



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**DIFERENCIAS SEXUALES EN LA EXPRESION DE LAS SUBUNIDADES DEL
RECEPTOR DE GLICINA EN DOLOR INFLAMATORIO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTORA: GABRIELA AMÉSTICA ESCOBAR
PROFESORA GÚIA: DRA. FARMACOLOGÍA TRINIDAD MARIQUEO CANCINO**

**TALCA-CHILE
2021**

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2022

Dedicada a todas las mujeres que me
Antecedieron y las que me acompañan hoy en día,
ustedes son la inspiración para que me siga realizando.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi profesora Tutora por las horas en el laboratorio y todos sus sabios consejos, a el proyecto FONDECYT No. 3170690 del año 2019, ya que sin su ayuda económica no podríamos haber gestionado nuestros experimentos, a mi familia y amigos que me mantuvieron cuerda y me entregaron el amor y la compañía necesaria para llevar a cabo las largas jornadas de estudio. Y a todas las personas que estuvieron en el camino de la investigación de esta tesis, a todos aquellos que con sus conversaciones y horas de discusión ayudaron a darle forma a nuestro proyecto, sinceramente y de todo corazón muchas gracias por contribuir a esta pequeña parte de mí.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	7
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1 Dolor	9
2.2 Sensibilización	11
2.3 Dolor inflamatorio	12
2.4 Glicina, su receptor y el dolor	14
2.5 Diferencias sexuales en el procesamiento del dolor	16
3. OBJETIVO GENERAL	17
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1. Animales de experimentación	18
5.2. Modelo de dolor inflamatorio	18
5.3. Medición del umbral conductual nociceptivo	19
5.4. Western Blots	20
5.5. Análisis de los datos	21
6. RESULTADOS	23
6.1. Análisis de umbral de retiro basal de las ratas	23
6.2. Expresión de subunidad de GlyR en dolor inflamatorio	26
7. DISCUSIÓN	28
8. CONCLUSIÓN	31
REFERENCIAS	32

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vías del dolor: niveles de modulación.....	11
Figura 2: "Ruta de reacciones en el dolor inflamatorio"	13
Figura 3: Modelo de dolor inflamatorio basado en la aplicación de una inyección de Zymozan A en una de las patas traseras	19
Figura 4: Evaluación conductual de la sensibilización al dolor en condiciones basales.	23
Figura 5: Evaluación conductual en el modelo inflamatorio de dolor.....	25
Figura 6: Analisis de la expresion de las diferentes subunidades del rGly en condiciones basales y en dolor.	27

RESUMEN

El dolor inflamatorio involucra diferentes órganos y procesos, en los cuales diferentes moléculas y estructuras se relacionan permitiendo, no solo identificar el lugar y la intensidad del dolor, sino que además cumple una función importante en la activación del sistema de alerta. Al ser un proceso tan complejo e interactuar con tantos factores que pueden modular la forma en la que se experimenta el dolor es que aún no se termina de estudiar de forma completa, por ende, las alternativas de terapia no son integrales ni se ajustan a las necesidades de las personas que lo están experimentando ya que no hay protocolos de diferenciación ni siquiera a nivel sexual ya que en los estudios si bien se sabe que machos y hembras producen moléculas que pueden modular el dolor de forma diferente es por eso que se hace necesario su estudio. El receptor de glicina es una de las tantas moléculas implicadas en el mecanismo del dolor, aun no está estudiado de forma completa ni se ha descrito como es que este se comporta en los procesos del dolor tampoco si es que existe diferencias entre machos y hembras. Sin embargo, en nuestros estudios notamos diferencias claras en la expresión de este en machos y hembras, además que estas últimas tienen un umbral nociceptivo más bajo luego de una lesión inflamatoria inducida por Zymosan A. Las principales diferencias se observaron con respecto las subunidades de GlyR $\alpha 1$ y $\alpha 2$, por lo que se propone que estos pueden estar involucrados en el mecanismo compensatorio para superar la sensibilidad central del dolor.

Palabras Clave: Dolor, Inflamación, Receptor de glicina, Diferencia sexual, Sensibilidad.

1. INTRODUCCIÓN

El dolor fisiológico es un mecanismo que nos ayuda de manera temprana a detectar la presencia de estímulos que pueden ser nocivos en el entorno de los sujetos que lo experimentan. Es una respuesta que es necesaria para la supervivencia de los seres vivos complejos y las consecuencias de no presentar este tipo de reacción desembocan en un problema para poder llevar una vida normal y extensa, es ahí la importancia de comprender su completa fisiología y así poder entender completamente el mecanismo que envuelve al dolor.

El dolor es un proceso desagradable para el quien lo experimenta, en el cual participan múltiples reacciones bioquímicas relativamente bien conocidas. En este entramado de señales los receptores del dolor conocidos como nociceptores tienen un rol protagónico, en donde mediante la conducción de la información que va desde el sitio de origen hasta el sistema nervioso central (SNC) permiten que el sujeto descifre y reconozca la fuente de peligro.

La medula espinal es un lugar importante en la ruta de señalización del dolor, es allí donde se han encontrado una serie de nociceptores que juegan un papel crucial a la hora de codificar la información, ejemplos de estos son los receptores del ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) y de ácido γ -aminobutírico (GABA), los cuales se encuentran ampliamente investigados. Aun así hay todo un universo por descubrir entre las rutas que codifican el dolor, donde se siguen descubriendo nuevas sustancias que juegan un papel en la codificación de este, entre ellos una estructura que aún no se logra descifrar por completo su papel es el receptor de Glicina (rGly), descubierto en la década del 70, que si bien se sabe que cumple un papel importante en la señalización del dolor aún no se conoce como es que este actúa realmente, ni las reacciones con las cuales lleva a cabo su papel de nociceptor en los diferentes contextos en donde se puede desarrollar el dolor.

En una búsqueda necesaria para descifrar las rutas completas del dolor es que se hace imprescindible la investigación de este receptor, para poder descifrar un poco más sobre el misterioso mecanismo de éste, como varía su composición frente a diversos estímulos, cuáles son las señales que desencadena estos cambios y como varían las rutas en diferentes sujetos de experimentación ya sea en diversas situaciones patológicas o en sexo, en donde ya se han descubierto algunas diferencias, que explican las diferencias a la hora de procesar el dolor.

