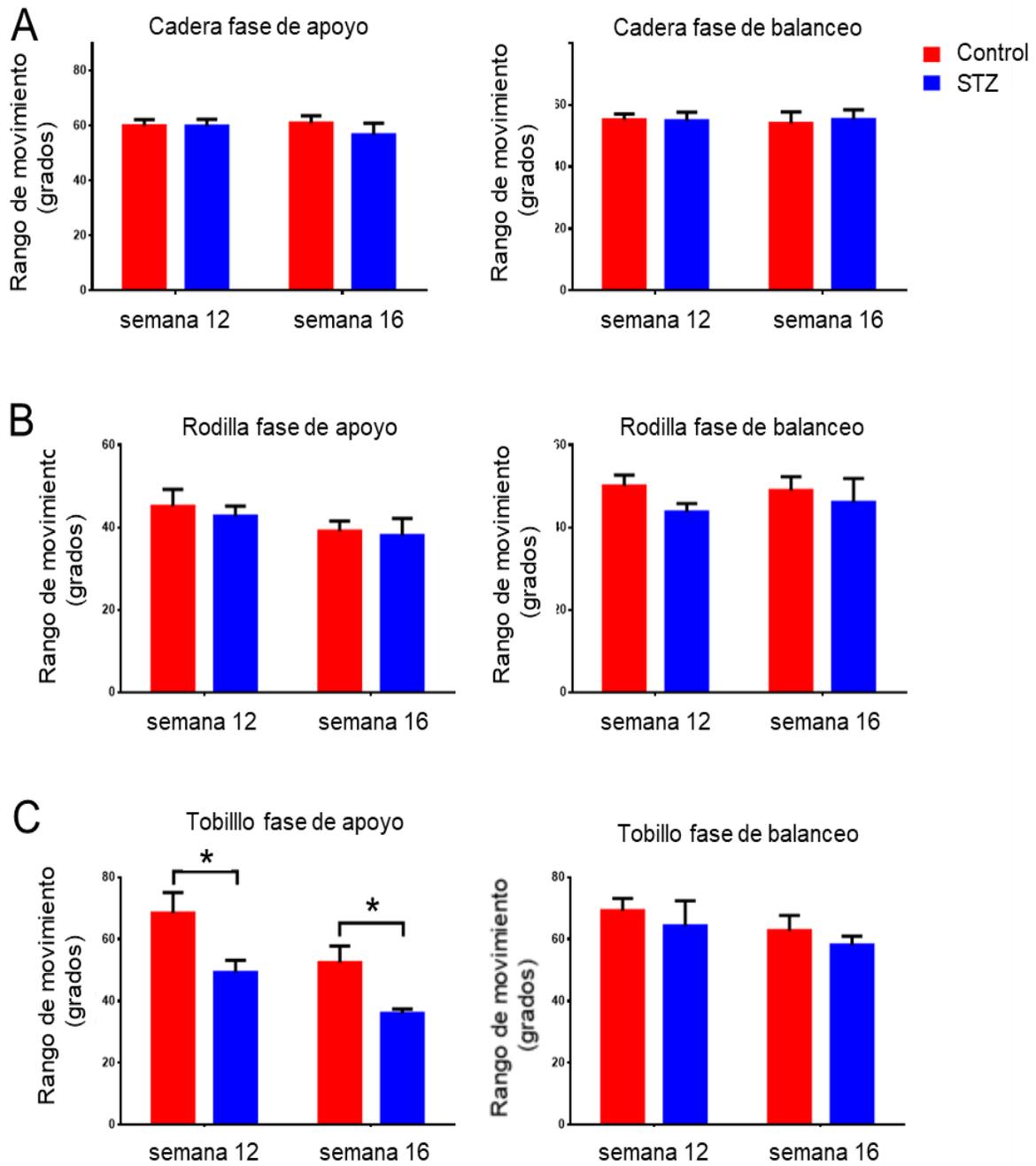


Figura 17. Rango de movilidad de las diferentes articulaciones implicadas en la locomoción. (A) Articulación cadera. (B) Articulación rodilla. (C) Articulación tobillo. Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  ee.  $n=3$ . Se realizó ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

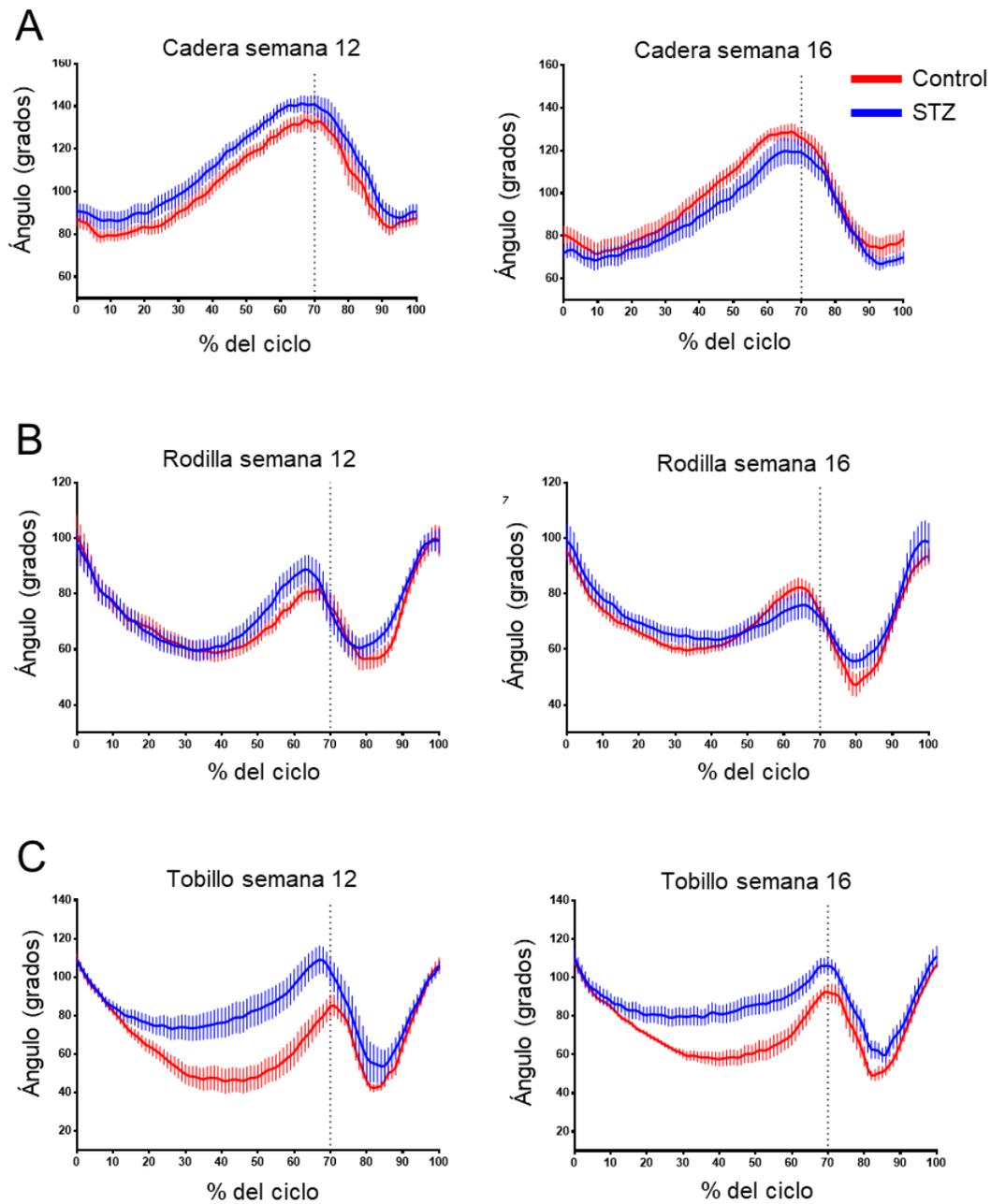


Figura 18. Trayectoria angular de las articulaciones principales de la extremidad posterior relacionadas con la locomoción. (A) Cadera. (B) Rodilla. (C) Tobillo. Para cada articulación se muestran las gráficas de las semanas 12 y 16. La línea gruesa representa el promedio, las líneas perpendiculares más delgadas el error estándar (n=3).

