
**FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE DOCENCIA
JEFATURA DE POSGRADO**

**Caracterización y validación de un modelo murino
de neuropatía diabética**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN:
MEDICINA MOLECULAR

QUE PRESENTA:
QFB. NORMA BEATRÍZ VELÁZQUEZ SALAZAR

Directora de tesis:
DRA. GABRIELA CASTAÑEDA CORRAL

CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO A 20 DE ABRIL DE 2021

Lugar y fecha de realización

La presente tesis se realizó en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de medicina, en el periodo comprendido de enero 2019 a enero 2021.

Miembros del comité tutorial

Tutor principal: Dra. Gabriela Castañeda Corral

Tutor personal: Dr. Juan José Acevedo Fernández

Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia

Dr. Armando Herrera Arellano

Dra. Luz María Gonzales Robledo

Miembros del jurado de examen

Presidente: Dr. Armando Herrera Arellano

Secretario: Dr. Juan José Acevedo Fernández

1° vocal: Dr. Juan Miguel Jiménez Andrade

2° vocal: Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

3° vocal: Dra. Gabriela Castañeda Corral

Agradecimiento de financiamiento

Para la realización del presente proyecto se contó con el apoyo de la beca de maestría No. 961279 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

DEDICATORIA

A mis padres, Mario Velázquez y Guadalupe Salazar pilares fundamentales en mi vida, gracias por su apoyo incondicional, por brindarme una educación y valores para ser una mejor persona, muchos de mis logros se los debo a ustedes.

Prometo seguir luchando por mis sueños. Los quiero.

A mis hermanos, Rodolfo, Luis y Katya Velázquez por apoyarme y estar siempre conmigo.

A mi tía, Lucia Velázquez gracias por apoyarme y creer siempre en mí.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Gabriela Castañeda**, principalmente gracias por aceptarme en el Laboratorio 9, por creer en mí, brindarme su conocimiento para seguir creciendo en el mundo de la ciencia. Pero más que nada por siempre enseñarme que no solo puedo dar el 100% sino el 200% para ser mejor cada día. Gracias por todo sus enseñanzas las llevare siempre presente.

A mi mejor amiga y compañera **Mónica Ramos** gracias por compartir un mismo sueño, aunque en distinta dirección, por creer en mí y estar siempre conmigo tanto en las buenas y las malas. No tendré con que pagarte tanto apoyo incondicional, por siempre escucharme a pesar de tener tarea, por aconsejarme y siempre darme ánimos cuando sentía que ya no podía seguir. Pero sobre todo te agradezco por siempre soportar mi carácter. Te quiero mucho.

A la mejor compañera de Laboratorio que he tenido, **Jessy Rodríguez** fue un placer conocerte la maestría no hubiera sido igual sin ti, el camino no fue tan fácil pero después de todo esto se resume en estas palabras. Los dos años vivimos días de risas, enojos y tristeza, pero prometí ser leal hasta el final. Gracias por todo te extrañare, aunque lo dudes. Espero y mi curso intensivo te sirva ahora en la especialidad.

A Juanita, gracias porque desde el primer día que llegué al laboratorio 9 me enseñaste hacer más fuerte cada día. Se logro el cometido.

A Misa, gracias por enseñarme las reglas de supervivencia en el laboratorio 9 y por apoyarme cuando no entendía algunas cosas.

A Rocío, gracias por siempre escucharme en días de estrés, ahora te toca estar al frente de varias actividades del laboratorio y demostrar de que estamos hechos los de Guerrero.

A Ricardo y Antares, chicos gracias por su apoyo incondicional en las actividades del laboratorio, saben que cuentan conmigo. Ustedes pueden confiaron en ustedes.

A Mayra, ha sido poco tiempo trabajando contigo, pero gracias por enseñarme y tenerme paciencia en los experimentos.

A Gerardo, gracias por ser un buen compañero de laboratorio. Jamás olvidare el experimento en las ratonas diabéticas-obesas, se fueron con diosito gracias a tú wereque.

A Ely, gracias por siempre preguntarme como me iba en mis experimentos y por llevar comida al laboratorio.

A Elena (comadre), gracias por siempre escucharme, darme ánimos en los días complicados y las porras días antes de mis seminarios.

A la Qca. Felicitas Alanís, muchas gracias por creer en mí incondicionalmente, apoyarme y por brindarme su amistad. Sin usted yo no estaría aquí. La quiero y estimo mucho.

A los químicos del Laboratorio Química Humana de UPACH, muchas gracias por creer en mi desde el primer día que comente mis planes de venir a la maestría.

A mis amigos, Raúl, Eduardo, Karla, Amayrani y Yoana, gracias por siempre apoyarme y por entenderme que no podía estar presente en los convivios durante estos 2 años.

A las ratonas diabéticas-obesas, porque contribuyeron con su vida a la investigación de un nuevo modelo de ND y sin ustedes no hubiera sido posible terminar a tiempo mi tesis.

Al comité tutorial, Dr. Acevedo, Dr. Santa Olalla, Dr. Herrera y Dra. González, gracias por formar parte de mi formación en la investigación y por sus observaciones en cada seminario fueron de gran ayuda para seguir creciendo académicamente.

Al comité revisor de tesis, gracias por su tiempo, observaciones y aportaciones a la revisión de mi tesis.

Por último, a mis seres queridos (Petra Escobar y Mateo Deloya) que ya no están en forma física conmigo, gracias por siempre a ver creído en mí, sé que estarían muy orgullosos de esta meta cumplida. Los extraño.

ÍNDICE

I. ÍNDICE DE FIGURAS	X
II. ÍNDICE DE TABLAS	XI
III. ABREVIATURAS.....	XII
IV. RESUMEN	XVI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades de la diabetes mellitus	1
1.2. Clasificación de la DM	2
1.3. Epidemiología de la DM.....	2
1.4. Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1).....	3
1.5. Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2).....	3
1.5.1. Factores de riesgo de la DMT2	4
1.5.2. Diagnóstico de la DMT2	4
1.5.4. Fisiopatología de la DMT2	5
1.5.5 Complicaciones de la DMT2	7
1.6. Neuropatía diabética.....	7
1.7. Clasificación de la ND.....	8
1.8. Epidemiología de la neuropatía diabética	9
1.9. Factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de ND	10
1.10. Fisiopatología de la ND y el dolor asociado.....	13
1.10.1 Mecanismos de mantenimiento del dolor en la ND	16
1.10.2. Sensibilización periférica.....	17
1.10.3. Sensibilización central.....	21
1.10.4. Contribución de las alteraciones microvasculares al daño nervioso ..	25
1.11. Diagnóstico de la ND	26
1.11.1. Prueba de monofilamentos Semmes-Weinstein (SWME) de 10g	27
1.11.2. Diapasón de 128 hertz (Hz)	28
1.11.3. Prueba de sensación de “pinprick”	28
1.11.4. Reflejo aquileo	29
1.11.5. Prueba de umbral de percepción de vibración	29
1.12. Tratamiento.....	29
1.12.1. Primera línea de tratamiento	32

1.12.2. Segunda línea de tratamiento	35
1.12.3. Tercera línea de tratamiento	37
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	38
2.1. Modelos animales de neuropatía diabética.....	38
2.1.1. Modelos de neuropatía en roedores con DMT1	41
2.1.2. Modelos de neuropatía en roedores con DMT2	48
3. JUSTIFICACIÓN	58
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	60
5. HIPÓTESIS	60
6. OBJETIVOS	61
6.1. Objetivo general.....	61
6.2. Objetivos específicos	61
7. MATERIAL Y MÉTODOS	62
7.1. Animales	62
7.2. Fármacos.....	62
7.3. Inducción de DMT2.....	62
7.3.1 Inducción de obesidad	63
7.3.2 Inducción de disfunción de las células β -pancreáticas con dosis bajas de STZ	64
7.3.3. Seguimiento de peso y de los niveles de glucosa en sangre	66
7.3.4. Seguimiento de los niveles de glucosa en sangre	66
7.3.5 Curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG)	67
7.3.6 Curva de tolerancia a la insulina (CTI)	67
7.3.7 Cuantificación de insulina en suero.....	67
7.3.8 Cálculo del Índice de HOMA 2	68
7.4. Cuantificación de alodinia por el método up and down.....	68
7.5 Evaluación del efecto antialodínico de fármacos utilizados en el tratamiento del dolor neuropático	70
7.6 Análisis estadístico	72
8 RESULTADOS	73
8.1. Implementación del modelo de DMT2	73
8.1.1. Seguimiento de peso corporal.....	73
8.1.2. Seguimiento de glucosa capilar en ratones C57	77

8.1.3. Curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG)	78
8.1.4. Curva de tolerancia a la insulina (CTI)	79
8.1.5. Cuantificación de insulina en suero.....	82
8.2. Caracterización del curso temporal de alodinia mecánica en ratones con DMT2.....	83
8.3. Validación del modelo con diferentes fármacos utilizados actualmente en el tratamiento del dolor neuropático	85
9. DISCUSIÓN	87
10. CONCLUSIONES.....	93
11. PERSPECTIVAS.....	94
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
13. ANEXO.....	123

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de la neuropatía diabética en algunos países del mundo...	10
Figura 2. Mecanismos inducidos por la hiperglucemia crónica y que se propone que inducen disfunción nerviosa.	14
Figura 3. Sensibilización periférica.....	19
Figura 4. Prueba de monofilamento de 10 g.	28
Figura 5. Criterios comparativos para modelos humanos y roedores en la neuropatía diabética.....	40
Figura 6. Inducción de obesidad y DMT2 en ratones hembra de la cepa C57.....	65
Figura 7. Comprobación de la Inducción de DMT2.	66
Figura 8. Evaluación del seguimiento del desarrollo de alodinia mecánica en ratones diabéticos-obesos.	69
Figura 9. Evaluación del efecto antialodínico de los fármacos utilizados en el tratamiento del dolor neuropático en ratones con alodinia inducida por DMT2.	71
Figura 10. Curso temporal del peso corporal de ratones hembra C57 de las cuatro condiciones experimentales.	74
Figura 11. Fotografías representativas de los ratones alimentados con dieta estándar y dieta de cafetería en la semana 24 post-STZ.....	75
Figura 12. Peso de tejidos, diseccionados en la semana 24 post-estreptozotocina, de ratones de las 4 condiciones experimentales.	76
Figura 13. Curso temporal de los niveles de glucosa ratones hembra C57 de las cuatro condiciones experimentales.	77
Figura 14. Curva de tolerancia oral a la glucosa 4 y 24 semanas post-STZ.	79
Figura 15. Curva de tolerancia a la insulina (CTI) 4 y 24 semanas post-STZ.	81
Figura 16. Niveles de insulina e índice HOMA-IR2 en la semana 24 post-STZ.	82
Figura 17. Caracterización del desarrollo de alodinia mecánica.	84
Figura 18. Efecto del tratamiento agudo con fármacos utilizados en el tratamiento del dolor neuropático en ratones con alodinia mecánica inducida por DMT2.	86