Debido a lo anterior es que es muy necesaria la investigación de este importante evento fisiológico que afecta a muchos seres vivos de manera pasajera o esporádica y que para poder proponer futuras soluciones a estas situaciones es muy importante el saber y entender las rutas y enigmas que se albergan en el dolor.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Dolor

El dolor es más que una experiencia sensorial discriminativa que nos permite conocer entre otras cosas la ubicación, intensidad y duración del estímulo, es un estado que también se caracteriza por desencadenar un estado emocional adverso que además da lugar a una acción. Esta emoción es parte esencial del dolor. El dolor es de por sí estado desagradable y posee la capacidad de tomar nuestra atención y sacarnos de cualquier actividad que estemos desarrollando. Es un proceso que requiere de la participación de diferentes estructuras para su producción, en la periferia participan algunas de estas como los nervios periféricos que son los encargados de enviar el mensaje hasta la medula espinal, este proceso se diferencia del resto de las sensaciones en el sentido que es una comunicación directa en el cual se prescinde de la reunión de la información como los mecanorreceptores, no hay una traducción efectiva de manera temprana de la información por lo que llega de forma directa a los Centros superiores. Sin embargo, este hecho no permite que se pierda la fineza en la entrega de información ya que existen receptores llamados nociceptores que actúan asociados a fibras de calibre fino y están encargados de la activación casi exclusiva por estímulos naturales de gran intensidad. Estos nociceptores tienen una función quimiorreceptora la cual es esencial para el dolor inflamatorio (1).

El dolor se puede dividir en diferentes etapas (Figura 1), la primera es la transducción que comprende la transformación del estímulo en un impulso eléctrico, la segunda hace referencia al periodo en el cual éste estímulo es transportado a el asta dorsal de la medula espinal y es ahí en donde se liberan los neurotransmisores del dolor, como lo son el Glutamato y la sustancia P, para que luego el estímulo cruce al lado contralateral de la medula espinal y viaje a hasta el tálamo y la corteza cerebral para ser procesado. Finalmente se encuentra la etapa de modulación que es en la cual el proceso puede ser inhibido y/o modificado a nivel de la

asta dorsal, también es ahí donde se ubican los principales blancos farmacológicos, para la producción de analgésicos (2)

La transmisión de los mensajes a las astas medulares depende de dos grupos sustancias, los aminoácidos excitadores como el glutamato y los neuropéptidos (Figura 2), los primeros son neurotransmisores como tal, mientras que los segundos modulan los efectos de los primeros. Existen varios neuropéptidos y se ha visto que podrían actuar como neuromoduladores, esto quiere decir que se caracterizan por ser sustancias endógenas que modulan los efectos excitadores o inhibidores de los neurotransmisores (3). Por último, el dolor se clasifica bajo distintos aspectos dependiendo el tiempo, o las implicancias psicológicas de la patología (4,5). Sin embargo, para efectos prácticos vamos a diferenciar 3 tipos de dolor según los mecanismos fisiopatológicos que se ven envueltos en el proceso, donde encontramos el dolor “fisiológico”, el “inflamatorio” y el “neuropático” (1).

En una mirada más amplia actualmente se han hecho estudios no solamente científicos, sino que también sociales sobre las diferencias según el sexo, en el ámbito del dolor si bien se ha medido la percepción en donde se ha encontrado que los machos menos tolerantes al dolor, y una mayor frecuencia del padecimiento de dolor en mujeres por sobre hombres (6), no existe ninguno que caracterice la expresión y regulación de eventos y/o rutas diferenciando el sexo de los investigados.

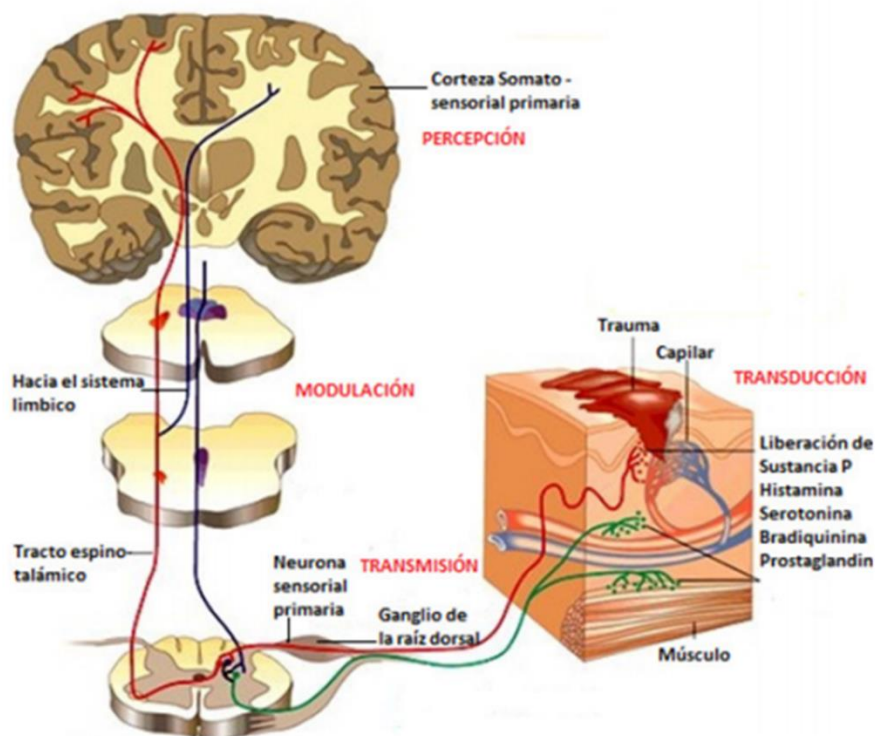


Figura 1: Vías del dolor: niveles de modulación. Extraído de fisiopatología del dolor musculoesquelético crónico, Rico (7).

2.2 Sensibilización

Se denomina sensibilización a todo proceso en el cual hay una disminución en los umbrales de activación de los nociceptores, aferentes primarias y neuronas de segundo orden.

Este es el mecanismo más frecuentemente asociado a dolor patológico. En este proceso se pueden producir algunas situaciones como, que la caída en los umbrales pueda ocurrir como consecuencia de un estímulo muy intenso, lo que llevará a que las fibras estimuladas respondan a estímulos que normalmente no provocan dolor, lo que es conocido como alodinia, o también se puede producir que la aplicación de un estímulo ligeramente

supraumbral desencadene una respuesta muy dolorosa, lo que se conoce como hiperalgesia, en incluso se puede dar que un estímulo de baja intensidad pero con cierta constancia produzca dolor lo que se llama hiperpatía el cual se produce por un efecto conocido como “sumación”. Todo el proceso cuando se produce de manera normal va acompañado de ciertas sustancias que ayudan a potenciar el dolor como es el caso de las interleuquinas, prostaglandinas o la conocida sustancia P que se encargan de la despolarización del resto de las fibras para que así el estímulo llegue a la medula espinal y se transforme en un estímulo eléctrico procesable en el SNC (8)

2.3 Dolor inflamatorio

Se define como aquel que es desencadenado por la estimulación ya sea física, mecánica y/o química de los nociceptores, en los cuales hay una lesión que produce alteraciones que provocan este tipo de dolor. Este puede ser por heridas o enfermedades a la piel y/o estructuras más profundas que se vean comprometidas, tiene una función más bien de protección, en donde se previene y cuida el cuerpo de realizar acciones en donde se pueda salir dañado, y raramente es asociada con problemas psicológicos, aunque estos factores psicológicos tienen mucho que ver a la hora de experimentar el dolor y debido a esto es lo que se diferencia del dolor crónico en donde los factores psicológicos si tienen mucho que ver (4,2) Este tipo de dolor se caracteriza entre diferentes cosas porque produce un estado de hiperalgesia provocado por una disminución de los umbrales , por los que los estímulos se perciben con mayor intensidad, también suele suceder que el dolor se prolonga hasta mucho después de que el estímulo haya desaparecido y que también se produce el fenómeno de alodinia en el cual estímulos muy pequeños producen un dolor intenso.