## 7.5 La DDF del reflejo de Hoffman

Con el fin de determinar la intensidad de corriente adecuada para valorar la DDF, se realizó la curva de reclutamiento del RH de cada una de las ratas a registrar. Posteriormente, para evaluar la DDF se seleccionó la intensidad de corriente que se encontraba aproximadamente al 50% de la fase de ascenso de la curva y la que se encontraba en el punto más alto de la misma (Figura 19). A estas corrientes les llamaremos intensidad media e intensidad alta respectivamente.

Debido a la actual contingencia derivada de la propagación del virus SARS-CoV-2 no se pudo completar de manera satisfactoria el análisis de la DDF. Sin embargo, se muestran los análisis obtenidos.

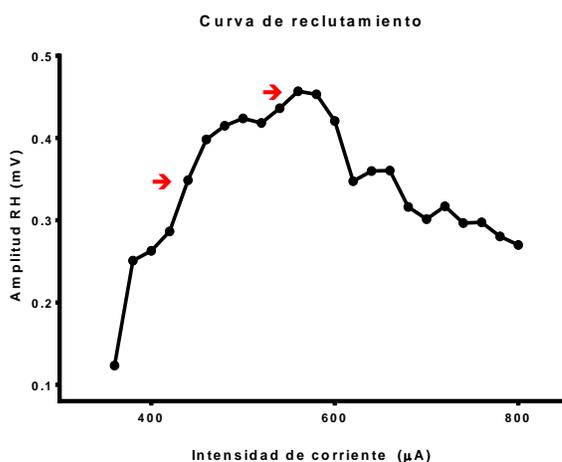


Figura 19. Curva de reclutamiento del RH. Las flechas rojas indican las intensidades de corriente a las cuales se realizó la valoración de la DDF.

En el caso de la DDF evocada a intensidad media, se encontró que no hubo pérdida de la depresión en ninguna de las tres ratas prediabéticas analizadas. Para el caso de las ratas control solo se pudo realizar el análisis de una rata, la cual presentó DDF. El porcentaje de depresión fue mayor a 5 Hz que a 1 Hz en ambos grupos (Figura 20). A alta intensidad de corriente se observó que en las dos ratas prediabéticas analizadas se produjo pérdida de la DDF tanto a 1 Hz como a 5 Hz. En el caso de las ratas control se observó la DDF tanto a 1 Hz como a 5 Hz. Además, en ratas control a diferencia de los registros obtenidos a medio amperaje, a alto amperaje el porcentaje de depresión a 1 Hz fue superior al 50%, alcanzando valores similares a los obtenidos a 5 Hz (Fig. 21).

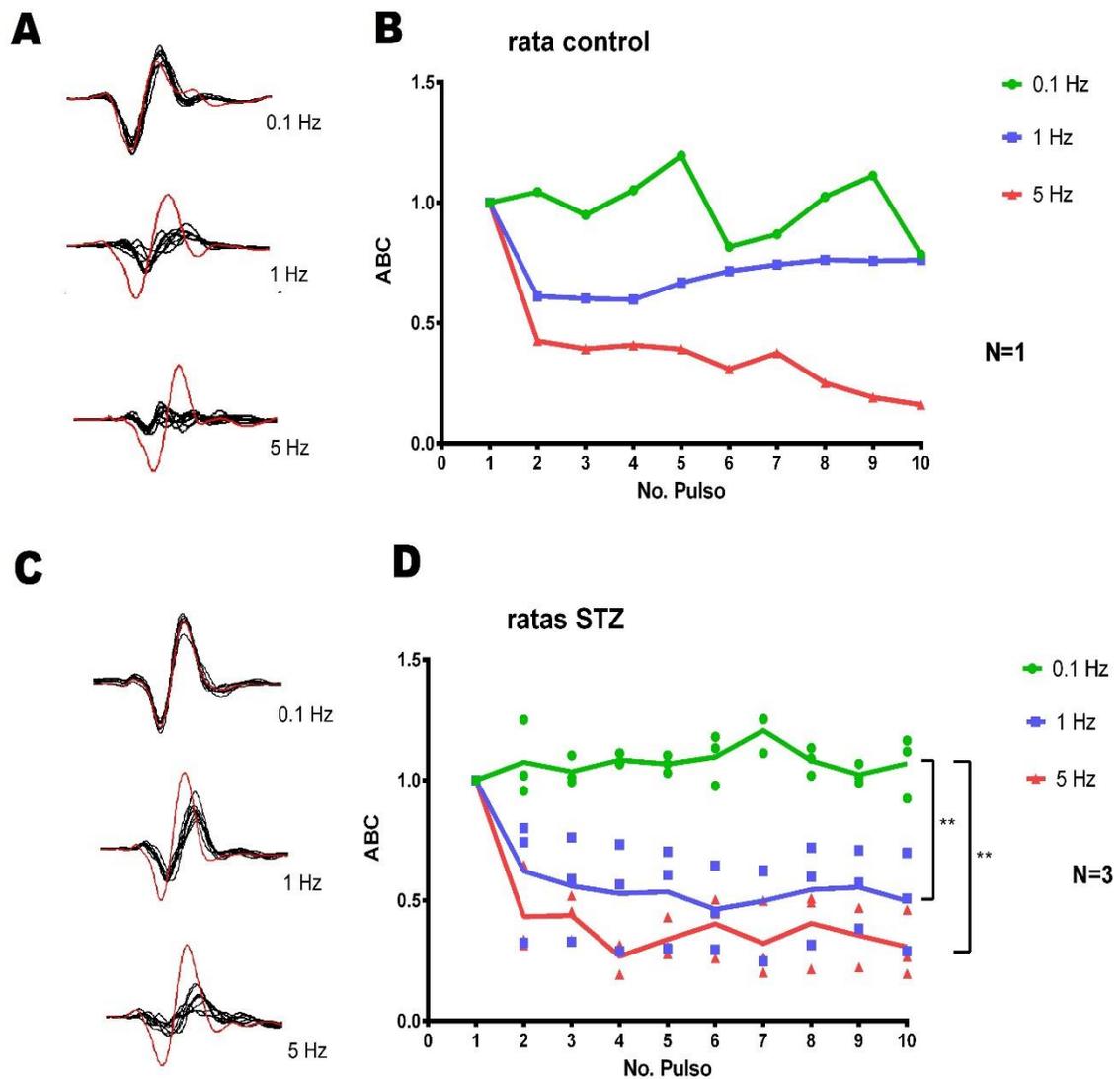


Figura 20. La DDF evocada a intensidad media. (A) Trazos representativos de 10 RH de una rata control, evocados a las frecuencias de 0.1, 1 y 5 Hz, en rojo se muestra el trazo correspondiente al primer pulso y los subsecuentes en negro. (B) Gráfica del Área Bajo la Curva (ABC) de los RH normalizados con respecto al primero, registrados en una rata control. (C) Trazos representativos del RH de una rata prediabética, en rojo se muestra el trazo correspondiente al primer pulso y los subsecuentes en negro. (D) Grafica del ABC de los RH normalizados con relación al primero en ratas tratadas con estreptozotocina, en cada una de las figuras los símbolos representan el valor del ABC para cada rata, las líneas continuas de color representan el promedio. Se realizó ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . STZ: estreptozotocina