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de índice de masa corporal según la OMS.....	4
Tabla 2. Criterios de diagnóstico de diabetes mellitus según la ADA 2020.....	5
Tabla 3. Clasificación de las neuropatías diabéticas.....	8
Tabla 4. Factores de riesgo de la polineuropatía simétrica distal.....	11
Tabla 5. Mecanismos que contribuyen al dolor en la ND.....	17
Tabla 6. Pruebas sensoriales empleadas en el diagnóstico de la ND.....	26
Tabla 7. Terapia oral sintomática de la neuropatía diabética.....	31
Tabla 8. Pautas actuales para el tratamiento de la neuropatía diabética dolorosa.	31
Tabla 9. Clasificación de los opioides según su potencia.....	35
Tabla 10. Modelos de neuropatía en roedores con DMT1 inducidos por una sola dosis de STZ.....	42
Tabla 11. Modelos de neuropatía en roedores con DMT1 inducidos por múltiples dosis bajas de STZ.....	44
Tabla 12. Modelos de neuropatía en modelos genéticos de DMT1.....	47
Tabla 13. Modelos de neuropatía en ratones con DMT2 inducida por alteraciones en la Leptina.....	50
Tabla 14. Modelos de neuropatía diabética en ratones con DMT2 inducida por una dieta alta en grasas.....	52
Tabla 15. Modelos de neuropatía diabética en raedores con DMT2 inducida por la combinación de dieta alta en grasas y dosis bajas de estreptozotocina.....	55
Tabla 16. Contenido de la dieta estándar de roedor Rodent Diet® 500I equivalente a 4.12 Kcal/Kg.....	63
Tabla 17. Alimentos que componen el menú semanal de la dieta de cafetería (equivalente 8.24 Kcal/Kg).....	64

III. ABREVIATURAS

4-HNE	4-hydroxynonenal
5-TH	Serotonina
a.C	Antes de Cristo
AACE	Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos
AAN	Academia Americana de Neurología
ABC	Área Bajo la Curva
ADA	Asociación Americana de la Diabetes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ADP ribosa	Vía de poli
AGEs	Productos finales de glicación avanzada
AMDCC	Consortio de Modelos Animales de Complicaciones Diabéticas
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AP-1	Proteína activadora 1
ARNm	ARN mensajero
ASICs	Canales iónicos sensibles ácido
ATC	Antidepresivos tricíclicos
ATP	Adenosín trifosfato
Ca²⁺	Calcio
CaMK	Proteína quinasa dependiente de Ca ²⁺
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CCL2	Ligando 2 quimiocina
CCL5	Ligando 5 quimiocina
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
COX	Ciclooxigenasa
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CTI	Curva de tolerancia a la insulina
CTOG	Curva de tolerancia oral a la glucosa
CXCL1	Ligando 1 quimiocina
DC	Dieta de cafetería
DE	Dieta estándar
DGR	Ganglio de la raíz dorsal
DiaComp	Consortio de Complicaciones Diabéticas
DIO	Obesidad inducida por dieta
dL	Decilitros
DM	Diabetes mellitus
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DRG	Ganglio de la raíz dorsal
EET	Ácido epoxieicosatrienoico
EFNS	Federación Europea de Sociedades Neurológicas
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

EVA	Escala visual analógica
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
fMIF	N-formilmetionina-leucil-fenilalanina
FRP1	Receptor 1 del péptido formilo
g	Gramos
GLUT 2	Transportador de glucosa 2
GPCRs	Receptor acoplado a proteína G
H⁺	Protón de Hidrógeno
H₂O₂	Peróxido de hidrogeno
HbA1C / A1C	Hemoglobina glicosilada
HCl	Ácido clorhídrico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HETE	Hidroiecosatetraenoico
Hh	Hedgehog
HO	Hidroxilo
Hz	Hertz
i.p	Vía intraperitoneal
IASP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
IDF	Federación Internacional de la Diabetes
IENFD	Densidad de fibras nerviosas intraepidérmicas
IGT	Neuropatía por intolerancia a la glucosa
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de masa corporal
iNOS	Sintasa inducible del óxido nítrico
IRSN	Inhibidores de la recaptura de serotonina y norepinefrina
ISRS	Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina
JNK	Quinasas c-Jun N-terminal
K⁺	Potasio
Kcal	Kilo calorías
Kg	Kilogramos
L	Litros
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LOX	Lipoxigenasa
m²	Metros cuadrados
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCV	Velocidad de conducción del nervio motor
MG	Metilglioxal
mg	Miligramos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mmol	Milimol
MMP	Potencial de membrana mitocondrial
mol	Mol

N₂O	Óxido nitroso
NA	Noradrenalina/ Norepinefrina
Na⁺	Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
Nav	Canales de sodio dependientes de voltaje
NCV	Velocidad de conducción nerviosa
ND	Neuropatía diabética
NFG	Factor de crecimiento nervioso
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NICE	Instituto Nacional de Excelencia Clínica
nM	Nanomol
NMDA	N-metil-D-aspartato
NNH	Número necesario para hacer daño
NNT	Número de pacientes que es necesario tratar
NO	Óxido nítrico
NO₂	Dióxido de nitrógeno
NOD	Diabéticos no obesos
NOM	Norma Oficial Mexicana
NPH	Insulina humana
O₂	Superóxido
OMS	Organización Mundial de la Salud
P2X₃	Receptor ionotrópico purinérgico 3
p38	Proteína quinasa activada por mitógenos p38
PARP	Polimerasa
PCR	Proteína C reactiva
pg	Picogramos
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PSD	Polineuropatía simétrica distal
RI	Resistencia a la insulina
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
RO₂	Peroxilo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RTK	Receptor tirosina quinasa
RVM	Médula rostral ventromedial
SCV	Velocidad de conducción nerviosa sensorial
SEM	Error estándar de la media
SGPA	Sustancia gris periacueductual
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNAP	Potencial de acción del nervio sensorial
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SP	Sustancia P
STZ	Estreptozotocina
SWME	Semmes-Weinstein

T CD4⁺	Linfocitos T cooperadores
T CD8⁺	Linfocitos T citotóxicos
T1A	Diabetes mellitus tipo 1 autoinmune
T1B	Diabetes mellitus tipo 1 idiopática
TDML	Latencia motora distal de la cola
TLRs	Receptor tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TRPA1	Canal catiónico del potencial receptor transitorio, subfamilia A
TRPV1	Canal catiónico potencial del receptor transitorio 1
TSNCV	Velocidad de conducción nerviosa sensorial de la cola
VEH	Vehículo
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPT	Umbral de percepción de vibración
Wnt	Wingless e Int
αHL	α -hemolisina

IV. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia crónica, que afecta aproximadamente al 9.3% de los adultos a nivel mundial. De estos el 90% de los casos corresponde a pacientes con DMT2. La DM favorece el desarrollo de complicaciones a corto o largo plazo como consecuencia de la hiperglucemia crónica. La neuropatía diabética (ND) es la complicación de la DM más prevalente ya que afecta aproximadamente al 50% de los pacientes. La ND se produce por afectación de la función de los nervios periféricos que inervan los tejidos y se manifiesta por alteraciones sensoriales como disestesias, parestesias, y dolor. Entre estos síntomas el dolor es el síntoma más debilitante y difícil de tratar. Esto se debe en parte a que no se conocen completamente los mecanismos fisiopatológicos que subyacen la ND. Por lo tanto, es necesario contar con modelos animales que se asemejen más a la condición humana y que permitan identificar los mecanismos involucrados en la perpetuación del dolor y con ello la búsqueda racional de nuevas terapéuticas para su tratamiento. Actualmente existen diversos modelos animales de ND ya sea genéticos o inducidos por dietas comerciales altas en grasa y carbohidratos, o la combinación de estos. Sin embargo, algunos de estos están poco disponibles o son muy caros, por lo que no son accesibles para todos los investigadores. Por lo anterior, en el presente trabajo se implementó un modelo murino de DMT2 en donde se caracterizó el curso temporal de alodinia mecánica, como principal manifestación de ND. Además, se validó el modelo utilizando fármacos del tratamiento actual del dolor neuropático.

MATERIALES Y MÉTODOS: Se utilizaron ratones hembra C57 de 8 semanas de edad los cuales fueron alimentados por 32 semanas con dieta estándar de roedor o una dieta de cafetería, 8 semanas después de iniciada la dieta se realizó la administración de 4 dosis bajas de estreptozotocina (STZ; 30 mg/Kg/día, i.p.). Para determinar el establecimiento de DMT2 se realizó el seguimiento de peso corporal, niveles de glucosa durante todo el periodo experimental, curvas de tolerancia a la glucosa y a la insulina a las 4 y 24 semanas post-STZ, y cuantificación de insulina sérica 24 semanas post-STZ. La caracterización del curso temporal de alodinia mecánica se realizó mediante filamentos de von Frey, mientras que la validación se realizó en ratones con alodinia establecida (22-24 semanas post-STZ).

RESULTADOS: Los ratones del grupo DC+STZ presentaron una ganancia significativa de peso, niveles de glucosa casual ≥ 200 mg/dL, niveles de glucosa ≥ 200 mg/dL dos horas después de una carga de glucosa, resistencia a la insulina (índice HOMA IR2 >2) e hiperinsulinemia a las 24 semanas post-STZ. Además, desarrollaron alodinia mecánica desde la semana 16 y hasta la semana 24 post-STZ. Finalmente, la alodinia mecánica fue revertida significativamente con los antidepresivos amitriptilina y duloxetina (30 mg/Kg), los antiepilépticos gabapentina y carbamazepina (100 mg/Kg) y el opioide débil tramadol (30 mg/Kg) pero, no con el AINE, diclofenaco (50 mg/Kg).

CONCLUSIÓN: Se logró la implementación y validación de un modelo de neuropatía diabética en ratones con DMT2. La alodinia mecánica observada se revirtió con la terapéutica utilizada actualmente en la clínica. Este modelo podría ser útil para el estudio de los mecanismos involucrados en la ND, así como para la búsqueda de nuevos fármacos para su tratamiento.

“Caracterización y validación de un modelo murino de neuropatía diabética”

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de la diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) es un término que se utiliza para referirse a un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia crónica, debido a defectos en la secreción o acción de la insulina, o ambas. La hiperglucemia se refiere al incremento de los niveles de glucosa en sangre por arriba de 126 mg/dL en condiciones de ayuno (1). Las principales manifestaciones clínicas o síntomas clásicos de la DM, además de la hiperglicemia, son poliuria (aumento en la micción), polifagia (hambre excesiva) y polidipsia (sed excesiva), asimismo se presenta una pérdida de peso severa sin explicación y otras veces visión borrosa (2).