El proceso de la inflamación es producido por la liberación de diferentes sustancias de las cuales un número importante corresponde a neuroactivos, estas se pueden clasificar según su origen. La lesión en si causa un proceso de liberación de ATP, iones de H, las cuales son las

únicas sustancias estimuladoras en todo este proceso ya que todas las otras son sensibilizadoras, ambos al unirse a sus receptores desencadenan la apertura de canales catiónicos que despolarizan las terminaciones de las fibras (1).

En otro ámbito cuando hablamos de las fibras sensorial debemos nombrar que estas están protegidas por el perineuro, que aísla el tejido endoneuro y dificulta el paso de las moléculas de gran tamaño y de hidrófilas como los péptidos. Cuando se produce la rotura del perineuro, se produce una difusión de estas moléculas lo que produce un efecto en sus dianas potenciales ubicadas en las fibras. Las sustancias alógenas pueden estar en circulación o pueden estar produciéndose a nivel local, su acción se ve potenciada por la contigüidad de las fibras Ad y C con las arteriolas y vénulas (3).

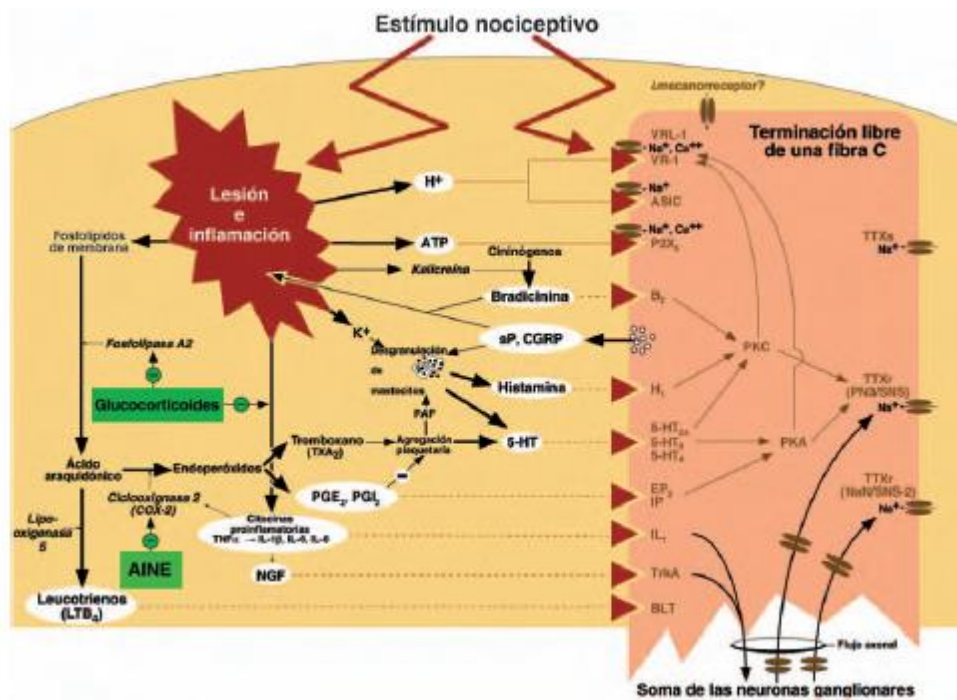


Figura 2: "Ruta de reacciones en el dolor inflamatorio" tomado de Fisiología del dolor, Bars (1).

También existe lo que se conoce como mediadores de la inflamación como lo son las cininas, las citocinas, los prostanooides, las neurotrofinas, péptidos, proteasas, opioides y receptores

como los b-adrenérgicos, NMDA y AMPA/cainato. Todas estas sustancias actúan en conjunto en el proceso tanto de la producción de la inflamación como el de la sensibilización de las fibras.

2.4 Glicina, su receptor y el dolor

La glicina es el aminoácido más simple y pequeño, su rol como neurotransmisor fue descubierto por los científicos Aprison y cols. y Davidoff y cols., que describieron en detalle la distribución de la glicina a través del sistema nervioso central (1,9). Las funciones que precisamente cumple la glicina se deben a su pequeña estructura, lo que le permite tener un papel importante como componente de estructuras proteicas y además actuar en varias funciones celulares como un modificador biológico (función de neurotransmisor) (9).

En su papel como neurotransmisor se ha identificado tanto a la glicina como el GABA como moduladores en el dolor, sin embargo, este último se encuentra ampliamente estudiado a diferencia del primero. Ambos actúan inhibiendo el efecto excitador de las fibras gruesas A β . Sin embargo, en este ámbito la glicina actúa como un inhibidor en el SNC especialmente en la medula espinal, el tallo cerebral y la retina.

Por otra parte, Los receptores de glicina (GlyR) son canales de iones de cloro activados por ligandos pentaméricos implicados en la neurotransmisión inhibitoria rápida en el sistema nervioso central y parte de los receptores de la familia de bucles cys de los canales iónicos de ligando (bucle LGIC-cys)(9). Subunidades alfa de GlyR (α 1, α 2, α 3 GlyRs) forman una arquitectura pentamérica que rodea un poro central. Cada una de estas subunidades muestra un dominio extracelular (ECD), cuatro segmentos transmembrana (TMD1-4) y un gran dominio intracelular (ICD), que conecta TM3 y TM4 y es importante para la modulación de GlyR por las quinasas y las proteínas G. (11, 12,13)

Los agonistas endógenos como la glicina, la β -alanina y la taurina se unen a sitios específicos entre subunidades que generan el cambio conformacional responsable de la apertura del canal. (14) La isoforma de la subunidad GlyR se regula de manera diferencial durante el desarrollo. Existe una mayor proporción de subunidades $\alpha 2$ expresadas durante las etapas embrionarias y neonatales, cambiando a isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 3$ en la edad adulta. (15) Estos canales se pueden ensamblar con una subunidad beta auxiliar (β GlyRs) expresada en etapas maduras de desarrollo, en una estequiometría $2\alpha 3\beta$. (16) Los β GlyR modulan diferentes procesos fisiológicos tales como localización sináptica, tráfico, canalización, interacciones con otras proteínas y modulación farmacológica. (17)