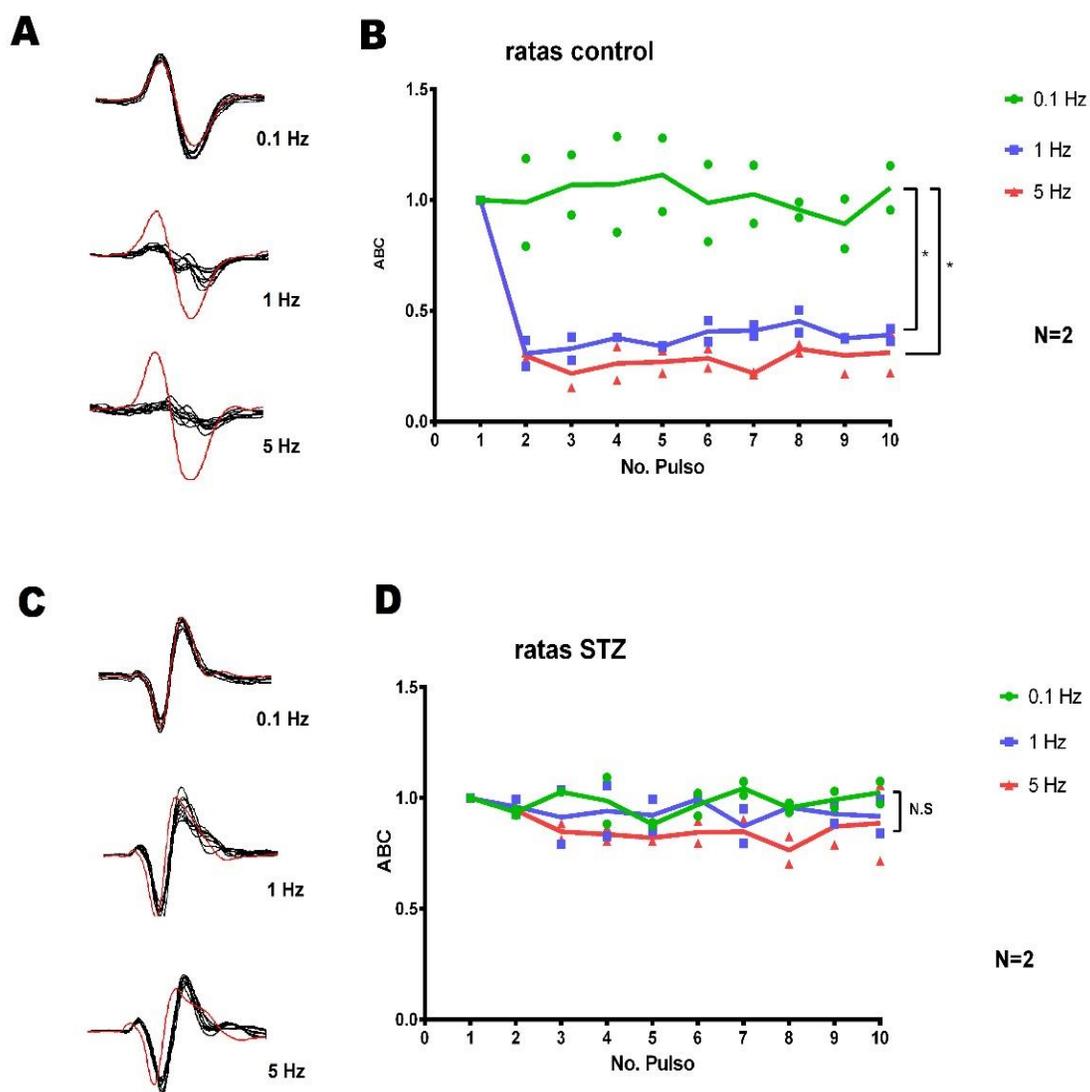


Figura 21. DDF evocada a intensidad alta. (A) Trazos representativos del RH de una rata control, en rojo se muestra el trazo correspondiente al primer pulso y los subsecuentes en negro. (B) ABC de los RH normalizados con relación al primero en ratas control, cada uno de los símbolos de las curvas representa el valor del ABC de del RH de una rata, la línea de color continuo representa el promedio. (C) Trazos representativos del RH de una rata tratada con estreptozotocina, en rojo se muestra el trazo correspondiente al primer pulso y los subsecuentes en negro. (D) ABC de los RH normalizados con relación al primero en ratas tratadas con estreptozotocina, cada uno de los símbolos representa el valor del ABC de cada uno de los RH de una rata, la línea de color continuo representa el promedio. Se realizó ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , N.S, sin cambio significativo. STZ: streptozotocina

## **8. DISCUSIÓN**

### **8.1 Modelo de prediabetes**

Comúnmente los modelos de prediabetes en murinos se desarrollan por medio de dietas hipercalóricas o hiperglucémicas, o la combinación de estas, más la administración de dosis bajas de estreptozotocina en ratas adultas<sup>22,89-91</sup>. Hasta donde es de nuestro conocimiento esta es la primera vez que se induce un modelo de prediabetes mediante la inyección de estreptozotocina en ratas neonatas, esto se logró mediante la administración de una dosis de estreptozotocina más baja de la comúnmente utilizada para inducir diabetes. En el presente estudio se utilizó una dosis de 50 mg/Kg i.p., mientras que la dosis común de estreptozotocina en periodo neonatal para inducir un modelo de DMT2 es de entre 70 y 150 mg/dl<sup>26,87</sup>. Esto puede resultar en una ventaja ya que la aplicación de estreptozotocina neonatal en una sola dosis puede ser un modelo menos costoso, más práctico y fácil de mantener que otros previamente descritos, ya que no se requiere suplementar a los animales con dietas especiales o bebidas azucaradas.

Con el fin de valorar la validez del modelo se realizó la medición de la glucosa en ayuno cada semana, además a la semana 20 se realizó una curva de tolerancia a la glucosa oral. En cuanto a la glucosa en ayuno, como ya se comentó previamente, durante todo el tiempo que se realizó el análisis los valores de las ratas tratadas con estreptozotocina fueron consistentemente superiores a la de los controles. Además, se encontró que el promedio de los valores obtenidos para las ratas tratadas estuvo entre el rango de valores definidos como prediabetes en humanos<sup>1</sup>. A pesar de esto, los resultados solo fueron estadísticamente diferentes en las semanas 15 y 24. Sin embargo, estos resultados son consistentes con los reportados en otros modelos de prediabetes, donde se ha encontrado que los valores de glucosa en ayuno son ligeramente superiores a los de los grupos control, pudiendo el cambio no ser estadísticamente significativo<sup>89-92</sup>.