La DM fue conocida por los humanos desde la antigüedad. El registro más antiguo se encuentra en el papiro de Ebers, el cual es uno de los tratados médicos egipcios más antiguos ya que data de hace aproximadamente 1550 años a.C. En este registro se describe una enfermedad que se caracteriza por el aumento excesivo de la micción o poliuria. Otro dato importante fue la observación de que las hormigas se acumulaban en la orina de ciertas personas, y esta fue la forma en que se describe en los antiguos registros hindúes que se detectaba la diabetes (3). Años después el médico griego Areteo de Capadocia fue el primero en describir la condición utilizando el término “diabetes”. Este término deriva del griego “pasar” o “sifón” en referencia a la poliuria. Más de un milenio después, en el año 1675, el médico británico Thomas Willis notó el sabor dulce de la orina de los pacientes con diabetes, por lo que agregó el término “mellitus” que significa “dulce de miel”, con el fin de identificar esta condición y otras causas que cursan con micción excesiva. Un siglo después, en el año 1776, el médico británico Matthew Dobson demostró que el sabor dulce de la orina se debía a un incremento de la excreción de azúcar (glucosa). Adicionalmente, también identificó el incremento de glucosa en sangre a lo que denominó hiperglucemia (4, 5).

1.2. Clasificación de la DM

Actualmente, los diferentes tipos de DM se clasifican en las siguientes categorías:

1. Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1): Se caracteriza por destrucción inmunológica de las células β pancreáticas, que conducen a una deficiencia parcial o absoluta de insulina.
2. Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2): Se caracteriza por una alteración progresiva en la secreción, acción de la insulina o ambas que conduce a resistencia a la insulina e hiperinsulinemia secundaria.
3. Diabetes mellitus gestacional (DMG): Se presenta como intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante el tercer trimestre del embarazo.
4. Tipos específicos de diabetes debido a otras causas: en esta categoría se incluyen las formas menos comunes de DM, como por ejemplo, síndromes de diabetes monogénica (diabetes neonatal y diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes), enfermedades del páncreas exocrino (fibrosis quística y pancreatitis) y diabetes inducida por fármacos o sustancias químicas (por ejemplo glucocorticoides, o antivirales utilizados en el tratamiento del VIH/SIDA) (6).

La importancia de identificar el tipo de DM que presenta el paciente radica en identificar la etiología, con la finalidad de determinar la terapéutica adecuada (7).

1.3. Epidemiología de la DM

La DM es un problema de salud pública a nivel mundial con una prevalencia que incrementa cada año. La Federación Internacional de la Diabetes (IDF) en el 2019 estimó una prevalencia de 9.3% en adultos de 20 a 79 años, es decir aproximadamente 463 millones de diabéticos en todo el mundo. En este mismo sentido se prevé que la prevalencia de la DM en el 2030 incrementará a 578.4 millones de adultos, y a 700.2 millones en el 2045 (8). Estas estimaciones incluyen tanto a la DMT1 como a la DMT2. Sin embargo, es de suma importancia mencionar

que la DMT1 representa aproximadamente el 10% de los casos del total de diabéticos, mientras que el 90% de los casos corresponden a DMT2 (9, 10).

México se encuentra entre los 10 países con mayor número de personas que viven con diabetes, ocupando el sexto lugar a nivel mundial. En el 2018 la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2018) reportó una prevalencia de 10.3% (8.6 millones de diabéticos) en la población de 20 años y más, con una mayor prevalencia en mujeres (11.4%) que en hombres (9.1%). Adicionalmente, la ENSANUT 2018 reportó que las 5 entidades federativas con mayor prevalencia de personas diabéticas son: Campeche 14%, Tamaulipas 12.8%, Hidalgo 12.8%, Ciudad de México 12.7% y Nuevo León 12.6% (11).

1.4. Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1)

La DMT1 es una enfermedad crónica causada por la destrucción autoinmune de las células β -pancreáticas, que se encargan de la producción y secreción de insulina, por linfocitos T CD4⁺, TCD8⁺ y macrófagos que se infiltran en los islotes (9, 12). Lo anterior resulta en una producción muy baja o nula de insulina. Se distinguen dos subtipos de DMT1. La de mayor incidencia es la DMT1 autoinmune (T1A) y la de menor incidencia es la DMT1 idiopática (T1B) (13). Es importante mencionar que la etiología de la DMT1 incluye factores genéticos y ambientales. Su inicio es principalmente durante la infancia en niños de entre 11 y 14 años. Sin embargo, actualmente su incidencia ha aumentado en niños menores de 5 años (14). Los síntomas de la DMT1 en los niños son poliuria, polidipsia y pérdida de peso; y aproximadamente un tercio presenta cetoacidosis diabética. En los adultos, los síntomas clásicos no se presentan como en los niños (15).

1.5. Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)

La DMT2 se produce por una disfunción progresiva de las células β -pancreáticas llevando así una deficiencia en la secreción o acción de la insulina o ambos (10). La DMT2 se presenta con mayor prevalencia en adultos mayores, sin embargo, en la actualidad la incidencia en niños y jóvenes adultos ha aumentado debido a la obesidad, inactividad física y una dieta inapropiada (8).

1.5.1. Factores de riesgo de la DMT2

Los principales factores de riesgo para desarrollar DMT2 son los factores ambientales que incluyen dietas hipercalóricas pobres en fibras y vegetales, el alto consumo de bebidas endulzadas, sedentarismo y tabaquismo (16). Es de suma importancia mencionar que debido al abuso de dietas hipercalóricas se estima que aproximadamente el 90% de los pacientes con DMT2 son obesos (10). La obesidad es un problema de salud pública a nivel mundial, sus principales causas son factores genéticos, nutricionales y metabólicos. La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser deletérea para la salud y frecuentemente se diagnostica a través del índice de masa corporal (IMC). El IMC es una razón matemática que asocia la masa y la talla de un individuo y se calcula dividiendo el peso en kilogramos por la altura al cuadrado (Kg/m^2). Los valores de IMC nos permiten clasificar el peso de una persona según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en las siguientes seis categorías en la tabla 1 (17).

Tabla 1. Clasificación de índice de masa corporal según la OMS. Modificado de (17).

Valor de IMC (Kg/m^2)	Categoría
<18.5	Peso bajo
18.5 a 24.9	Peso normal
25.0 – 29.9	Sobrepeso
30.0 – 34.9	Obesidad I
35.0 – 39.9	Obesidad II
>40.0	Obesidad III

1.5.2. Diagnóstico de la DMT2

El diagnóstico de la DMT2 se realiza utilizando los criterios diagnósticos emitidos por la Asociación Americana de la Diabetes (ADA, *por sus siglas en inglés*). Para el diagnóstico la ADA ha establecido que se realicen pruebas de laboratorio para medir los niveles de glucosa plasmática. Principalmente se utilizan pruebas bioquímicas para medir la glucosa plasmática en ayuno (8 horas), o bien se realiza la prueba de tolerancia oral a la glucosa después de una carga de 75g de sacarosa. Adicionalmente, se miden los niveles de hemoglobina glicosilada fracción A1C

(HbA_{1c}), así como la presencia de síntomas clásicos y la medición de glucosa casual (Tabla 2). Sin embargo, para confirmar un diagnóstico de DM la ADA establece que, en ausencia de hiperglucemia inequívoca, el diagnóstico requiere dos resultados anormales de la misma muestra o dos muestras de pruebas diferentes para poder confirmar el diagnóstico de DM. Es importante mencionar que las pruebas tienen variabilidad preanalítica y analítica. Debido a esto es posible que el resultado anormal al momento de la repetición se produzca un valor por debajo del punto de corte del diagnóstico de la DM, si esto ocurre el profesional de la salud debe tomar en cuenta los signos y síntomas clásicos del paciente y repetir la prueba, tan pronto sea posible para poder confirmar el diagnóstico de DM (7, 18).

Tabla 2. Criterios de diagnóstico de diabetes mellitus según la ADA 2020. Modificada de (7).

<ul style="list-style-type: none"> • Glucosa plasmática en ayuno ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L). Con ayuno de 8 horas.
<ul style="list-style-type: none"> • Glucosa plasmática de 2 horas ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) durante una curva de tolerancia oral a la glucosa después de ingerir 75 g de glucosa anhidrida disuelta en agua.
<ul style="list-style-type: none"> • Hemoglobina glicosilada (A1C) $\geq 6.5\%$ (48 mmol/L).
<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes con síntomas clásicos de hiperglucemia, una glucosa casual ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L).

1.5.4. Fisiopatología de la DMT2

La fisiopatología de la DMT2 es heterogénea, sin embargo, se pueden distinguir dos componentes importantes: 1) la falla progresiva de las células β pancreáticas y 2) resistencia a la acción de la insulina. A continuación, se describe cada uno con detalle.

a) Daño progresivo de las células β pancreáticas

Las células β -pancreáticas tienen la capacidad de producir y secretar insulina, un péptido de 51 aminoácidos cuya función principal es regular los niveles de glucosa en sangre a lo largo del día, ya sea en condiciones de ayuno o bien cuando se produce ingesta de comida. Sin embargo, la disfunción de las células β lleva al

desarrollo de DM2. Las principales causas que llevan a dañar a las células β -pancreáticas son defectos hereditarios o bien daño generado por factores ambientales y el estilo de vida de las personas. En ambos casos esto genera la acumulación de glucosa en el torrente sanguíneo. Cuando la glucosa no es captada por las células musculares, hepáticas o los adipocitos generan alteraciones metabólicas conocidas como glucotoxicidad que se refiere al daño irreversible de las células β -pancreáticas causada por la sobreestimulación y la exposición crónica de niveles altos de glucosa. Mientras que la lipotoxicidad se refiere a un aumento de niveles intracelulares de ácidos grasos en las células β -pancreáticas. Ambos fenómenos afectan negativamente la función de las células β a través de numerosos mecanismos, que activan vías metabólicas alternas de la glucosa, aumentan los niveles de calcio intracelular, conducen a la generación de especies reactivas de oxígeno que favorecen un estado de estrés oxidativo que daña no solo a las células β -pancreáticas, sino también al resto de los tejidos(19-21).

b) Resistencia a la insulina (RI)

La RI resulta de alteraciones en la señalización de la insulina debido a mutaciones o modificaciones postraduccionales de su receptor o de proteínas efectoras localizadas río abajo de la cascada de señalización. La RI es el primer defecto en la DM2, ya que se desarrolla mucho antes de que el paciente presente síntomas o niveles elevados de glucosa que permitan realizar el diagnóstico de DM. La RI es causada en parte por factores genéticos y ambientales (sedentarismo y obesidad) y se produce en las células periféricas (musculares, adipocitos y hepatocitos). A medida que se desarrolla la RI, las células β -pancreáticas tratan de compensar esto incrementando los niveles de insulina para regular los niveles de glucosa en sangre. A este fenómeno se le conoce como hiperinsulinemia secundaria. Cuando la RI persiste ya sea por defecto genético, glucotoxicidad y/o lipotoxicidad, o agotamiento iniciara la disfunción de las células β -pancreáticas. Asimismo, aunque la RI siga persistiendo la secreción de insulina disminuirá y los niveles de glucosa en sangre comenzarán a aumentar favoreciendo el desarrollo de DM (22).