La evidencia creciente sugiere que los cambios en la excitabilidad de las vías nociceptivas periféricas y centrales están involucrados en el desarrollo de la mayoría de las formas de dolor crónico (18,19). En la médula espinal, el desequilibrio de la excitación (mediado por NMDAR glutamatérgicos y AMPAR) y la inhibición (mediados por GABAAR y GlyR) de los neurotransmisores juega un rol crítico en la sensibilización del dolor. La apertura de los receptores NMDA de glutamato activa las vías de señalización dependientes de calcio que promueven la plasticidad de los circuitos centrales asociados con el procesamiento sensorial. Por otro lado, los receptores de glicina inhiben la sensibilización del dolor inflamatorio central a través de una perturbación entre los receptores de prostaglandina E2 (PGE2) y $\alpha 3$ GlyR. La activación del receptor PGE2 induce la fosforilación intracelular $\alpha 3$ GlyR. Los ratones deficientes en receptores EP2 y subunidades $\alpha 3$ GlyR mostraron una hipersensibilidad inflamatoria reducida. También se ha encontrado que el receptor de glicina tiene un rol relevante en el proceso de la sensibilización a nivel de la médula espinal, en donde se le ha asociado a la subunidad $\alpha 3$ un rol más protagónico.

2.5 Diferencias sexuales en el procesamiento del dolor

Existe evidencia de una mayor prevalencia de dolor inflamatorio entre las pacientes femeninas (20,21). La regulación de las hormonas sexuales puede explicar en parte estas diferencias nociceptivas. Por ejemplo, las neuronas DRG de las mujeres mostraron una potenciación de 17- β -estradiol aproximadamente dos veces mayor de la corriente de NMDA (22). Por otro lado, las corrientes evocadas con glicina se redujeron reversiblemente por 17- β -estradiol en las neuronas del hipocampo y la columna vertebral en cultivo (23). Este efecto dependía del tipo de subunidad GlyR. Los receptores compuestos por las subunidades $\alpha 2$ o $\alpha 3\beta$ fueron más sensibles a la modulación de la corriente de 17-b-estradiol.

3. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la variación en la composición del receptor de glicina en medula ósea y la diferenciación en la percepción del dolor inflamatorio en ratas macho y hembras de la especie Sprague-Dawley.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Comparar la composición del receptor de glicina en machos y hembras por medio de la técnica de Western Blots.
- 2.- Analizar los datos obtenidos de las mediciones de la prueba de sensibilidad de Von Frey.
- 3.- Comparar la percepción al dolor inflamatorio en machos y hembras.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Animales de experimentación

Los animales seleccionados fueron ratas Sprague-Dawley adultas, hembras y machos (todas de aproximadamente 250 g) obtenidos de Animal Facility de la Universidad de Chile. Los protocolos de cuidado animal y experimentales para este estudio fueron aprobados por el comité de bioética de la Universidad de Santiago de Chile y siguieron las pautas para protocolos éticos y cuidado de animales experimentales establecidos por los Institutos Nacionales de Salud, MD, EE. UU. Y la Asociación Internacional para el Estudio de Dolor en animales conscientes (1983). Los animales fueron criados y alojados en condiciones controladas de laboratorio, recibieron una ración estándar de comida y agua a voluntad, se alojaron en un ciclo de luz / oscuridad de 12 h a una temperatura ambiente constante de 23 °C

5.2. Modelo de dolor inflamatorio

El dolor inflamatorio fue inducido por una inyección subcutánea de Zymosan A extraído desde la pared de *Saccharomyces cerevisiae* (0,6 mg en 100 µL de solución salina, Z4250 Sigma Aldrich) ubicada en el sitio plantar de la pata trasera derecha de las ratas macho y hembra. El umbral nociceptivo se midió 24 horas antes y 4 horas después de la inyección de Zymosan A en grupos separados de ratas macho y hembra (n = 8-9, respectivamente). (Figura 3).

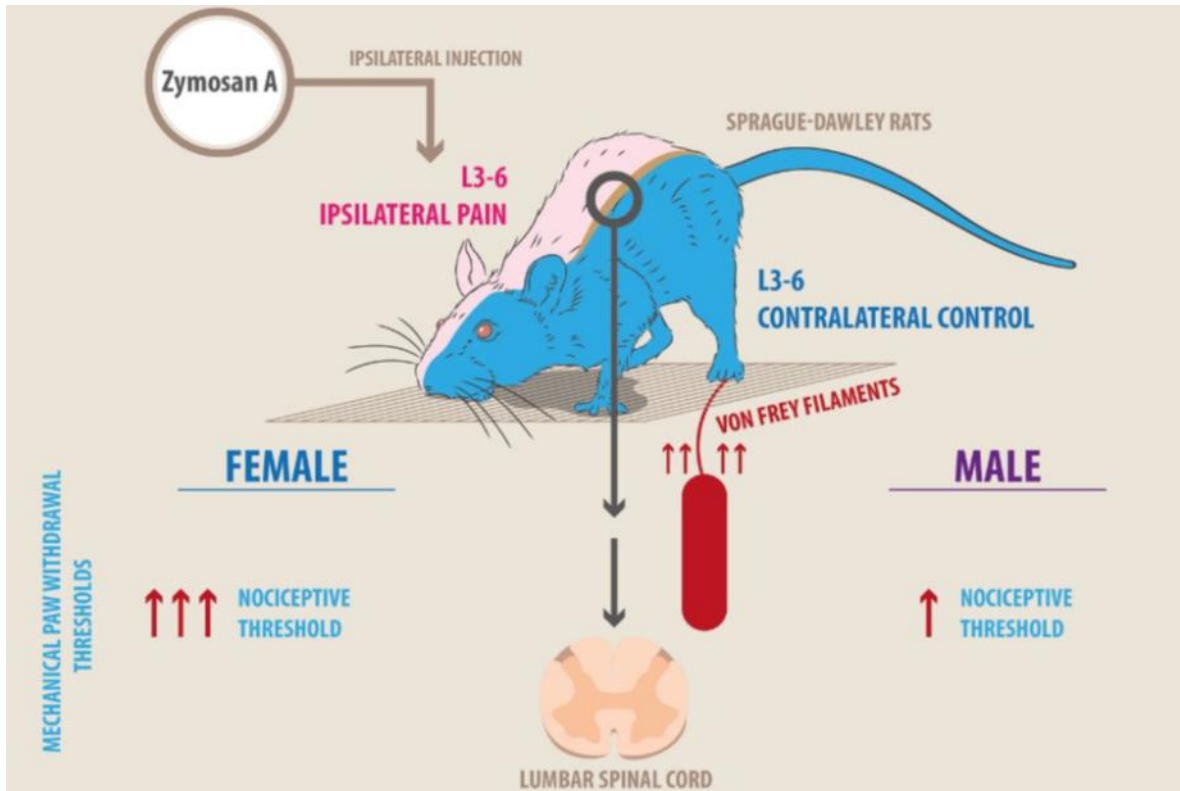


Figura 3: Modelo de dolor inflamatorio basado en la aplicación de una inyección de Zymosan A en una de las patas traseras, creado bajo el marco del proyecto FONDECYT No. 3170690 en el año 2019.