La curva de tolerancia mostró cambios significativos en las mediciones obtenidas entre los 30 y 90 minutos de la administración de la carga de glucosa. De manera

clínica, la ADA solo considera los valores obtenidos a los 120 minutos para el diagnóstico de tolerancia a la glucosa alterada<sup>1</sup>. Sin embargo, múltiples autores utilizan el cálculo del ABC de la curva de tolerancia si existen alteraciones del metabolismo de la glucosa en murinos<sup>22,89,90,93</sup>. En el presente trabajo al calcular el ABC en la prueba de tolerancia a la glucosa, se encontró que el área fue significativamente superior en las ratas tratadas, por lo que podemos decir que existe cierto grado de intolerancia a la glucosa. Por tanto, podemos constatar que el modelo desarrollado pudo emular dos de los factores principales para el diagnóstico de prediabetes en humanos, el aumento moderado de las cifras de glucosa plasmática y la tolerancia a la glucosa alterada.

### **8.2 Las ratas prediabéticas presentan alodinia mecánica**

Las ratas tratadas con STZ presentaron una disminución progresiva del 50% de umbral de retiro en la prueba con filamentos de Von Frey hasta alcanzar los valores de alodinia a la semana 24. Esto es compatible con resultados obtenidos en otros estudios donde se muestra que las ratas con prediabetes pueden desarrollar alodinia mecánica<sup>22,89</sup> y con las observaciones hechas en humanos donde se ha visto que los individuos con alteraciones del metabolismo de la glucosa presentan síntomas neuropáticos en mayor proporción que los controles<sup>16</sup>.

### **8.3 Papel del receptor $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> en el dolor por prediabetes en ratas macho**

Hernández-Reyes et. al. (2019) reportó que la aplicación intratecal de L-655,708 producía alodinia en ratas naive y analgesia en ratas con neuropatía diabética<sup>54</sup>. En su trabajo el efecto del fármaco fue bastante marcado, de modo que tras la aplicación de L-655,708 las ratas naive alcanzaron valores considerados como alodínicos, mientras que las ratas diabéticas aumentaron su umbral nociceptivo hasta los niveles de una rata control. En el presente estudio, sin embargo, la aplicación de L-655,708 solo produjo una mejoría parcial de la alodinia en las ratas prediabéticas. En las ratas control los resultados fueron más similares a los obtenidos por Hernandez-Reyes, aunque no se alcanzaron valores considerados como alodínicos. Cabe destacar que el estudio de Hernández-Reyes al igual que

varios de los estudios que valoran el papel de los receptores GABA<sub>A</sub> en la neuropatía fueron realizados en ratas hembra<sup>49,54,55,69</sup>.

Recientemente el grupo de Granados-Soto y col. publicaron dos artículos donde comparan el papel del receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> en el dolor neuropático en ratas hembra y machos. El primero de ellos de 2019, muestra que en un modelo de dolor por fibromialgia el bloqueo de los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> con L-655,708 o TB21007 produce alodinia mecánica en ratas naive y disminuye la alodinia en las ratas con dolor neuropático. Sin embargo, se encontró que el efecto era menor en las ratas macho comparado con las ratas hembra<sup>98</sup>. En un trabajo posterior del 2020 utilizando además hembras ovariectomizadas, llegaron a la conclusión de que estos cambios están influenciados por hormonas sexuales, en específico por los niveles de estradiol<sup>97</sup>. En este estudio se muestra, además, que en machos el daño de un nervio producido por ligadura produce cambios epigenéticos que regulan de manera negativa la expresión de receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> en neuronas del asta dorsal y del GRD<sup>97</sup>. Esto último podría explicar por qué en nuestro trabajo el efecto del L-655,708 es mayor en ratas naive que en ratas con prediabetes. En general nuestros resultados son compatibles con los obtenidos por el grupo de Granados-Soto y apoyarían la teoría de que hay un dimorfismo sexual en la participación del receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> en la alodinia mecánica.

EL L-655,708 es un agonista inverso altamente selectivo para los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub><sup>94,95</sup>. Estudios en modelos heterólogos han mostrado que este compuesto es cuando menos 50 veces más selectivo para el receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> que para cualquier otro receptor GABA<sub>A</sub><sup>94,95</sup>. También se ha mostrado que la K<sub>d</sub> del compuesto oscila entre las concentraciones de 1.7 y 15 nM<sup>94,95</sup>. Con base en esto se podría decir que la dosis administrada a las ratas es muy superior a la recomendada y que se corre el riesgo de bloquear a otros receptores GABA<sub>A</sub>. Sin embargo, estos estudios no toman en cuenta la farmacocinética del medicamento dentro de diferentes tejidos. Por ejemplo, Caraiscos et al. bloqueo la corriente tónica producida por los receptores  $\alpha_5$  en neuronas del hipocampo sin afectar a otros receptores GABA<sub>A</sub> con dosis de 50  $\mu$ M de L-655,708<sup>96</sup>. En la médula espinal

la dosis empleada fue de 15 nmol, sin embargo, se han utilizado dosis de hasta 150 nmol<sup>54,97,98</sup>.

Se ha demostrado que el efecto del L-655,708 sobre la nocicepción se debe al bloqueo de los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> extrasinápticos y no por bloqueo de los receptores sinápticos GABA<sub>A</sub>, lo que les confiere un papel pronociceptivo. No obstante, su función en animales sanos es antinociceptiva. Por ejemplo, Perez-Sanchez et al. (2017)<sup>99</sup> encontró que los ratones mutantes que carecían de la subunidad  $\alpha_5$  no presentaban corriente tónica GABAérgica. Estos ratones además presentaban una mayor sensibilización en la segunda fase del ensayo de formalina en comparación a los controles<sup>99</sup>. Además, un estudio del 2019 realizado por De la Luz-Cuellar et al. encontró que si se aplicaba a una rata sana un agonista parcial de los receptores  $\alpha_5$  como el L-83 de manera simultánea con L-65 se prevenían los cambios en la nocicepción inducidos por este último. Este estudio también demostró que la aplicación de un siRNA contra el receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> inducía alodinia en ratas sanas y analgesia en ratas con dolor neuropático<sup>98</sup>.

Aunado a esto también se cuenta con evidencias electrofisiológicas que descartan una acción inespecífica del L-655,708 a estas dosis. En nuestro laboratorio, utilizando la prueba de excitabilidad de Wall, el cual compara potenciales de acción compuestos evocados antes y después de la aplicación de un estímulo condicionante, que produce la despolarización de las aferentes primarias, se encontró que la aplicación de 15 nmol de L-655,708 incrementó la excitabilidad tónica de las fibras aferentes primarias, sin afectar la despolarización, que se sabe se produce por la activación sináptica de los receptores  $\alpha_{2/3}$ GABA<sub>A</sub>. Este hallazgo demostró que los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> están tónicamente activos en las fibras aferentes primarias y que la dosis aplicada intratecalmente de L-655,708 únicamente bloquea a los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub><sup>54</sup>.