1.5.5 Complicaciones de la DMT2

La DM es una enfermedad crónica que se asocia con un gran número de complicaciones a corto o largo plazo y que resultan como consecuencia de la hiperglucemia crónica. Las complicaciones de la DM pueden ser agudas o crónicas y algunas de ellas pueden comprometer la vida del paciente. En las complicaciones agudas encontramos la cetoacidosis diabética y el estado hiperosmolar hiperglucémico, mientras que las complicaciones crónicas son más diversas y pueden clasificarse en: macrovasculares y microvasculares (23). Las complicaciones macrovasculares afectan principalmente al sistema circulatorio en particular a los vasos sanguíneos de mayor calibre (arterias) lo que contribuye al desarrollo de enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad vascular periférica y enfermedad cardiovascular. Las complicaciones microvasculares afectan diferentes partes del cuerpo como son riñón, retina y sistema nervioso, e incluyen a la nefropatía diabética que es la principal causa de enfermedad renal, la retinopatía diabética que es la principal causa de ceguera a nivel mundial y la neuropatía diabética que es el principal factor de riesgo de amputación y ulceración del pie (15). El diagnóstico de las complicaciones macrovasculares y microvasculares es de suma importancia debido a que tanto de forma individual como colectiva éstas disminuyen la calidad de vida del paciente y algunas de éstas son la principal causa de mortalidad y morbilidad en los pacientes diabéticos. En este sentido se estima que hasta el 25% de los pacientes recién diagnosticados con DMT2 ya han desarrollado una o más complicaciones relacionadas con esta enfermedad (24, 25).

1.6. Neuropatía diabética

La neuropatía diabética (ND) es un término que se refiere a un grupo de condiciones heterogéneas que involucran daño en diferentes componentes del sistema nervioso autónomo o somático. Se define como “la presencia de síntomas y/o signos de disfunción del sistema nervioso periférico en personas diabéticas después de descartar otras causas” (26). Esta complicación es la más frecuente de la DM y puede presentarse tanto en pacientes con DMT1 como en pacientes con DMT2 (27). Es importante mencionar en los pacientes, la ND puede ser dolorosa o no dolorosa

(28). Los principales síntomas o signos de disfunción nerviosa se deben al daño de las fibras sensoriales e incluyen dolor espontáneo, alteraciones sensoriales (pérdida de la sensibilidad, disestesias, parestesias), hipersensibilidad (alodinia e hiperalgesia), hipoestesia, entumecimiento y sensación de descargas eléctricas (29). La ND está asociada con infecciones y con un riesgo incrementado de desarrollar úlceras de pie y gangrena que eventualmente llevan a amputaciones.

1.7. Clasificación de la ND

La ND es una complicación heterogénea tanto por sus síntomas como por los patrones de afección neurológica y factores de riesgo. Por lo tanto, los distintos tipos de ND se pueden clasificar con base en su distribución anatómica (p. Ej., proximal o distal, simétrica o asimétrica, focal o multifocal o difusa), su desarrollo clínico (p. Ej., agudo, subagudo o crónico), su rasgo característico (dolorosa o no dolorosa, sensorial, motoras o autonómica) o por su fisiopatología (30). Sin embargo, actualmente se acepta que la clasificación más útil es la que se basa en sus manifestaciones clínicas. Esta clasificación fue propuesta por Thomas en 1997, y fue modificada recientemente para incluir a la "neuropatía prediabética" o "neuropatía por intolerancia a la glucosa" (IGT) (31, 32). En la tabla 3 se muestra la clasificación de Thomas modificada por Boulton *et al.*, 2007.

Tabla 3. Clasificación de las neuropatías diabéticas. Modificado de (33).

<p>Rápidamente reversible</p> <ul style="list-style-type: none"> • Neuropatía hiperglucémica
<p>Polineuropatía simétrica generalizada</p> <ul style="list-style-type: none"> • Neuropatía sensorial aguda • Neuropatía sensitivo-motora crónica (polineuropatía diabética) <ul style="list-style-type: none"> ○ Neuropatía de fibras pequeñas ○ Neuropatía de fibras grandes • Neuropatía autonómica • Neuropatía prediabética o por IGT (intolerancia a la glucosa)
<p>Neuropatías focales y multifocales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Neuropatía de extremidades focales: mononeuropatía

- Neuropatía craneal
- Neuropatía motora proximal (amiotrofia)
- Radiculoneuropatía del tronco
- Neuropatía desmielinizante inflamatoria crónica coexistente

Entre estas, la polineuropatía simétrica distal (PSD) o neuropatía sensitivo-motora crónica es la forma más común de ND. La PSD se manifiesta con una distribución conocida como fenómeno de “guante y calcetín”, debido que inicia con el daño de los nervios largos que inervan los pies y progresa proximalmente afectando los nervios que inervan las manos (34). La Asociación Internacional para el estudio del dolor (IASP, *por sus siglas en inglés*) menciona que en la PSD el dolor es el principal síntoma de la neuropatía, afectando al 25% de los pacientes con PSD. En esta condición el dolor puede presentarse desde el inicio o puede desarrollarse durante el curso de la enfermedad (35). El dolor en los pacientes se manifiesta como dolor espontáneo y otras veces el dolor es inducido por estímulos (dolor evocado). El dolor se presenta generalmente por las noches y se describe como punzante, quemante y lancinante acompañado de calambres, hormigueo, frío. Además, el daño a las fibras provoca una pérdida de la función sensorial, hiperexcitabilidad de las fibras periféricas y sensibilidad a estímulos dolorosos (hiperalgesia), sensaciones de dolor frente a estímulos que normalmente no deberían causar dolor (alodinia) y dolor espontáneo (36). El dolor en la PSD se asocia con pérdida de peso, ansiedad, depresión y trastornos del sueño (37, 38).

1.8. Epidemiología de la neuropatía diabética

El número de casos a nivel mundial de DM ha incrementado en los últimos años provocando que la prevalencia de las complicaciones crónicas de la DM aumente considerablemente. En este contexto se estima que la ND afecta al 50% de la población diabética en el mundo, y el 20% de personas con diagnóstico temprano de DM ya desarrollaron ND (28). La incidencia de la ND es más alta en pacientes con DMT2 (6,100/100,000 personas-año) que en aquellos con DMT1 (2,800/100,000 personas-año). En contraste la prevalencia de la neuropatía es

similar tanto en los pacientes con DMT2 (8-51%) como en los pacientes con DMT1 (11-50%) (34, 39). La prevalencia de la ND por continentes es mayor en Europa con un 48.14% en comparación América (31.61%), Asia (32.24%) y Oceanía (23.20%) (40).

Como se mencionó anteriormente la PSD es el tipo de ND más común, por lo tanto, representa el 75% de los pacientes con ND (30, 41). Es importante resaltar que del 8 al 25% de los pacientes diabéticos presentan dolor, y del 40 al 50% de los diabéticos son diagnosticados con ND dolorosa (40).

En nuestro país se reporta que el 60% de las personas que padecen DM están afectados por algún tipo de ND (Figura 1), y de estos el 54.5% presenta PSD. Además, la prevalencia de ND aumenta el 50% después de los 25 años de evolución en la DM, sin embargo, cada vez es más común observar pacientes que presentan complicaciones desde los primeros meses de diagnóstico (42, 43).

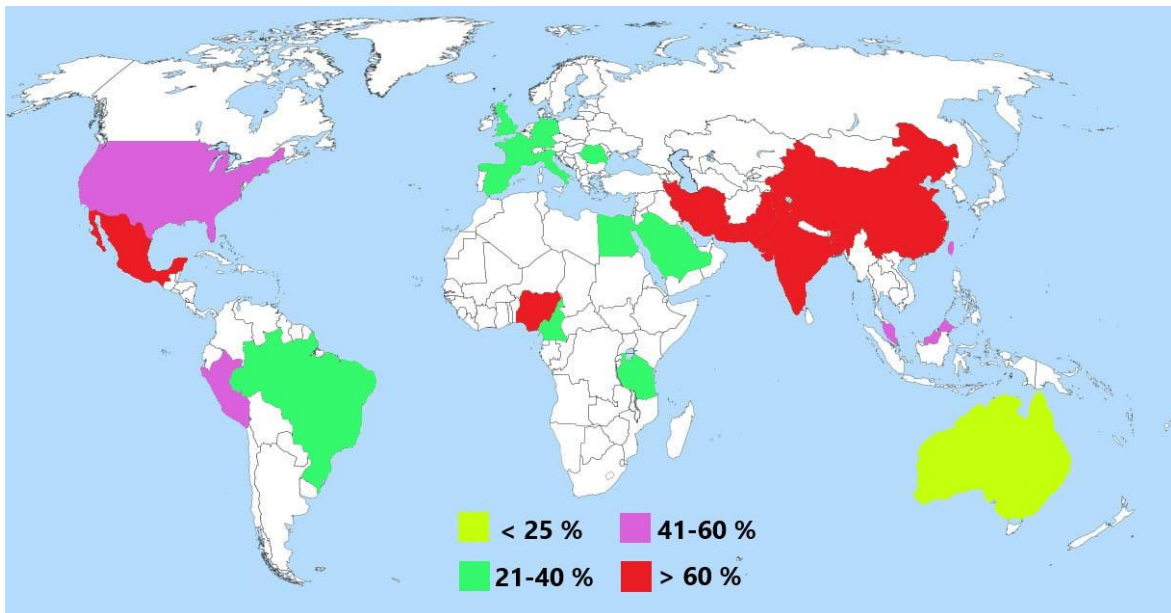


Figura 1. Prevalencia de la neuropatía diabética en algunos países del mundo. Modificada de (43).

1.9. Factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de ND

Existe un gran número de factores de riesgo que influyen al desarrollo de la ND. Entre estos destacan la duración de la diabetes, la hiperglucemia y la edad. En

estudios clínicos estos factores han mostrado una fuerte asociación con el desarrollo de PSD (44). Por ejemplo, la duración de la DM es un factor de riesgo bien establecido para el desarrollo de PSD tanto en pacientes con DMT1 como DMT2, y esta relación es independiente de la edad del paciente (45). Sin embargo, existen otros factores que también han mostrado una contribución importante en el desarrollo de PSD e incluyen al estado prediabético, la obesidad, la hipertensión, el síndrome metabólico, deficiencia de vitamina D, entre otros (Tabla 4). Es importante mencionar que tanto la duración de la diabetes como los niveles de HbA_{1c} son los principales predictores de la ND. Estos dos predictores frecuentemente están relacionados con factores metabólicos que se asocian con la ND, particularmente durante la DMT2, tal es el caso de la RI y la obesidad (29). Otros factores de riesgo que favorecen el desarrollo de ND son hiperlipidemia, tabaquismo, consumo de alcohol y variabilidad en la glucosa.

Tabla 4. Factores de riesgo de la polineuropatía simétrica distal. Modificada de (44).