5.3. Medición del umbral conductual nociceptivo

Las ratas se ubicaron en cámaras individuales con pisos de malla de alambre y cubiertas transparentes para la evaluación de la prueba mecánica de Von Frey. Los valores de referencia se midieron tres veces para garantizar la reproducibilidad, y el promedio de los tres valores de referencia se utilizó para el análisis.

El umbral nociceptivo se midió 24 horas antes y 5 horas después de la inyección de Zymosan A en grupos separados de ratas hembra y machos. Se permitió acomodación conductual durante aproximadamente 15 minutos, hasta que se adaptó al entorno. El umbral de retirada mecánica se determinó utilizando el método “*Up and Down*” de Dixon (24). La prueba para cada rata comenzó con un filamento específico de Von Frey para presionar manualmente en la zona intraplantar de cada pata. El orden de los filamentos fue desde los más gruesos (mayor diámetro) a los más delgados, cambiando cuando no hubo respuesta a un filamento gradualmente más delgado. El registro se realizó cuando se observó una respuesta positiva por parte de la rata, registrando también el estímulo más débil con el que la rata subió por su pata.

5.4. Western Blots

Para la realización de los Western Blots se realizó la extracción de entre las vértebras L3 y L6 de la medula espinal de las ratas separando el lado izquierdo y derecho usando el surco medio como referencia y utilizando un portaobjetos para su sección. El lado contralateral de la inyección de Zymosan A se usó como control. El tejido (60 mg) se homogeneizó en 500 µl de tampón de lisis RIPA contenido: Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; 1.0% (v / v) NP-40, 0.5% (p / v) de desoxicolato de sodio, EDTA 1 mM, 0.1% (p / v) SDS disuelto en agua desionizada a un pH de 7.4 con cóctel completo de inhibidor de proteasas (Pierce, Protease Inhibitor Mini Tablets, EDTA-Free Cat. No.88666) y centrifugado a 12000 g durante 10 min. Las proteínas del sobrenadante se cuantificaron usando el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce, Cat. No. 23227) y se sometieron a electroforesis en geles SDS-PAGE al 10%. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Biorad) y se bloquearon con leche al 5% en PBS 1x, Tween 20 al 0,1% durante 1 hora en una superficie con balanceo constante. Posteriormente, las membranas se incubaron con anticuerpos primarios siendo estos los utilizados para identificar cada subunidad:

- La subunidad β del rGly se incubó en mouse monoclonal IgG, Cat. No. 146211, Synaptic System en una proporción de 1:500 durante la noche.
- La subunidad $\alpha 1$ del rGly se incubó en mouse polyclonal IgG, Cat. No. 146111, Synaptic System en una proporción de 1:500 durante la noche.
- La subunidad $\alpha 2$ del rGly se incubó en mouse monoclonal IgG, Cat. No. sc-398964, Santa Cruz Biotechnology en una proporción de 1:500 durante la noche.
- La subunidad $\alpha 3$ del rGly se incubó en mouse polyclonal IgG, Cat. No. AB5472-50UL, Merck en una proporción de 1:500 durante la noche.
- Y finalmente el GAPDH se incubó en mouse monoclonal IgG, Cat. No. Sc-365062, Santa Cruz Biotechnology en una proporción de 1:2500 durante la noche.

Después de 3 lavados con tampón fosfato (PBS 1x) y Tween 20 al 0,1%, las membranas se incubaron durante 2 h con anticuerpos secundarios de rábano picante o conejo conjugados con HRP (sc-516102 y sc-2357 respectivamente, en una dilución de 1:5000, Santa Cruz Biotechnology). La inmunorreactividad de las proteínas se detectó y se visualizó con el reactivo SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate de la marca Thermo Fisher Scientific. Los niveles de GAPDH se utilizaron como control de carga. El resultado de los Western Blots se cuantificó utilizando el programa "ImageJ".

5.5. Análisis de los datos

Todos los datos se presentan como media \pm SEM. Los análisis estadísticos y de figuras se realizaron con el software GraphPad Prism 6. En el caso del Test de Von Frey se utilizó el análisis de varianza de medidas repetidas unidireccionales (ANOVA) además de la prueba post hoc de Bonferroni utilizada para las comparaciones de medias y en el caso de los Western Blots se utilizó ANOVA unidireccional seguido de un test de Bonferroni post hoc

para la medición de expresión de proteínas del receptor de glicina de las distintas subunidades y el Control en ambos test un $P < 0,05$ se consideró significativo.

6. RESULTADOS

6.1. Análisis de umbral de retiro basal de las ratas

El umbral de retirada mecánica según el método de Von frey se midió antes de la inyección de Zymosan A en todas las patas de ratas macho y hembra . Los machos mostraron un umbral de retirada significativamente reducido en las patas delanteras izquierdas ($p < 0,0001$) y las hembras mostraron un umbral mecánico de retirada significativamente menor en las patas delanteras izquierda y derecha en comparación con las patas traseras (pata izquierda $p < 0,0001$; pata derecha $p < 0,05$) (Figura 4).

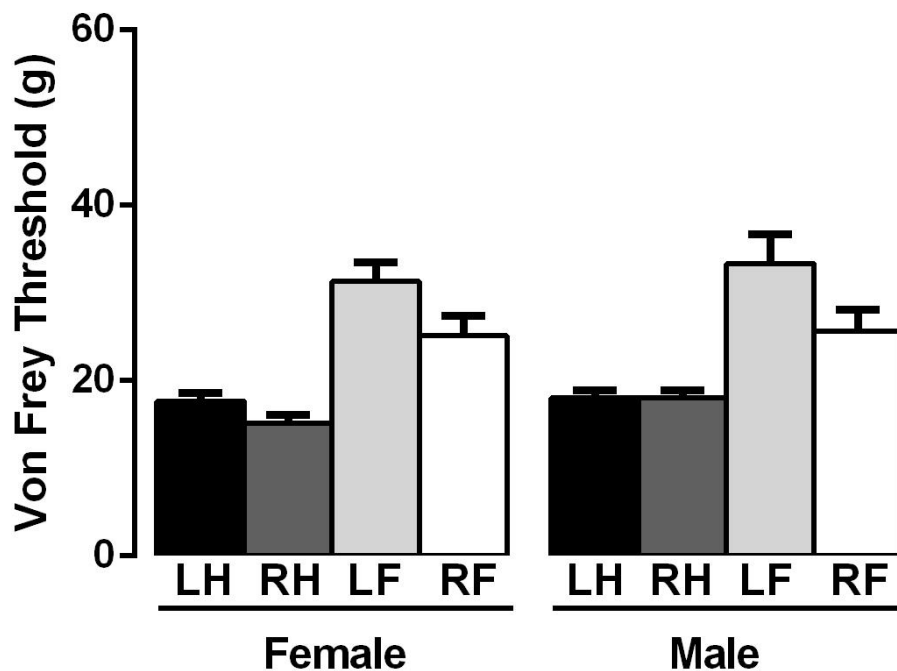


Figura 4: Evaluación conductual de la sensibilización al dolor en condiciones basales. Los datos fueron obtenidos por medio del Test de Von Frey aplicado en las 4 patas tanto de

machos como hembras. Abreviaturas: pata delantera izquierda (LF), pata delantera derecha (RF), pata trasera izquierda (LH), pata trasera derecha (RH).