#### **8.4 Alteraciones de la locomoción en ratas prediabéticas**

Los cambios observados en la locomoción de ratas prediabéticas fueron discretos. Tanto a la semana 12 como a la semana 16 se observó una ligera disminución del rango de movimiento de la mayoría de las articulaciones. Sin

embargo, los cambios solo fueron significativos para la articulación del tobillo y solamente durante la fase de apoyo. En las gráficas de trayectoria angular se puede observar que estos cambios están en el contexto de una disminución de la flexión de la articulación.

La disminución del rango de movilidad articular es una alteración común encontrada en pacientes tanto diabéticos como prediabéticos. Además, también lo común es que primero se afecten las articulaciones distales<sup>100</sup>. Esto tiene sentido si recordamos que la neuropatía diabética se desarrolla con un gradiente de severidad que va de distal a proximal. La disminución de la flexión de las articulaciones parece ser una “estrategia biomecánica” para compensar una disminución de la fuerza ejercida por los músculos implicados en la locomoción, lo que estaría dado por pérdida o daño de las fibras motoras<sup>101</sup>. No obstante, estos cambios no son necesariamente resultado de una alteración de las fibras motoras gruesas y pueden estar relacionados a alteraciones del equilibrio y el balance, así como una disminución de la propiocepción y de la percepción de la vibración.<sup>101</sup> Nuestros resultados sugieren que la valoración de la marcha puede ser una prueba útil para detectar cambios asociados a neuropatía aún en estadios tempranos de su presentación.

### **8.5 Efecto de la estimulación del reflejo H a alta corriente en ratas prediabéticas.**

Tanto en modelos murinos como en estudios clínicos es común que la valoración de la DDF se realice en valores de corriente que se encuentran dentro de la fase de ascenso de la curva de reclutamiento del reflejo de Hoffman. La razón para esto es porque se cree que a estos niveles se minimizan factores de confusión, además de que se garantiza que el efecto que se produce es debido a la activación principalmente de las fibras Ia y en menor cantidad de otras fibras aferentes<sup>66</sup>. A pesar de esto hasta donde es de nuestro conocimiento no existen estudios que exploren los cambios en la DDF a diferentes valores de corriente. En base a esto se decidió que se hiciera la valoración de la DDF a dos intensidades de corriente, la que correspondía al 50% de la fase de ascenso de la curva

(intensidad media) y la que correspondía al punto máximo de la misma (intensidad alta), esto con el fin de determinar si existían diferencias significativas.

Como ya se comentó anteriormente solo se observó pérdida de la DDF en las ratas prediabéticas a intensidad alta. El porqué de estos resultados no está del todo claro, sin contar que los datos son limitados. La respuesta a estos hallazgos podría estar en los ya clásicos trabajos de Elwood Henneman. Henneman et al. (1965), encontraron que en gatos descerebrados el estiramiento progresivo del musculo tríceps sural daba lugar al reclutamiento de motoneuronas en base al tamaño de las mismas, reclutándose primero las más pequeñas y posteriormente las de mayor tamaño, en orden creciente. Contrario a lo que se pudiera pensar, cuando aunado al estiramiento del músculo se evocaba un estímulo inhibitorio como por ejemplo la estimulación del nervio peroneo profundo, las primeras motoneuronas en ser silenciadas eran las de mayor tamaño. De esto se concluyó que a pesar de que las motoneuronas pequeñas son más excitables, las grandes son más sensibles a la inhibición<sup>102</sup>. Basado en esto podríamos concluir que en nuestro modelo a una intensidad de corriente alta se reclutarían motoneuronas de mayor tamaño, éstas al ser más sensibles a la inhibición serían también más susceptibles a sus cambios, aunque sean de poca intensidad, caso contrario a lo que pasaría cuando se realiza la estimulación a intensidad media, ya que se estarían reclutando principalmente motoneuronas de menor tamaño, las cuales serían más resistentes a cambios en la inhibición. Esto también explicaría por qué a alta intensidad el porcentaje de DDF a 1 Hz fue superior al 50%.

Otra posible explicación a este fenómeno es que a mayor estimulación se activen otro tipo de fibras aferentes diferentes a las Ia, las cuales por medio de mecanismos neurofisiológicos complejos tengan participación en la regulación de la DDF<sup>66</sup>. Si este fuera el caso, nuestros hallazgos sugerirían alteraciones en estas “vías hipotéticas” mediadas por fibras aferentes de menor tamaño.

Cual sea el caso, la pérdida de la DDF a intensidad alta parece ser una alteración neurofisiológica temprana que se estaría presentando en las primeras fases del desarrollo de la prediabetes. Estas afirmaciones no son tan descabelladas si consideramos que previamente ya se ha reportado que la pérdida de la DDF en

pacientes prediabéticos puede ser inconstante. Por ejemplo, un estudio clínico llevado a cabo en 2022 encontró que pacientes con prediabetes presentaban pérdida de la DDF del reflejo H pero solo a ciertas frecuencias de estimulación (2 y 5 Hz), mientras que a otras frecuencias, la DDF se mantenía (1 y 10 Hz)<sup>103</sup>.

Cabe recalcar que debido a la pandemia por SARS-COV 2 estos estudios no se pudieron completar de manera satisfactoria, siendo la muestra muy pequeña para que los resultados puedan ser significativos, por lo que se requiere aumentar el número de animales prediabéticos para validar los resultados obtenidos.

## 9. CONCLUSIONES

La administración intraperitoneal de estreptozotocina en el periodo neonatal en ratas Wistar macho produce un modelo que emula las alteraciones del metabolismo glicémico observadas en pacientes prediabéticos.

El receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> espinal desempeña un papel antinociceptivo en ratas Wistar macho sanas, aunque en menor proporción a lo reportado en ratas hembra. Por otra parte, este receptor tiene un papel pronociceptivo discreto en las ratas Wistar macho con neuropatía por prediabetes. Por lo que se puede decir que existe un dimorfismo sexual en el rol antinociceptivo del receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>.

Las ratas con prediabetes presentaron una disminución de la flexión del tobillo en la fase de apoyo de la marcha similar a lo reportado en pacientes con neuropatía diabética.

Cuando se evoca el reflejo de H a valores de corriente de alta intensidad, éste es más sensible a los estímulos inhibitorios, así como a los cambios de los mismos, tal como lo muestra la DDF que alcanza un valor del 50% a 1 Hz en ratas control, así como la pérdida de la misma en ratas diabéticas a esta intensidad de corriente. Cosa que no ocurre a valores de corriente de baja intensidad.

Por lo tanto, las alteraciones tanto de la DDF del reflejo H como de la locomoción pueden servir como marcadores tempranos de neuropatía en pacientes con inicio de prediabetes.

## **10.PERSPECTIVAS**

Sería muy importante realizar los experimentos en un mayor número de ratas macho prediabéticas para corroborar los resultados obtenidos. Además, hacer las pruebas de la DDF del RH en animales con mayor tiempo en el estado prediabético.

Para determinar el efecto de las hormonas sería interesante aplicar un inhibidor de la síntesis de testosterona.

Aplicar un siRNA del receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> para corroborar el papel pronociceptivo de este receptor en la alodinia desarrollada por prediabetes.