Factor de riesgo	Grado de asociación
Duración de la diabetes	+++
Hiperglucemia	+++
Variabilidad en la glucosa	+
Prediabetes	++
Edad	+++
Peso	++
Hipertensión	++
Dislipidemias	+
Tabaquismo	+
Obesidad	++
Síndrome metabólico	++
Resistencia a la insulina	+
Consumo de alcohol	+
Hipoinsulinemia	+
Estrés oxidativo	++
Actividad plaquetaria	+
Deficiencia de vitamina D	++
Factores genéticos	++
Inflamación subclínica	++
Baja actividad física	++

Asociación moderada (+), Asociación fuerte (++), Asociación muy fuerte (+++).

Entre estos factores, la hiperglicemia crónica y la obesidad son de interés para nuestro estudio por lo que se describen a continuación:

- a) Hiperglucemia crónica:** Es el principal factor de riesgo para el desarrollo de ND. La hiperglucemia afecta al sistema nervioso periférico (SNP) a través de la activación de una gran diversidad de vías intracelulares de señalización, que conducen a la lesión de fibras nerviosas tanto grandes como pequeñas. La HbA_{1c} es el parámetro predisponente para el desarrollo de ND. La evidencia ha demostrado que por cada incremento del 1% en los niveles de HbA_{1c}, la frecuencia de PSD incrementa del 10 al 15% (45). De acuerdo con lo anterior, se ha reportado que un estricto control glucémico reduce la prevalencia de PSD, especialmente en pacientes con DMT1. Sin embargo, en pacientes con DMT2 este efecto no fue significativo (46).
- b) Obesidad:** Actualmente varios estudios epidemiológicos muestran que la obesidad es el segundo factor de riesgo metabólico más importante para el desarrollo de la ND, después de la DM. Esta evidencia surge de siete estudios poblacionales, realizados en países como Estados Unidos, China, Dinamarca, Países Bajos y Alemania, cuyo objetivo fue demostrar la asociación de la ND con parámetros relacionados con la obesidad. Los estudios demostraron que un IMC >30 Kg/m², hipertrigliceridemia, hipertensión arterial, obesidad abdominal, niveles altos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL) se asociaron positivamente con el desarrollo de ND en los pacientes con DMT2 (47, 48). De igual manera en otro estudio se encontró que la prevalencia de ND es mayor en pacientes diabéticos obesos (34.6%) en comparación con personas con normopeso y normoglicémicas (3.8%). Algo similar se encontró en el grupo de obesos con prediabetes en donde se observó una prevalencia del 29.0%. En este estudio, a través de un estudio electrofisiológico, también se demostró que los sujetos obesos mostraron anomalías en la velocidad de conducción nerviosa y en la densidad de fibras nerviosas intraepidérmicas (IENFD, *por sus siglas en inglés*) de las extremidades inferiores (49).

1.10. Fisiopatología de la ND y el dolor asociado

La fisiopatología de la ND es multifactorial y compleja, por lo tanto, se desconoce con certeza los mecanismos que subyacen a esta complicación de la DM. La ND se caracteriza por daño en el SNP en donde se ven afectados los axones de neuronas sensoriales, autónomas y en menor medida los axones de neuronas motoras (29). Los cambios estructurales que se han identificado son desmielinización segmentaria y degeneración axonal, y microangiopatía que en conjunto inducen apoptosis de las neuronas del DRG, y a largo plazo provoca la pérdida de fibras mielinizadas y amielinizadas (26). En este contexto se ha propuesto que los principales mecanismos moleculares que provocan el daño a los nervios, que en algunos casos conducen a neuropatía dolorosa, y que se desencadenan como consecuencia de la hiperglucemia crónica son inflamación, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (43).

Las principales vías de señalización involucradas en la patogénesis de la ND son la vía del polirol, la vía de hexosamina, la señalización de la proteína cinasa C (PKC), la vía de los productos de glicosilación avanzada (AGEs), la vía de poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP), la vía de las MAP cinasas (MAPK), la señalización del factor nuclear kappa B (NF- κ B), la vía de Hedgehog (Hh), la vía de la ciclooxigenasa (COX), la vía de la lipoxigenasa (LOX), la vía de señalización Wnt (*Wingless e Int*), la vía autofágica, incremento de citocinas proinflamatorias (por ejemplo interleucina IL-1 β , IL-6 y factor de necrosis tumoral α (TNF- α)) y la regulación a la baja de factores de crecimiento (50). Estas vías tienen la capacidad de incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) mitocondriales y citoplasmáticas, que resulta en estrés oxidativo. Este desequilibrio entre ROS y sustancias antioxidantes conduce a la modificación de proteínas, peroxidación lipídica y daño al ADN que posteriormente llevara a generar daño neuronal (51) (Figura 2).

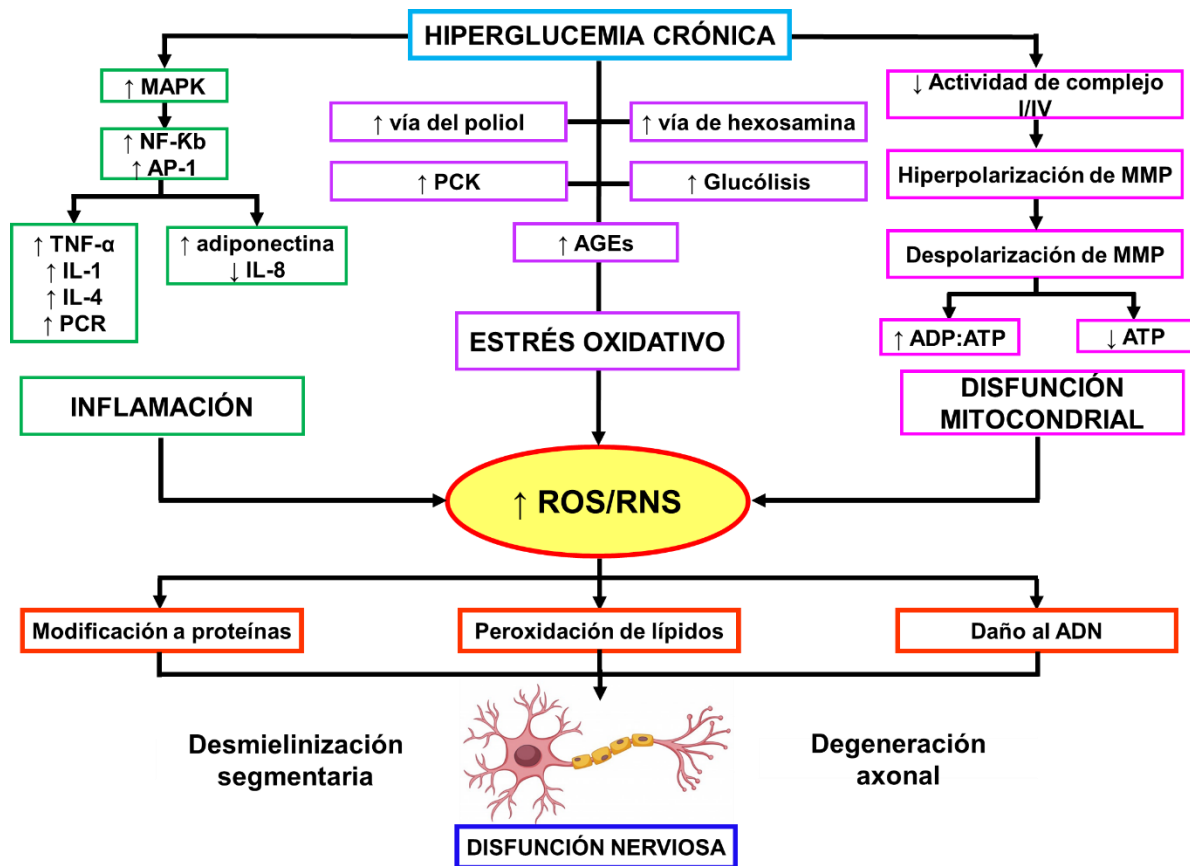


Figura 2. Mecanismos inducidos por la hiperglucemia crónica y que se propone que inducen disfunción nerviosa. MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos; NF- κ B: factor nuclear kappa B; AP-1: proteína activadora 1; TNF- α : factor de necrosis tumoral α ; IL-1: interleucina 1; IL-4: interleucina 4; PCR: proteína C reactiva; IL-8: interleucina 8; PCK: proteína cinasa C; AGEs: productos finales de glicación avanzada; MMP: potencial de membrana mitocondrial; ADP: adenosín difosfato; ATP: adenosín trifosfato; ROS: especies reactivas de oxígeno; RNS: especies reactivas de nitrógeno; ADN: ácido desoxirribonucleico. Modificada de (43).

Es importante mencionar que en estudios realizados en biopsias de piel se ha encontrado una disminución de fibras nerviosas proximales multifocales y focales, daño severo en las fibras nerviosas distales; disminución de las fibras mielinizadas desde los nervios proximales a los distales. Asimismo, la degeneración axonal y segmentaria con regeneración son las principales características patológicas del daño neuropático inducido por la hiperglucemia crónica en la ND (52).

A continuación, se describen los principales hallazgos relacionados con la inflamación, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial.

a) Inflamación

La inflamación es la respuesta protectora del organismo frente al daño tisular, infecciones u otros traumas, que resulta en cambios celulares y activación de las respuestas inmunes que lleva a la reparación del tejido en el sitio de la lesión (53). La producción de mediadores inflamatorios como citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión ha sido relacionada en la inflamación presente en la ND. Por ejemplo, en pacientes con DMT2 y ND se encontraron niveles altos de marcadores que se asocian directamente con la gravedad de la ND (14) tales como proteína C reactiva (PCR) e IL-6, en comparación con los pacientes con DMT2 sin ND. En la ND también se ha demostrado que la inflamación está mediada por ROS que llevan a la activación de NF- κ B, la proteína activadora 1 (AP-1) y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). El NF- κ B favorece la producción de citocinas inflamatorias como TNF- α e IL-6, así como de las enzimas ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) que contribuyen a la síntesis de prostaglandinas. Asimismo, estudios recientes mostraron que la respuesta inflamatoria causada por la hiperglucemia crónica activa a las células T. Estas células producen citocinas que provocan efectos tóxicos sobre las neuronas y las células gliales lo que lleva a la desmielinización. Otros estudios han demostrado que TNF- α está relacionado con el desarrollo de la ND dolorosa en los pacientes con DMT2. Por lo tanto, el TNF- α es un biomarcador inflamatorio de la ND que podría ayudar al diagnóstico (54).

b) Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un desequilibrio en las células que se caracteriza por el aumento de ROS/RNS y una disminución de moléculas antioxidantes (55). Tanto la glucólisis, como otras rutas alternativas para el metabolismo de la glucosa, como por ejemplo la hexosamina, la ruta de la PKC, la ruta del poliol y la autooxidación de glucosa, son fuente de producción de ROS y RNS que son marcadores que inducen la apoptosis celular (43). Las ROS incluyen, superóxido (O_2^-), hidroxilo (HO), peróxido (RO_2^-) y especies no radicales, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido clorhídrico (HCl). Dentro de las especies reactivas de nitrógeno (RNS) encontramos

radicales libres como óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno (NO₂) y óxido nitroso (N₂O) (56). Los marcadores de estrés oxidativo se han estudiado en la ND dolorosa debido a la relación que se presenta entre la pérdida del 53% de fibras mielinizadas grandes con la sobreproducción de ROS que se observó en un estudio “*in vivo*” realizado en ratas diabéticas 12 meses después de la inducción de diabetes por estreptozotocina (STZ) (57).

c) Disfunción mitocondrial

Se le llama disfunción mitocondrial a las alteraciones en los procesos normales de las mitocondrias, como son la generación de ATP por fosforilación oxidativa, la generación y desintoxicación de ROS como subproductos del metabolismo oxidativo, el mantenimiento de la homeostasis del Ca²⁺ y la regulación de la apoptosis (58). Como muchos otros procesos, la función mitocondrial presenta alteraciones debido a la hiperglucemia crónica. El 90% de las ROS se generan en las mitocondrias de las células de mamíferos (59). Un mal funcionamiento de la mitocondria puede conducir a la apoptosis celular o reducir la capacidad de generar ATP. El sistema nervioso es el más vulnerable al daño por estrés oxidativo debido a su alta demanda energética y al contenido elevado de lípidos (43). Diversos estudios muestran que la exposición de las neuronas del DRG a concentraciones altas de glucosa lleva a la pérdida de electrones de la cadena de transferencia de electrones mitocondrial junto con hiperpolarización de la membrana mitocondrial y un aumento de ROS en la mitocondria. Esto favorece la lesión mitocondrial, la despolarización de la membrana mitocondrial y la liberación de factores inductores de apoptosis (60). El estrés oxidativo favorece al daño del ADN mitocondrial, la disfunción mitocondrial y la degeneración axonal. Esto último debido a que los axones presentan una gran cantidad de mitocondrias que los vuelven susceptibles al desequilibrio metabólico y endotelial que conducen a la progresión de la ND (61).

1.10.1 Mecanismos de mantenimiento del dolor en la ND

Los mecanismos fisiopatológicos del dolor están relacionados con los procesos moleculares ya antes mencionados, sin embargo, se desconocen los mecanismos

de mantenimiento del dolor en los pacientes con ND dolorosa. A este respecto se han postulado varios mecanismos que afectan el funcionamiento del SNP y el SNC (Tabla 5). La evidencia sugiere que estos mecanismos se activan como consecuencia de un mal control de la glucosa en sangre, el aumento en el flujo sanguíneo epineural de los nervios periféricos, alteraciones en la microcirculación cutánea, y reducción de la densidad de fibras nerviosas intraepidérmicas. Todo lo anterior lleva a un estado de sensibilización del sistema nervioso tanto a nivel periférico como central (62).

Tabla 5. Mecanismos que contribuyen al dolor en la ND. Modificada de (62)

Mecanismos periféricos	Mecanismos centrales
<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilización periférica. • Actividad ectópica • Alteración en la transducción y la transmisión del dolor • Alteración en la expresión génica de canales de sodio (Na⁺) y calcio (Ca²⁺) 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilización central • Incremento de la señalización glutamatérgica: Aumento de la liberación del neurotransmisor excitatorio (glutamato) y de la expresión de receptores NMDA • Neuroinflamación • Facilitación descendente

1.10.2. Sensibilización periférica

La sensibilización periférica se caracteriza por un incremento anormal en la excitabilidad de los nociceptores. Este mecanismo se produce como consecuencia de una lesión tisular que desencadena una cascada de eventos que involucran fibras sensoriales aferentes primarias, células inmunes plasmáticas y células residentes (p ej. los queratinocitos). Todas estas células liberan diferentes mediadores inflamatorios como bradicinina, prostaglandinas, H⁺, ATP, factor de crecimiento nervioso (NFG), citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL1- β , IL-6) y quimiocinas proinflamatorias (CCL2, CXCL1, CXCL2), entre otros (63). Todas estas sustancias al interactuar con sus distintos receptores de membrana, ubicados en la terminal periférica del nociceptor, aumentan la excitabilidad del nociceptor a nivel

del sitio de la lesión y en las zonas circundantes. Esto se debe a que se produce un aumento de la permeabilidad de los canales iónicos, una reducción en el umbral de activación de los canales iónicos activados por voltaje y por ende, un incremento de su actividad (64). En estas condiciones los nociceptores de la piel y los tejidos más profundos se vuelven extremadamente sensibles a los estímulos en presencia de inflamación. Esto reduce el umbral de activación del nociceptor permitiendo que sea activado por estímulos de baja intensidad (es decir estímulos inocuos o no dolorosos), y a su vez que aumente la magnitud de la respuesta ante estímulos nocivos, fenómenos que se conocen como alodinia e hiperalgesia, respectivamente (65). Asimismo, también se ve implicada la inflamación neurogénica que es una inflamación local generada por la respuesta eferente del sistema nervioso, y que se caracteriza por la liberación de neuropéptidos como sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Estos neuropéptidos se liberan en el sitio de la lesión en donde actúan en sus receptores ubicados en las células endoteliales lo que resulta en vasodilatación y aumento en la permeabilidad vascular. Estos dos fenómenos permiten la llegada de más células del sistema inmune que van a liberar más mediadores proinflamatorios que perpetúan la inflamación y contribuyen al mantenimiento de la sensibilización (Figura 3).

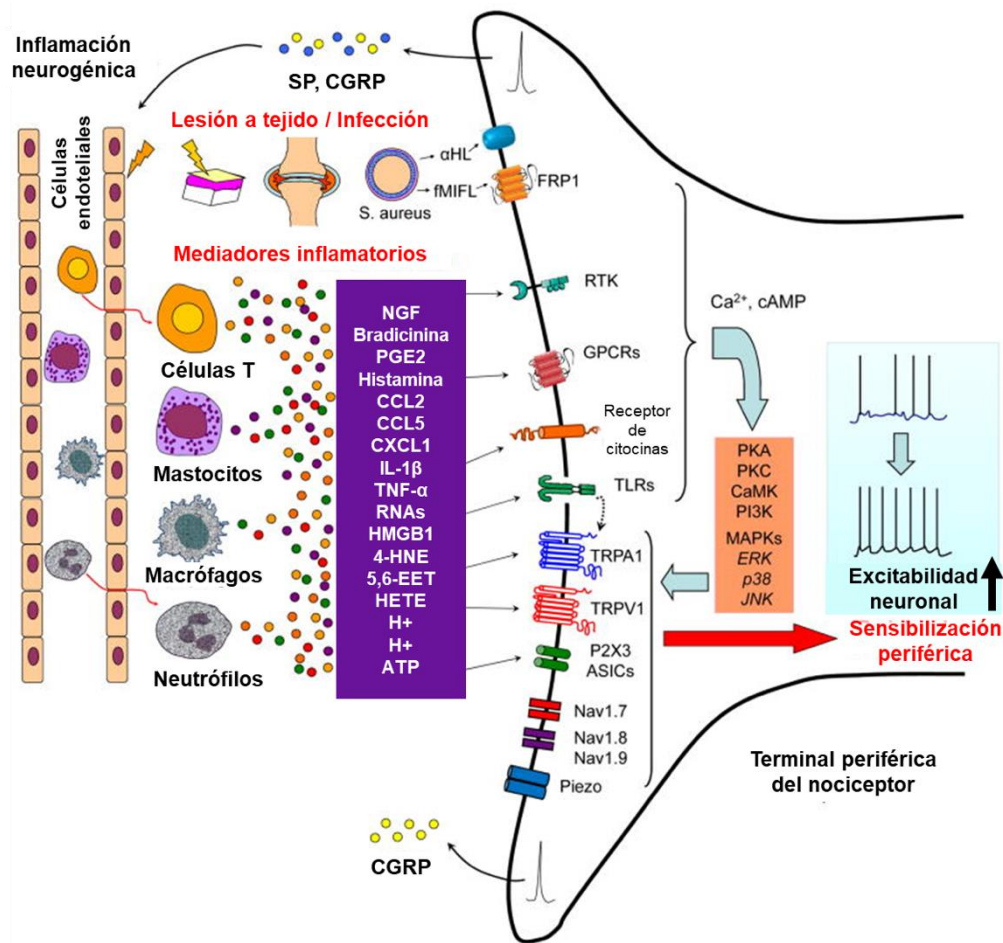


Figura 3. Sensibilización periférica. El mecanismo inicia tras ocurrir una lesión o infección de un tejido, donde las células residentes y células inmunes liberan mediadores proinflamatorios que actúan y activan a sus respectivos receptores acoplados a proteínas G, receptores ionotrópicos y receptores de tirosina quinasa ubicados en los nociceptores. Esto lleva a la generación de segundos mensajeros como Ca²⁺ y cAMP, que a su vez activan varias enzimas quinasas, como proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa dependiente de Ca²⁺ (CaMK), fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) como ERK, p38 y JNK. La activación de estas cascadas de señalización resulta en hipersensibilidad e hiperexcitabilidad de las terminaciones periféricas de los nociceptores. La activación de los nociceptores también libera SP y CGRP que producen inflamación neurogénica. SP: sustancia P, CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina, NGF: factor de crecimiento nervioso, PGE2: prostaglandina E2, CCL2: ligando 2 quimiocina, CCL5: ligando 5 quimiocina, CXCL1: ligando 1 quimiocina, IL-1β: interleucina 1β, TNF-α: factor de necrosis tumoral α, RNAs: micro ARN, HMGB1: caja 1 del grupo de alta movilidad, 4-HNE: 4-hidroxynonenal, 5,6-EET: ácido epoxieicosatrienoico, HETE: hidroxieicosatetraenoico, H⁺: protones, ATP: trifosfato de adenosina, αHL: α-hemolisina, fMIF: N-formilmetionina-leucil-fenilalanina, FRP1: receptor 1 del péptido formilo, RTK: receptor tirosina quinasa, GPCRs: receptor acoplado a proteína G, TLRs: receptor tipo Toll. TRPA1: canal catiónico del potencial receptor transitorio, subfamilia A, TRPV1: canal catiónico potencial del receptor transitorio 1, P2X3: receptor ionotrópico purinérgico 3, ASICs: canales iónicos sensibles ácido, Nav 1.7, Nav 1.8, Nav 1.9: canales de sodio dependientes de voltaje, cAMP: monofosfato de adenosina cíclico, p38: proteína quinasa activada por mitógenos p38, JNK: quinasas c-Jun N-terminal. Modificada de (63).