Para determinar las diferencias de sexo en el dolor inflamatorio, indujimos la inflamación de la pata mediante la inyección de Zymosan A en la pata trasera. La respuesta inflamatoria fue claramente visible después de 4 horas (Figura 3). Por lo tanto, evaluamos la retirada del pie a estimulación táctil inocuo antes y después de 4 horas de inyección de Zymosan A. Aunque ambos sexos mostraron alodinia inducida por Zymosan A, la respuesta de las hembras fue mayor (machos $p < 0.05$; hembras $p < 0.0001$) (Figura 5). Esta evidencia respalda firmemente la idea de que las hembras perciben dolor inflamatorio con un umbral más bajo en comparación con los machos.

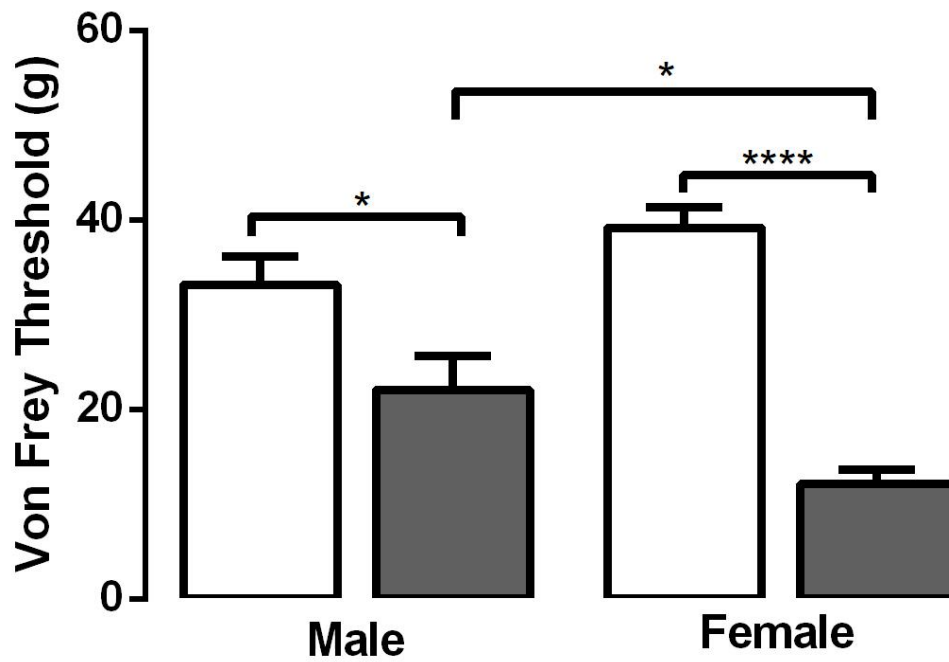


Figura 5: Evaluación conductual en el modelo inflamatorio de dolor. Prueba mecánica nociceptiva de von Fray evaluada en ratas macho y hembras antes y después de 4 horas de inyección de Zyosan A. Los datos se presentan como media \pm SEM, * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$ (Anova unidireccional, prueba post hoc de Bonferroni, $n = 12$).

6.2. Expresión de subunidad de GlyR en dolor inflamatorio

Evaluamos las diferencias entre sexo de los niveles de expresión de las subunidades GlyR en los tejidos de la médula espinal después de 4 horas aplicada la inyección de Zymosan A. En la Figura 6A, se aprecia una banda de Western blot representativa para cada subunidad GlyR en tejidos espinales masculinos y femeninos. El análisis de Western blot demostró un aumento significativo de los niveles de la subunidad $\alpha 1$ GlyR en el tejido espinal masculino y femenino después de la estimulación inflamatoria (masculino $p < 0.01$ y femenino $p < 0.05$), (Figura 6B). Se observaron resultados similares para los niveles de la subunidad β GlyR (macho $p < 0.01$, hembra $p < 0.01$) (Figura 4E). Los niveles de la subunidad $\alpha 2$ GlyR solo aumentaron en el macho ($p < 0.05$) (Figura 4C). se observaron diferencias significativas en los niveles de subunidades $\alpha 3$ en ambos grupos (Figura 4D).