## 11. REFERENCIAS

1. American Diabetes Association. Diabetes care standards of medical care in Diabetes - 2019. *The Journal of Clinical and Applied Research and Education* 37 (1), 1-24 (2019).
2. Perreault, L. & Færch, K. Approaching pre-Diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications* 28, 226–233 (2014).
3. Abdul-Ghani, M. A., Tripathy, D. & DeFronzo, R. A. Contributions of  $\beta$ -cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care* 29, 1130–1139 (2006).
4. Kaur, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research and Practice* 2014, (2014).
5. Wilson, M. L. Prediabetes: Beyond the Borderline. *Nursing Clinics of North America* 52, 665–677 (2017).
6. Zierler, K. Whole body glucose metabolism. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 276 (3) E409-26 (1999).
7. Albero, R., Sanz, A. & Playán, J. Metabolismo en el ayuno. *Endocrinología y Nutrición* 51, 139–148 (2004).
8. Kowalski, G. M. & Bruce, C. R. The regulation of glucose metabolism: Implications and considerations for the assessment of glucose homeostasis in rodents. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 307, E859–E871 (2014).
9. DeFronzo, R. A. & Ferrannini, E. Regulation of Intermediary Metabolism During Fasting and Feeding. in *Endocrinology: Adult and Pediatric* 1-2, 598-626.e3 (2015).
10. Lillioja, S. *et al.* In vivo insulin action is familial characteristic in nondiabetic Pima Indians. *Diabetes* 11, 1329-35 (1987).
11. Tripathy, D. M Carlsson, P Almgren, B Isomaa, M R Taskinen, & T Tuomi,. Insulin secretion and insulin sensitivity in relation to glucose tolerance: Lessons from the Botnia Study. *Diabetes* 49, 975-80 (2000).
12. Stino, A. M. & Smith, A. G. Peripheral neuropathy in prediabetes and the metabolic syndrome. *Journal of diabetes investigation* 8, 646–655 (2017).
13. Feldman, E. L., Nave, K. A., Jensen, T. S. & Bennett, D. L. H. New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. *Neuron* 93, 1296–1313 (2017).

14. Said, G. Diabetic neuropathy - A review. *Nature Clinical Practice Neurology* 3, 331–340 (2007).
15. Feldman, E. L. Brian C, Rodica P, Douglas W Z , Douglas E W, David L B, Vera B, James W & Vijay V . Diabetic neuropathy. *Nat Rev Dis Primers* 5, (2019).
16. Singleton, J. R., Smith, A. G. & Bromberg, M. B. Increased prevalence of impaired glucose tolerance in patients with painful sensory neuropathy. *Diabetes Care* 24, 1448-53 (2001).
17. Lee, C. Bruce A, Sheena K, Stewart B, Ravi R, Hertz C, Bernard Z, Anthony J H . Peripheral Neuropathy and Nerve Dysfunction in Individuals at High Risk for Type 2 Diabetes : The PROMISE Cohort. 38, 793–800 (2015).
18. Ziegler, D., Rathmann, W., Dickhaus, T., Meisinger, C. & Mielck, A. Neuropathic pain in diabetes, prediabetes and normal glucose tolerance: The MONICA/KORA Augsburg surveys S2 and S3. *Pain Medicine* 10 393-400 (2009).
19. Iannitti, T., Kerr, B. J. & Taylor, B. K. *Behavioral Neurobiology of Chronic Pain. Current topics in behavioral neurosciences* 20 (2014).
20. Grote, C. W., Morris, J. K., Ryals, J. M., Geiger, P. C. & Wright, D. E. Insulin receptor substrate 2 expression and involvement in neuronal insulin resistance in diabetic neuropathy. *Archive of "Experimental Diabetes Research*, 2011, 21–28 (2011).
21. Groover, A. L.. Janelle M, Brianne L, Natalie M, Julie A & Douglas E Exercise-mediated improvements in painful neuropathy associated with prediabetes in mice. *Pain*, 12 2658-2667 (2013).
22. García, G., Gutiérrez-Lara, E. J., Centurión, D., Granados-Soto, V. & Murbartián, J. Fructose-Induced Insulin Resistance as a Model of Neuropathic Pain in Rats. *Neuroscience*, 15, 233-245 (2019)
23. Hughes, R. A. C. Umapathi T, Gray IA , Gregson A, Noori & Pannala N A controlled investigation of the cause of chronic idiopathic axonal polyneuropathy. *Brain*, 8, 1723-30 (2004).
24. King, A. J. F. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*, 166, 877–894 (2012).
25. Eleazu, C. O., Eleazu, K. C., Chukwuma, S. & Essien, U. N. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorder* 12(1):60 (2013).

26. Takada, J. Machad A, Peres S, Brito L, Borges C, Costa M & Fonseca-Alaniz H, Andreotti. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. *Metabolis*, 56, 977–984 (2007).
27. Blondel, O., Bailbe, D. & Portha, B. Insulin resistance in rats with non-insulin-dependent diabetes induced by neonatal (5 days) streptozotocin: Evidence for reversal following phlorizin treatment. *Metabolism*, 39(8), 787-93 (1990)
28. Deuis, J. R., Dvorakova, L. S. & Vetter, I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 1–17 (2017).
29. Bourinet, E. *et al.* Calcium-permeable ion channels in pain signaling. *Physiological Review*, 94, 81–140 (2014).
30. Woolf, C. J. Review series introduction What is this thing called pain? *Journal of Clinical Investigation*, 120, 10–12 (2010).
31. Woessner, J. Overview of Pain : Classification and Concepts. *Weiner's Pain Management: A Practical Guide for Clinicians*, 35–48 (2006).
32. Cohen, S. P. & Mao, J. Neuropathic pain: Mechanisms and their clinical implications. *British Medical Journal (Online)*, 348, 1–12 (2014).
33. Campbell, J. N. & Meyer, R. A. Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron*, 52(1), 77-92 (2006).
34. Coull, J. A. M. Dominic B, Bachand, Prescott S A, Nault M, Attilan, Koninck P & K Yves Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*, 424, 938–942 (2003).
35. Sivilotti, L. & Woolf, C. J. The contribution of GABA(A) and glycine receptors to central sensitization: Disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol*, 72(1), 169-79 (1994).
36. Kandel E, Schwartz J. *Principles Of Neural Science* McGraw-Hill Medical (4<sup>th</sup> ed). Igarss (2014)
37. Bear, M. F., Connors, B. W. & Paradiso, M. A. *Neuroscience: Exploring the brain* 3rd ed. (2007).
38. Todd, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews Neuroscience*, 11, 823–836 (2010).
39. Benarroch, E. E. Dorsal horn circuitry Complexity and implications for mechanisms of neuropathic pain. *Neurology*, 86, 1060–1069 (2016).
40. Lawson, S. N. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, A $\delta$ - or A $\alpha$ / $\beta$ -fibres. *Experimental Physiology*, 87, 239–244 (2002).