Los pacientes con ND presentan síntomas como hiperalgesia y alodinia que se asocian desde un punto de vista mecanístico con la sensibilización periférica. Adicionalmente, se ha reportado una regeneración anormal de las fibras nerviosas conocida como neuromas de Morton. Las nuevas fibras nerviosas crecen en todas las direcciones provocando daño en el sistema nervioso e incrementando el área de sensibilización. La hiperexcitabilidad que generan los neuromas resulta en descargas ectópicas sobre las fibras aferentes intactas y en los cuerpos celulares del DRG. Las descargas ectópicas generan respuestas espontáneas, exageradas, además de un incremento de la hiperexcitabilidad que conduce a una mayor sensibilidad a los estímulos nocivos e inocuos (66, 67).

Por otro lado, existe evidencia que indica que los canales iónicos contribuyen importantemente fenómeno de sensibilidad periférica. A este respecto se ha reportado que existen alteraciones en su expresión, translocación, fosforilación y modificaciones postraduccionales que se asocian al dolor en la ND. Por ejemplo, en modelos de roedores con ND dolorosa se ha observado una mayor expresión de los canales iónicos $Na_v 1.8$ en las fibras C amielínicas que lleva a un incremento de los impulsos nerviosos al SNC promoviendo el dolor.

Además, en los diabéticos se han observado niveles altos (600 nM) de metilglioxal (MG) un compuesto reactivo que se forma a partir de la glucólisis o de las vías alternas de la glucosa (32). El MG puede modificar las proteínas celulares y su función. En un modelo en roedores se observó que el MG modifica la función del canal $Na_v 1.8$ provocando una ganancia de la función e hiperexcitabilidad de las fibras sensoriales, mecanismo que se considera que subyace al dolor neuropático en la ND (68). Por otro lado, el gen que codifica para el canal iónico $Na_v 1.7$ (gen SCN94) se ha encontrado en diversos trastornos dolorosos como eritromegalia hereditaria o dolor paroxístico), por lo que se analizó su expresión en pacientes con ND. Se encontró que las variantes de SCN94 se presentan más en pacientes con ND dolorosa que en aquellos con ND no dolorosa, y donde se sugiere que la variante de SCN94 de los canales $Na_v 1.7$ favorece la función e hiperexcitabilidad de las neuronas sensoriales lo que contribuye al dolor en roedores (69).

En esta misma línea, se ha observado que los canales de Ca^{2+} tipo T están relacionados en la ND dolorosa debido a que regulan la excitabilidad subumbral de los nociceptores. Por ejemplo, la modificación del canal iónico $\text{Cav} 3.2$ a través de la glicosilación del residuo de arginina da como resultado un incremento de la hiperexcitabilidad de las neuronas del DRG (70).

1.10.3. Sensibilización central

Adicionalmente a la contribución de las fibras aferentes primarias a la ND dolorosa, la hiperactividad de las neuronas del asta dorsal de la médula espinal (sensibilización central) también se ha reconocido como un mecanismo que contribuye al dolor crónico observado en pacientes con ND. Las neuronas del asta dorsal reciben entradas tanto inhibitorias (GABAérgicas / glicinérgicas), como excitatorias (glutamatérgicas), las cuáles controlan el flujo de la información nociceptiva (71).

La IASP describe a la sensibilización central como una mayor capacidad de respuesta de las neuronas nociceptivas en el SNC a su entrada aferente normal (72). Esto se ha estudiado con mayor énfasis en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal, sin embargo, la sensibilización también se observa en otros sitios, como por ejemplo el tálamo. En la sensibilización central se presentan alteraciones en las vías neuronales ascendentes y descendentes, por las cuales se conduce a una mayor respuesta de la estimulación, medida por la amplificación de la señalización del SNC (73). Este mecanismo se produce debido al incremento de la actividad ectópica en las fibras aferentes primarias. Los impulsos nerviosos persistentes aumentan la liberación de neurotransmisores excitatorios, principalmente glutamato, dentro del asta dorsal de la médula espinal. Esto favorece la activación de las neuronas nociceptivas de segundo orden provocando cambios postsinápticos como el incremento de la fosforilación de los receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) y ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) o una mayor expresión de los canales de sodio dependientes de voltaje. Lo anterior conduce a una mayor entrada de iones Na^+ , Ca^{2+} y salida de K^+ provocando cambios en la médula espinal que permiten a las

fibras nerviosas de alto y bajo umbral activar a las neuronas de segundo orden, permitiendo que los estímulos inocuos generen dolor. Esto es el reflejo de la sensibilidad característica, que se manifiesta como alodinia e hiperalgesia (74).

En la ND se han descrito cambios a nivel central como son: sensibilización en las fibras aferentes primarias, hiperexcitabilidad de las neuronas del asta dorsal y cambios en la neuroplasticidad de las neuronas sensoriales centrales (75). La presencia de alodinia en los pacientes con ND evidencia que el procesamiento del dolor en el SNC es anormal (66). Evidencias científicas han demostrado que el aumento en la liberación de neurotransmisores y la sobreexpresión de receptores que se observa a nivel del SNC es mediada por factores que provocan la hiperreactividad de las neuronas de segundo orden lo que conduce a un aumento de la liberación de glutamato de las fibras aferente primarias en la médula espinal, en otras palabras, se produce un aumento de la señalización glutamatérgica. Por lo tanto, no solo se encuentran concentraciones altas de glutamato, sino también una mayor expresión del receptor NMDA que genera un incremento de la frecuencia de las corrientes excitatorias postsinápticas en la lámina II de asta dorsal en la médula espinal. Lo anterior indica que la expresión de receptores NMDA y la liberación de glutamato contribuyen a la hiperreactividad de la médula espinal.

Además del incremento de la excitabilidad, también existen hallazgos que sugieren que se presenta un efecto de desinhibición que contribuye aún más la excitación neuronal. La inhibición es mediada principalmente por el neurotransmisor GABA. GABA ejerce sus efectos a través del canal ionotrópico GABA_A y el receptor metabotrópico GABA_B. El receptor GABA_B está ampliamente distribuido en el SNC, incluyendo las láminas I-III de la médula espinal, tanto en animales como en humanos. Es un autorreceptor que regula la liberación sináptica de GABA a nivel presináptico. Sin embargo, también actúa como heteroreceptor regula la liberación de glicina y glutamato de las neuronas del asta dorsal (76). En estudios realizados en roedores con ND se ha encontrado una disminución de la expresión de estos receptores en el asta dorsal de la médula espinal lo que disminuye la inhibición y favorece la excitación neuronal (77). Esto explica el hecho de que el baclofeno, un

antagonista de receptores GABA muestre poca efectividad en ratas con ND (76). Una hipótesis es que la activación de los receptores GABA_B en las interneuronas inhibe la actividad de los receptores NMDA a través de la inhibición de los canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje y genera la apertura de los canales de K⁺ provocando que la corriente fluya hacia el interior de la neurona (78).

1.10.3.1. Facilitación descendente

Las vías descendentes del dolor se originan en las regiones del mesencéfalo y del tronco encefálico y envían proyecciones hacia la asta dorsal de la medula espinal. Están conformadas anatómicamente por la sustancia gris periacueductual (SGPA), la médula rostral ventromedial (RVM) y el *locus coeruleus*. Estas dos últimas estructuras son los principales centros de control descendente. En condiciones normales, las vías descendentes mantienen un equilibrio entre la señalización facilitadora e inhibitoria de las entradas nociceptivas, para modular la transmisión de la información nociceptiva (79). Este proceso se realiza gracias a sistemas de neurotransmisión como el sistema de opioides endógeno y el de monoaminas como la serotonina (5-TH) y la noradrenalina (NA). Sin embargo, cuando se presenta una lesión del sistema somatosensorial predomina la función facilitadora del dolor (80, 81). Morgado y cols, demostraron en un modelo “*in vivo*” de diabetes, que el número de neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas aumentan en el tronco encefálico principalmente en la RVM. Esto se asoció con mayores niveles de 5-TH y NA en la médula espinal sugiriendo que en la ND dolorosa existen alteraciones en la modulación descendente del dolor(82). El sistema de opioide endógeno también se ve afectado en la ND dolorosa principalmente en la regulación del dolor. El sistema opioide endógeno es un grupo de péptidos opioides producidos en el sistema nervioso como moduladores del dolor. Se distinguen en tres familias: endorfinas, encefalinas y dinorfinas, que se unen y activan a sus respectivos receptores MOR (μ), DOR (δ) y KOR (κ). En estudios de pacientes con dolor crónico se ha demostrado una reducción en la expresión de receptores opioides en el cerebro, esto puede ser debido a la exposición de analgésicos opioides, un menor número de neuronas que expresen receptores, o a una respuesta alterada de los receptores

frente al dolor crónico (83). En estudios preclínicos en un modelo de ratas diabéticas inducidas con STZ para generar ND dolorosa, se observó un efecto antinociceptivo en el sistema opioide que se asocia con una pérdida de MOR y el acoplamiento de proteínas G de las neuronas sensoriales periféricas (84). Posteriormente un estudio clínico realizado en pacientes con DMT2 con ND reportó niveles bajos de β -endorfina sérica (24.11 ± 2.45 pg/dL) en comparación con los controles (97.34 ± 3.12 pg/dL) y una mayor percepción del dolor. Este estudio demuestra que en los pacientes con ND el funcionamiento de sistema opioide endógeno se encuentra alterado (85).

1.10.3.2. Activación de la microglía

La microglía son las células inmunes residentes del SNC y actúan como la primera línea de defensa contra patógenos, activando una respuesta inmune a través del reconocimiento y procesamiento de antígenos. Es una población de macrófagos normalmente inactivos que constituyen una proporción del 5 al 20% de un 70% de la glía total del SNC. La microglía puede activarse en respuesta a una amplia gama de mediadores que se liberan de la misma glía o bien de las neuronas que conforman la sinapsis (p. ej. citocinas (IL-6, interferón- γ), quimiocinas, ATP, glutamato y neuropéptidos (SP, CGRP)). Una vez que se produce la activación debido a una lesión nerviosa, infección o inflamación, la microglía sufre varios cambios estereotípicos en su morfología, expresión de genes, función y número (86). Las células residentes al ser activadas tienen la capacidad de fagocitar, presentar antígenos a los linfocitos T y liberar citocinas (87, 88). En condiciones normales la microglía ayuda a preservar la homeostasis a través de la interacción e intercambio de receptores citocinas y neuropéptidos con las neuronas de la sinapsis. Esta comunicación bidireccional ayuda a proteger del daño, pero también puede contribuir a procesos fisiopatológicos como es el caso de la ND, la neuropatía postherpética, enfermedades virales, enfermedades autoinmunes o enfermedades neurodegenerativas (89). Dado que en ratones diabéticos obesos y en pacientes con DMT2 se ha encontrado un incremento en la activación de la microglía, y que la inhibición farmacológica a nivel espinal de la glía residente revierte la ND

dolorosa, se ha sugerido que la microglía puede estar implicada en la fisiopatología de la ND. En modelos en roedor de ND se ha demostrado que la hiperglucemia crónica cambia el microambiente de la médula espinal dando lugar a la activación de la microglía e induciendo cambios morfológicos (hipertrofia celular), así como un incremento en el número de células (88, 90). Además, se ha encontrado que la hiperreactividad de las neuronas del tálamo correlaciona con la activación de la microglía en modelos animales. Mientras que en el tálamo de pacientes con ND dolorosa se demostró un incremento en el flujo sanguíneo, actividad neuronal espontánea, incremento del tamaño del campo receptivo y alteraciones en la conectividad neuronal (91).