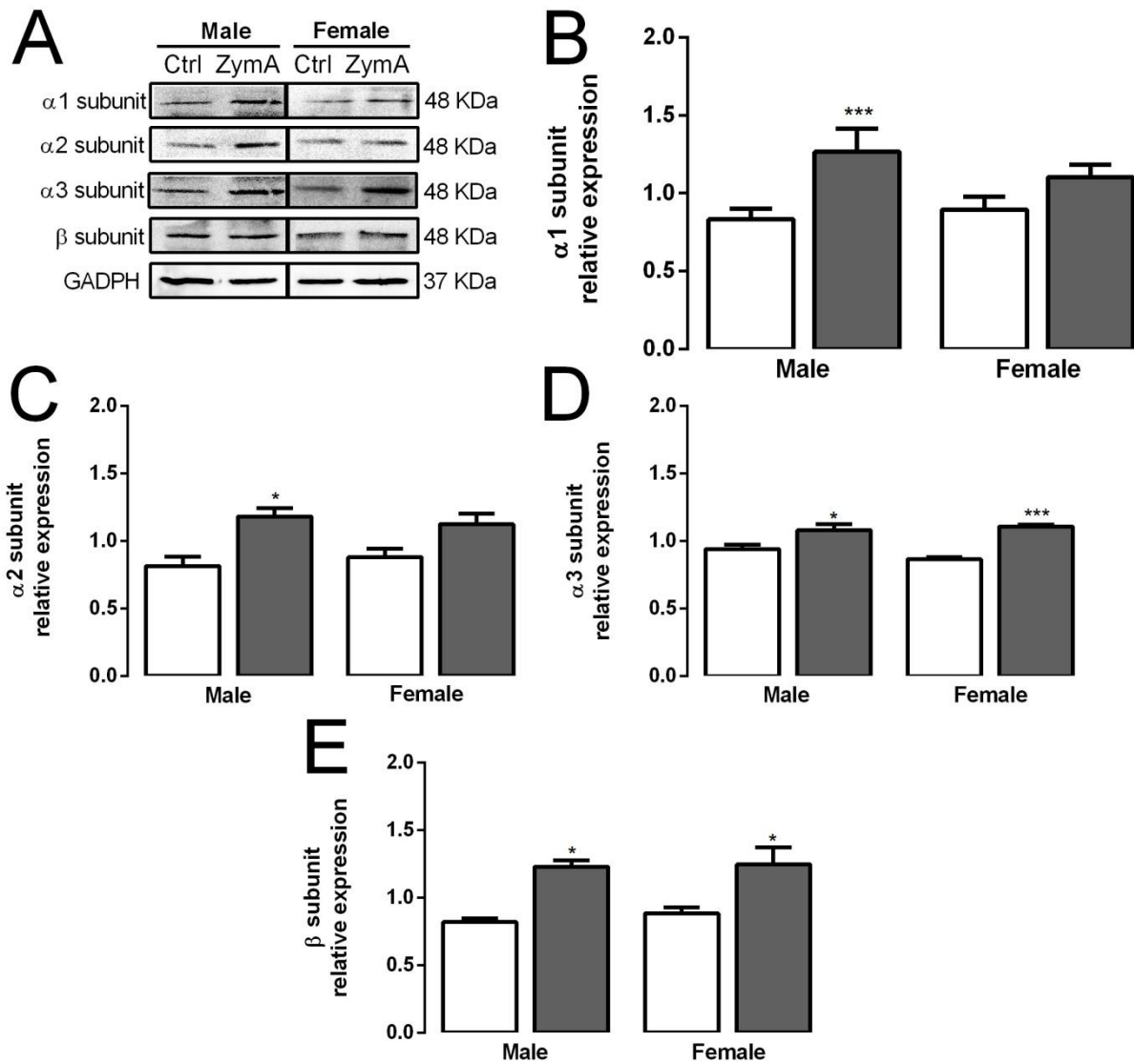


Figura 6: Analisis de la expresion de las diferentes subunidades del rGly en condiciones basales y en dolor. (A)indican las bandas de Western blots representativas de las diferentes subunidades GlyR. (B-E) Comparación de la expresion de subunidades GlyR en animales machos y hembras antes y después de la inyección de Zymosan A. Los datos se presentan como media \pm SEM, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ (ANOVA unidireccional, prueba post hoc de Bonferroni, $n = 8$).

7. DISCUSIÓN

Como se muestra en los resultados anteriormente expuestos, existe una clara diferencia en la respuesta de las ratas a los estímulos nociceptivos aplicados en la prueba de Von Frey, además de esto también se pueden apreciar diferencias en la expresión de las distintas subunidades del rGly, todos estos cambios inducidos por la inyección de Zymozan A. Es bastante conocido el hecho de que las lesiones nociceptivas periféricas inducen a estados de sensibilización crónica en los circuitos nociceptivos centrales (25). Estudios anteriores han demostrado una mayor prevalencia e intensidad del dolor inflamatorio en las hembras (26), con respecto a ello nuestros resultados muestran que, a niveles basales, los machos y las hembras tienen umbrales de retirada similares con una respuesta reducida en las patas delanteras en comparación con las patas traseras. Sin embargo, la respuesta nociceptiva femenina después de la inyección de Zymosan A fue mayor que en los machos, según lo arrojado por la prueba de Von Frey. Esta diferencia de sexo podría atribuirse al menos en parte con la modulación hormonal del dolor (27). Por ejemplo, ha informado que el 17β -estradiol modula la sensibilización periférica al aumentar la expresión del canal TRPV1 y la sensibilización de las neuronas nociceptivas aferentes primarias de ratones hembra (28). Por otro lado, el mecanismo por el cual 17β -estradiol modula la sensibilización central al dolor no se ha estudiado en detalle. Anteriormente se demostró que las corrientes mediadas por NMDAR glutamatérgicas excitadoras fueron potenciadas por el 17β -estradiol. Se encontró que este porcentaje aumentado era mayor en las neuronas DRG de hembras que en los machos ($55 \pm 15\%$ en hembras versus $19 \pm 7\%$ en machos) (18). Además, la amplitud de las corrientes postsinápticas inhibitorias en miniatura GABAérgicas en cortes del hipocampo se redujo en 17β -estradiol a través de un mecanismo que implica una reducción de la agrupación sináptica de la proteína del andamio Gephyrin (26). También, se demostró que el 17β -estradiol inhibía las corrientes provocadas por la glicina en las neuronas del hipocampo cultivadas (18). Sin embargo, no se han explorado las diferencias de sexo en la expresión de las subunidades GlyR en el contexto del dolor inflamatorio.

Nuestros resultados muestran que la inflamación inducida por Zymosan A está asociada con una mayor expresión de la subunidad $\alpha 1$ GlyR en los machos. Este resultado estuvo de acuerdo con los datos reportados previamente que demostraron que el dolor inflamatorio crónico inducido por CFA implicaba una expresión aumentada de la subunidad $\alpha 1$ GlyR (29).

Por otra parte, los machos mostraron cambios significativos en la subunidad $\alpha 2$ GlyR y tanto los machos como las hembras aumentaron la subunidad $\alpha 3$ GlyR y la subunidad β GlyR auxiliar. Un aumento en la expresión de la subunidad $\alpha 2$ GlyR en respuesta al dolor inflamatorio es consistente con los datos reportados en las neuronas radiales de la médula espinal después del dolor neuropático crónico en ratas macho (27). Las neuronas radiales espinales mostraron una mayor frecuencia de mIPSC y constante de tiempo de descomposición después del dolor crónico (27). La mayor frecuencia está relacionada con una mayor liberación de neurotransmisores presinápticos. La forma espacio-temporal de la liberación vesicular de glicina implica la señalización de los receptores cAMP-PKA e IP3 (30) Esta vía juega un papel crítico en la sensibilización del dolor (31).