41. Sigel, E. & Steinmann, M. E. Structure, function, and modulation of GABAA receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 40224–40231 (2012).
42. Farrant, M. & Nusser, Z. Variations on an inhibitory theme: Phasic and tonic activation of GABA A receptors. *Nature Reviews Neurosciens*, 6, 215–229 (2005).
43. Chua, H. C. & Chebib, M. *GABAA Receptors and the Diversity in their Structure and Pharmacology*. *Advances in Pharmacology*, vol. 79 (Elsevier Inc., 2017).
44. Brickley, S. G. & Mody, I. Extrasynaptic GABA A Receptors: Their Function in the CNS and Implications for Disease. *Neuron*, 73, 23–34 (2012).
45. Melzack, R. & Wall, P. D. Melzack R & Wall P D. Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150, 971-9 (1965).
46. Lee-Kubli, C., Marshall, A. G., Malik, R. A. & Calcutt, N. A. The H-Reflex as a Biomarker for Spinal Disinhibition in Painful Diabetic Neuropathy. *Current Diabetes Reports*, 18(1), 1 (2018).
47. Roberts, L. A., Beyer, C. & Komisaruk, B. R. Nociceptive responses to altered gabaergic activity at the spinal cord. *Life Sciences*, 18, 1667-74 (1986)
48. Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M. & Yaksh, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal Neuroscience Methods*, 53, 55–63 (1994).
49. Jolivalt, C. G., Lee, C. A., Ramos, K. M. & Calcutt, N. A. Allodynia and hyperalgesia in diabetic rats are mediated by GABA and depletion of spinal potassium-chloride co-transporters. *Pain*, 140, 48-57(2008)
50. Van den Pol, A. N., Obrietan, K. & Chen, G. Excitatory actions of GABA after neuronal trauma. *Journal of Neuroscience*, 16, 4283–4292 (1996).
51. Malmberg, A. B., O'Connor, W. T., Glennon, J. C., Ceseña, R. & Calcutt, N. A. Impaired formalin-evoked changes of spinal amino acid levels in diabetic rats. *Brain Reserch*, 1115 , 48-53 (2006).
52. Coull, J. A. Beggs S. Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter M. W. & Koninck Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 438, 1017–1021 (2005).
53. Bravo-Hernández, M. Feria-Morales L. A Torres-López J. E. Cervantes-Durán C, Delgado-Lezama R, Granados-Soto V & Rocha-González V. Evidence for the participation of peripheral  $\alpha 5$  subunit-containing GABAA receptors in GABAA agonists-induced nociception in rats. *European Journal of Pharmacology*, 734 91-7(2014).

54. Hernández-Reyes, J. E.  $\alpha$ 5GABAA receptors play a pronociceptive role and avoid the rate-dependent depression of the Hoffmann reflex in diabetic neuropathic pain and reduce primary afferent excitability. *Pain*, 160, 1448–1458 (2019).
55. Bravo-Hernández, M. Salinas-Abarca A., Vidal-Cantú G. C., Raya-Tafolla G., Elias-Viñas D., Granados-Soto V., Delgado-Lezama R., The  $\alpha$ 5 subunit containing GABAA receptors contribute to chronic pain. *Pain*, 157(3), 613–626 (2016).
56. Sorge, R. E. *et al.* Spinal cord toll-like receptor 4 mediates inflammatory and neuropathic hypersensitivity in male but not female mice. *Journal of Neuroscience*, 31(43), 15450-4 (2011).
57. Dance, B. Y. A. the Pain Gap *Nature*. **567**, 5–7 (2009).
58. Sorge, R. E., Mapplebeck C S, Rosen S, Beggs S & Taves S , Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Natural Neuroscience* 18(8), 1081-3 (2015)
59. Mapplebeck, J. C. S., Beggs, S. & Salter, M. W. Sex differences in pain: A tale of two immune cells. *Pain*, 157 Suppl 1, S2-S6 (2016).
60. Mapplebeck, J. C. S. *et al.* Chloride Dysregulation through Downregulation of KCC2 Mediates Neuropathic Pain in Both Sexes. *Cell Rep*, 28, 590-596.e4 (2019).
61. Hernandez-Leon, A., De la Luz-Cuellar, Y. E., Granados-Soto, V., González-Trujano, M. E. & Fernández-Guasti, A. Sex differences and estradiol involvement in hyperalgesia and allodynia in an experimental model of fibromyalgia. *Hormones Behavior*, 97, 36-43(2018)
62. Yu, S. Pan Y, Kurz MC, Datner E, Hendry PL, Velilla MA, Lewandowski C, Pearson C, Domeier R, McLean SA & Linnstaedt SD. Genes known to escape X chromosome inactivation predict co-morbid chronic musculoskeletal pain and posttraumatic stress symptom development in women following trauma exposure. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 6,415-427 (2019)
63. Doyle, H. H., Eidson, L. N., Sinkiewicz, D. M. & Murphy, A. Z. Sex differences in microglia activity within the periaqueductal gray of the rat: A potential mechanism driving the dimorphic effects of morphine. *Journal of Neuroscience*, 37(12), 3202-3214 (2017).
64. Misiaszek, J. E. The H-reflex as a tool in neurophysiology: Its limitations and uses in understanding nervous system function. *Muscle and Nerve Preprint* 2,144-60 (2003).

65. Pierrot-Deseilligny, E. & Mazevet, D. The monosynaptic reflex: A tool to investigate motor control in humans. Interest and limits. *Neurophysiologie Clinique*, 30(2), 67-80 (2000).
66. Knikou, M. The H-reflex as a probe: Pathways and pitfalls. *Journal of Neuroscience Methods*. 171, 1-12 (2008)
67. Aminoff M.J.. *Aminoff's Electrodiagnosis in Clinical Neurology*, (6th ed) Elsevier Saunders ( 2012).
68. Burke, D., Gandevia, S. C. & McKeon, B. The afferent volleys responsible for spinal proprioceptive reflexes in man. *The Journal of Physiology*, 339,535-52 (1983).
69. Lee-Kubli, CAG; Calcutt, N. Reflex As an Indicator of Spinal Disinhibition in Models of Neuropathic Pain. 155, 250–260 (2015).
70. Jankowska, E., McCrea, D. & Mackel, R. Oligosynaptic excitation of motoneurons by impulses in group Ia muscle spindle afferents in the cat. *Journal Physiology*, 6, 411-25 (1981).
71. Toda, T., Ishida, K., Kiyama, H., Yamashita, T. & Lee, S. Down-regulation of KCC2 expression and phosphorylation in motoneurons, and increases the number of in primary afferent projections to motoneurons in mice with post-stroke spasticity. *PLoS One*,9(12), e114318 (2014).
72. Kakinohana, O Kakinohana O, Hefferan MP, Nakamura S, Kakinohana M, Galik J, Tomori Z, Marsala J, Yaksh TL & Marsala M. Development of GABA-sensitive spasticity and rigidity in rats after transient spinal cord ischemia: A qualitative and quantitative electrophysiological and histopathological study. *Neuroscience* 3, 1569-83 (2006)
73. Matsushita, A. & Smith, C. M. Spinal cord function in postischemic rigidity in the rat. *Brain Reserch*, 19 (3), 395-410 (1970).
74. Sabbahi, M., Etnyre, B., Al-Jawayed, I. & Jankovic, J. H-reflex recovery curves differentiate essential tremor, Parkinson's disease, and the combination of essential tremor and Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neurophysiology*,19(3), 245-251 (2002).
75. Alam, U. *et al.* Diabetic Neuropathy and Gait: A Review. *Diabetes Therapy* 8, 1253–1264 (2017).
76. Varejão, A. S. P. *et al.* Motion of the foot and ankle during the stance phase in rats. *Muscle Nerve* 26, 630–635 (2002).
77. Bernabei, M., Van Dieen, J. H. & Maas, H. Longitudinal and transversal displacements between triceps surae muscles during locomotion of the rat. *Journal of Experimental Biology* 220, 537–550 (2017).

78. Pirker, W. & Katzenschlager, R. Gait disorders in adults and the elderly: A clinical guide. *Wien Klin Wochenschr* 129, 81–95 (2017).
79. Bonnefoy-Mazure, A. & Armand, S. Normal gait in Orthopedic Management of Children with Cerebral Palsy: A Comprehensive Approach. *EFORT open reviews* 22 (12), 448-460 (2015).
80. Mahlkecht, P. Kiechl S, Bloem BR, Willeit J, Scherfler C, Gasperi A, Rungger G, Poewe W, Seppi K. Prevalence and Burden of Gait Disorders in Elderly Men and Women Aged 60-97 Years: A Population-Based Study. *PLoS One* 8(7), e69627 (2013).
81. Hruska, R. E., Kennedy, S. & Silbergeld, E. K. Quantitative aspects of normal locomotion in rats. *Life Science*, 25 (2), 171-179 (1979).
82. Pereira, J. E. Cabrita AM, Filipe VM, Bulas-Cruz J, Couto PA, Melo-Pinto P, Costa LM, Geuna S, Maurício AC, Varejão AS A comparison analysis of hindlimb kinematics during overground and treadmill locomotion in rats. *Behavioural Brain Research* 172 ,212-8(2006).
83. Filipe, V. M. *et al.* Effect of skin movement on the analysis of hindlimb kinematics during treadmill locomotion in rats. *Journal of Neuroscience Methods* 153, 55–61 (2006).
84. Dingwell, J. B., Cusumano, J. P., Sternad, D. & Cavanagh, P. R. Slower speeds in patients with diabetic neuropathy lead to improved local dynamic stability of continuous overground walking. *Journal of Biomechanics* **33**, 1269–1277 (2000).
85. Menz, H. B., Lord, S. R., St George, R. & Fitzpatrick, R. C. Walking Stability and Sensorimotor Function in Older People with Diabetic Peripheral Neuropathy. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 85(2), 245-252 (2004).
86. Almurthi, M. M. Altered walking strategy and increased unsteadiness in participants with impaired glucose tolerance and Type 2 diabetes relates to small-fibre neuropathy but not vitamin D deficiency. *Diabetic Medicine* 34, 839–845 (2017).
87. Barragán-iglesias, Oidor-Chan VH, Loeza-Alcocer E, Pineda-Farias JB, Velazquez-Lagunas I, Salinas-Abarca AB, Hong E, Sánchez-Mendoza A, Delgado-Lezama R, Price TJ, Granados-Soto V . Pharmacological Reports Evaluation of the neonatal streptozotocin model of diabetes in rats : Evidence for a model of neuropathic pain. *Pharmacological Reports* **70**, 294–303 (2018).

88. Bailbe, D. & Portha, B. O. Blondel, D. Bailbe, and B. Portha. In vivo insulin action in normal and streptozotocin-induced diabetic rats *Physiology & Behavior*, 56 787–793 (1990).
89. Koncsos, G. *et al.* Diastolic dysfunction in prediabetic male rats: Role of mitochondrial oxidative stress. *Cardiovasc Diabetol*, 12, H927–H943 (2016).
90. Burgeiro, A. *et al.* Glucose and Lipid Dysmetabolism in a Rat Model of Prediabetes Induced by a High-Sucrose Diet. *Nutrients*, 9(6), 638 (2017).
91. Vatandoust, N. *et al.* Novel High-Fat Diet Formulation and Streptozotocin Treatment for Induction of Prediabetes and Type 2 Diabetes in Rats. *Advanced Biomedical Research*, 7, 107 (2018).
92. Nunes, S. *et al.* Early cardiac changes in a rat model of prediabetes: Brain natriuretic peptide overexpression seems to be the best marker. *Cardiovascular Diabetology*, 12, 44 (2013).
93. Packard, A. E. B., Ghosal, S., Herman, J. P., Woods, S. C. & Ulrich-Lai, Y. M. Chronic variable stress improves glucose tolerance in rats with sucrose-induced prediabetes. 47, 178-88 *Psychoneuroendocrinology*, (2014).
94. Quirk, K. [3H]L-655,708, a novel ligand selective for the benzodiazepine site of GABA(A) receptors which contain the  $\alpha 5$  subunit. *Neuropharmacology* ,35, 1331–1335 (1996).
95. Sur, C., Quirk, K., Dewar, D., Atack, J. & Mckernan, R. Rat and human hippocampal  $\alpha 5$  subunit-containing  $\gamma$ -aminobutyric acid(A) receptors have  $\alpha 5\beta 3\gamma 2$  pharmacological characteristics. *Molecular Pharmacology*, 54, 928–933 (1998).
96. Caraiscos, V. B. Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by  $\alpha 5$  subunit-containing  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors. *Proceedings of the National Academy Sciences of USA*, 101(10), 3662-67 (2004).
97. Franco-Enzástiga, Ú. García, G., Murbartián, J., González-Barríos, R., Salinas-Abarca, A. B., Sánchez-Hernández, B., Tavares-Ferreira, D., Herrera, L. A., Barragán-Iglesias, P., Delgado-Lezama, R., Price, T. J., & Granados-Soto, V. Sex-dependent pronociceptive role of spinal  $\alpha 5$ -GABAA receptor and its epigenetic regulation in neuropathic rodents. *Journal of Neurochemistry*, 156(6), 897-916 (2020).
98. De la Luz-Cuellar, Y. E. *et al.* Blockade of spinal  $\alpha 5$ -GABAA receptors differentially reduces reserpine-induced fibromyalgia-type pain in female rats. *European Journal of Pharmacology*, 858, 1724443 (2019).

99. Perez-Sanchez, J. Lorenzo LE, Lecker I, Zurek AA, Labrakakis C, Bridgwater EM, Orser BA, De Koninck Y, Bonin RP.  $\alpha$ 5GABAA Receptors Mediate Tonic Inhibition in the Spinal Cord Dorsal Horn and Contribute to the Resolution Of Hyperalgesia. *Journal of Neuroscience Research*, 95(6), 1318 (2017).
100. Almurthi, M. M. *et al.* Distal lower limb strength is reduced in subjects with impaired glucose tolerance and is related to elevated intramuscular fat level and vitamin D deficiency. *Diabetic Medicine*, 34, 356–363 (2017).
101. Goldberg, A., Russell, J. W. & Alexander, N. B. Standing balance and trunk position sense in impaired glucose tolerance (IGT)-related peripheral neuropathy. *J Neurol Sci*, 270(1-2), 165-71 (2008)
102. Henneman, E., Somjen, G. & David, A. *EXCITABILITY AND INHIBITIBILITY OF MOTONEURONS OF DIFFERENT SIZES*. *J Neurophysiol*, 28(3), 599-620 (1965).
103. Salinas, L. F., Trujillo-Condes, V. E., Tecuatl, C., Delgado-Lezama, R. & Cuellar, C. A. Impaired rate-dependent depression of the H-reflex in type-2 diabetes, prediabetes, overweight and obesity: A cross-sectional study. *Medicine (United States)*, 101, E31046 (2022).