Finalmente, Borman et al. (32) describieron que los GlyR heteropentaméricos compuesto por las subunidades α y β requiere una concentración de glicina más alta para alcanzar aproximadamente el 50% del efecto máximo sobre la activación del receptor en comparación con los receptores homopentaméricos (EC_{50} para α GlyR y $\alpha\beta$ GlyR es 30 y 54 μ M, respectivamente). De acuerdo con este efecto, nuestros resultados mostraron un aumento de los niveles de subunidades α y β GlyR después de la afección inflamatoria inducida por las inyecciones de Zymosan A. Una subunidad $\alpha 2$ GlyR aumentada puede explicar en parte los cambios en la cinética del tiempo de descomposición. Los $\alpha 2$ GlyR tienen una mayor conductancia actual en comparación con los otros tipos de GlyR homoméricos (32). Además, los $\alpha 2\beta$ GlyR tienen una mayor conductancia en comparación con otros GlyR

heteropentaméricos. Proponemos que en condiciones de dolor, $\alpha 1\beta$ GlyRs, $\alpha 2\beta$ GlyRs y $\alpha 3\beta$ GlyRs podrían aumentarse para compensar la desinhibición inducida por la inflamación. Sin embargo, en ratas hembras solo aumentaron las subunidades $\alpha 3$ y β , por lo tanto, la compensación solo está mediada por $\alpha 3\beta$ GlyRs y no por las corrientes $\alpha 1\beta$ GlyRs y $\alpha 2\beta$ GlyRs. Por lo tanto, es posible proponer que el aumento de la respuesta nociceptiva de las hembras en comparación con los machos podría estar relacionado en parte con diferentes mecanismos compensatorios espinales. Se requerirá más investigación para probar esta hipótesis.

Estos resultados sugieren que el aumento de la respuesta nociceptiva de las hembras puede estar relacionado en parte con diferentes mecanismos compensatorios espinales.

8. CONCLUSIÓN

En resumen, hemos demostrado que las ratas hembra tienen un umbral de abstinencia nociceptivo más bajo después de una lesión inflamatoria inducida por una inyección de Zymosan A. También hemos mostrado diferencias de sexo en los niveles de expresión de las subunidades GlyR $\alpha 1$ y $\alpha 2$, lo que sugiere que estos cambios podrían actuar como un mecanismo compensatorio para superar la sensibilización central al dolor.

REFERENCIAS

1. Bars DL. Fisiología del dolor. Willer J-C, editor. EMC - Anestesia-Reanimación,. p. 1-29. 2005
2. Zegarra P. Physiopathological bases of the pain. 2007. Jaime W, editor. Acta méd. peruana. p. 35-8.
3. Romera E. Neurofisiología del dolor. 2000 Perena MJ, editor. Rev Soc Esp Dolor. p. 11-7.
4. Dagnino J. Definiciones y clasificaciones del Dolor 1994. 3rd ed ed. Ars Medica Revista de ciencias médicas.
5. Pedrajas JM. Bases neuromédicas del dolor. 2008 .Molino Á, editor. Clínica y Salud. p. 277-93.
6. Lund I. Diferencias de sexo y género en el dolor: ¿responden las mujeres a la acupuntura mejor que los hombres? 2007. T L, editor. Revista Internacional de Acupuntura. p. 62-66.
7. Rico M. Fisiopatología del dolor musculoesquelético crónico. 2008. Medwave, vol 8, no 08.
8. Benzon H. Essentials of pain medicine. S R, editor. 1999.
9. Matilla B. La glicina: un nutriente antioxidante protector celular.2002. Mauriz J, editor Nutrición hospitalaria.
10. Duarte S. Inhibitory glycine receptors: an update. 2012. C-M B, editor. J. Biol. Chem.
11. Thompson AJ. The structural basis of function in Cys-loop receptors. 2010. HA L, editor. Q. Rev. Biophys. p. 449–99.
12. Acuña MA. Phosphorylation state – dependent modulation of spinal glycine receptors alleviates inflammatory pain Find the latest version: Phosphorylation state – dependent modulation of spinal glycine receptors alleviates inflammatory pain. 2016. The Journal of clinical investigation vol 126.
13. Yevenes GE. Modulation of glycine-activated ion channel function by G-protein $\beta\gamma$ subunits. 2003 .RW P, editor. Nature Neuroscience. p. 819–24.

14. Du J. Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. 2015. W L, editor. *Nature*. p. 224–9.
15. Becker CM. Glycine receptor heterogeneity in rat spinal cord during postnatal development. 1988 W H, editor. *EMBO J*. Vol. 7, pp. 3717–3726
16. Grudzinska J. The β subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. 2005 In: R S, editor. *Neuron*. Vol. 45, pp. 727–739.
17. Galaz, P., Barra, R., Figueroa, H. et al. 2015. Advances in the pharmacology of IGICs auxiliary subunits. *Pharmacological research*, 101, 65-73.
18. Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G. et al. 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2), 267-284.
19. Culley DJ. Neuroinflamación y sensibilización central en el dolor crónico y generalizado. 2018. W M, editor. p. 1–24.
20. Bartley EJ. Sex differences in pain: a brief review of clinical and experimental findings. 2013. *British Journal of Anaesthesia*. Vol. 111, pp. 52-58
21. Wáng Y. Increased low back pain prevalence in females than in males after menopause age: evidences based on synthetic literature review. 2016. *Quantitative imaging in medicine and surgery* Vol. 6, pp. 199–206.
22. McRoberts, J. Li, J. Ennes, H. et al. Sex-dependent differences in the activity and modulation of NMDA receptors in rat DRG neurons. 2007. *Neuroscience* Vol. 148, pp. 1015–1020
23. Jiang, P. Kong, Y. Zhang, X. et al. Glycine receptor in rat hippocampal and spinal cord neurons as a molecular target for rapid actions of 17- β -estradiol. 2009 *Molecular Pain*. Vol. 5.
24. Dixon, W.J. the ups-and-down method for small samples. *Journal of the American Statical Association*. 1965.p: 967-978
25. Müller F, Heinke B, Sandkühler J. Reduction of glycine receptor-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents in rat spinal lamina I neurons after peripheral inflammation. . 2003. *Neuroscience*. Vol. 122, pp. 799-805.
26. Ruau, D. Liu, L. Clark, J. et al. Sex Differences in Reported Pain Across 11,000 Patients Captured in Electronic Medical Records. 2012. *Journal of Pain*. Vol. 13,

- pp. 228–234.
27. Marrocco, J. & McEwen, B. Sex in the brain: hormones and sex differences. 2016. Basic Research. Vol. 18, pp. 373-383.
 28. Payrits, M. Saghy, E. Cseko, et al. Estradiol Sensitizes the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor in Pain Responses. 2017. Endocrinology. Vol. 158, pp. 3249–3258.
 29. Lu, J. Fan, S. Zou, G. Hou, et,al. Involvement of glycine receptor $\alpha 1$ subunits in cannabinoid-induced analgesia. 2018. Neuropharmacology. vol. 133, p. 224-232.
 30. Mariqueo, T. Agurto, A. Muñoz, B. et al. Effects of ethanol on glycinergic synaptic currents in mouse spinal cord neurons. 2014. Journal of neurophysiology. Vol. 111, pp. 1940-1948.
 31. Li, Z. Cui, D. Qiu, C. et al. Cyclic nucleotide signaling in sensory neuron hyperexcitability and chronic pain after nerve injury. 2019. Neurobiology of Pain, vol. 6, p. 100028.
 32. Bormann, J. Rundström, N. Betz, et al. Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. 1993. The EMBO journal. Vol. 12. 3729-37