Los niveles elevados de glucosa en la microglía muestran un aumento en la expresión de ARNm y secretan TNF α y mcp-1 CCL2, lo que conduce a la activación neuronal. La activación de los receptores P2Y12 y P2Y13 presentes en la microglía a nivel de la médula espinal desencadena la producción de IL-1 β e IL-6 en un modelo de rata con ND. Además, la activación de AGEs microglial conduce a la liberación de las quimiocinas CCL3, CCL5 y CXCL2 que activan a la microglía, por lo tanto, la microglía activada fagocita a la mielina neuronal promoviendo así la ND (92).

Sin embargo, además de las alteraciones en el SNC, se ha observado que las alteraciones a nivel del sistema cardiovascular, particularmente en la microvasculatura parecen desempeñar también un papel preponderante.

1.10.4. Contribución de las alteraciones microvasculares al daño nervioso

La ND se asocia positivamente con el deterioro microvascular. Se ha demostrado tanto en estudios preclínicos como clínicos que estas condiciones existe una reducción en la perfusión nerviosa periférica e hipoxia endoneural, no solo en tejido nervioso, sino también en piel (93). El resultado es la isquemia nerviosa, causado por el aumento del grosor de la pared de la lámina basal de los vasos que se encuentran cerca de los nervios periféricos. La isquemia nerviosa en pacientes diabéticos provoca una pérdida de la sensibilidad progresiva en los segmentos

proximales y distales, dando como resultado la reducción de la densidad de fibras nerviosas intraepidérmicas (94). Es importante mencionar que la función endotelial también está alterada en los pacientes con ND. Los vasos sanguíneos presentan una menor dilatación en los pacientes con ND en comparación con sujetos sanos (95).

1.11. Diagnóstico de la ND

La ADA en el 2017 reportó que el diagnóstico temprano de la ND y el inicio del tratamiento adecuado son esenciales para mejorar la vida de los pacientes con diabetes (96). El diagnóstico se basa en la historia clínica del paciente y la combinación de signos y síntomas de disfunción nerviosa (pérdida sensorial distal simétrica). Las alteraciones suelen iniciar de forma bilateral en dedos y pies. En los casos de origen asimétrico, la progresión es de forma bilateral. Puede progresar gradualmente a pantorrillas y rodillas en cuyo caso los pacientes notan dolor y/o parestesias de forma conjunta en manos y pies. Además, es característico el déficit sensitivo y la pérdida o disminución del reflejo aquileo. Es importante resaltar que la mayoría de los pacientes son asintomáticos, y el diagnóstico se realiza cuando el paciente diabético presenta una úlcera indolora (29). Para el diagnóstico de ND se utilizan cinco pruebas clínicas simples que se describen a continuación y que se utilizan para detectar alteraciones de diferentes tipos de fibras nerviosas (Tabla 6).

Tabla 6. Pruebas sensoriales empleadas en el diagnóstico de la ND. Modificada de (97)

Evaluación sensorial	Tipo de fibras nerviosas	Instrumento	Receptores sensoriales asociados
Vibración	A β (grandes)	Diapasón de 128 Hz	Mecanorreceptores del corpúsculo Ruffini
Dolor (pinprick)	C (pequeñas)	Neuro-tips	Nociceptores (Dolor y calor)
Presión	A β , A α (grandes)	Monofilamentos de 1 y 10g	Corpúsculos de Pacini
Tacto ligero	A β , A α (grandes)	Hebra fina de algodón (Brizna de algodón)	Corpúsculos de Meissner
Frio	A δ (medianas)	Diapasón en frío	Termorreceptores (Frio)

1.11.1. Prueba de monofilamentos Semmes-Weinstein (SWME) de 10g

La prueba de los monofilamentos de 10g de Semmes-Weinstein (SWME) se utiliza comúnmente en la práctica clínica para evaluar la pérdida de la función sensorial protectora y para detectar ND. Existen diversas variantes, sin embargo, la Asociación Americana de la Diabetes (ADA, *por sus siglas en inglés*) en el 2017 recomendó que el diagnóstico de neuropatía simétrica distal debe realizarse con la prueba de 4 puntos (98). La prueba se realiza aplicando un filamento de nilón de forma perpendicular en la superficie plantar del pie, que al curvarse ligeramente genera una fuerza de 10g. Esta evaluación se realiza en cada pie y en cada uno de los cuatro sitios establecidos (cabeza de metatarso 1°, 3° y 5° y superficie plantar del hallux distal) por aproximadamente 1s. Durante la prueba el paciente está con los ojos cerrados y debe responder “sí” o “no” cuando se le pregunta si sintió la aplicación del filamento. Es importante también que el paciente identifique correctamente el sitio donde se aplicó el filamento para reconocer la percepción de presión. Durante la prueba de percepción de presión se debe evitar realizar la evaluación en las áreas callosas de la superficie plantar (Figura 4) (99).

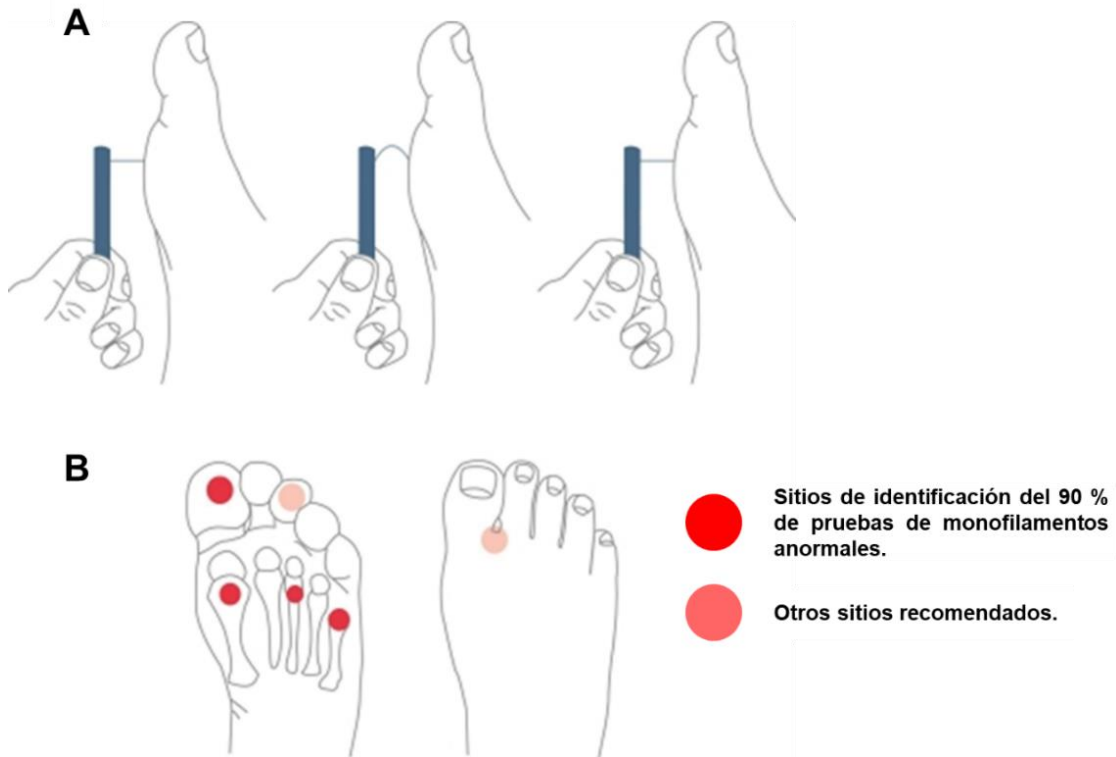


Figura 4. Prueba de monofilamento de 10g. A) La prueba de monofilamentos de 10g se realiza colocando el filamento de forma perpendicular a la superficie plantar del pie, aplicando una presión de 10g hasta que monofilamento forma un bucle. Debe mantenerse ~ 1s en haciendo la presión. B) La prueba de monofilamento se realiza en sitios específicos (resaltados en rojo). Modificada de (99).

1.11.2. Diapasón de 128 hertz (Hz)

Es un dispositivo utilizado en la práctica clínica para medir la sensación vibratoria en los pacientes diabéticos para el diagnóstico de ND. El dispositivo se coloca en el dedo hallux del pie (dedo gordo) de forma perpendicular para aplicar una presión constante. Esta prueba se realiza tres veces, alternando con una aplicación simulada en la que el diapasón no vibra. La prueba mediante el diapasón es positiva si el paciente responde correctamente al menos a dos de las tres aplicaciones (99).

1.11.3. Prueba de sensación de “pinprick”

Es una prueba fácil y económica utilizada en la práctica médica. Con esta prueba se observa si el paciente diabético percibe la sensación de pinprick. Esta prueba consiste en aplicar un estímulo nocivo cerca de la uña del pie en la superficie dorsal

del hallux con la presión suficiente para romper piel. Para esto se utiliza una aguja desechable. La incapacidad de percibir un pinprick se considera un resultado anormal.

1.11.4. Reflejo aquileo

La ausencia de reflejos de aquileos está relacionada con la ND por lo que se evalúan para realizar el diagnóstico. Para realizar esta prueba se requiere un martillo para reflejos, el paciente debe estar de rodillas en una silla o acostado. El tendón de Aquiles debe quedar estirado hasta que el tobillo este en una posición neutra antes de golpear el tendón con el martillo. Si la respuesta inicial es ausente, se le pide al paciente doblar los dedos para ejercer fuerza y se golpea nuevamente con el martillo. La ausencia total del reflejo en reposo o con fuerza se considera un resultado anormal.

1.11.5. Prueba de umbral de percepción de vibración

El biotesiómetro es un dispositivo portátil que proporciona una evaluación semicuantitativa del umbral de percepción de vibración (VPT). La evaluación se realiza con el paciente acostado de forma decúbito supino, se coloca el lápiz del instrumento sobre el hallux dorsal y se aumenta la amplitud hasta que el paciente detecte la vibración. El resultado se obtiene después de realizar la lectura tres veces sobre cada hallux. Un VPT > 25 V se considera anormal y se ha demostrado que se relaciona positivamente con ulceración del pie (28, 99).

1.12. Tratamiento

En la actualidad no existe tratamiento efectivo para revertir la enfermedad o mitigar los síntomas de la ND, por lo tanto, sigue siendo un reto para los médicos. El objetivo principal del tratamiento es controlar los síntomas relacionados con el dolor neuropático. Para la elección del tratamiento es importante tener en cuenta la historia clínica del paciente con la finalidad de obtener información de la naturaleza del dolor. El examen detallado de las extremidades inferiores es obligatorio para determinar las causas del dolor e iniciar el tratamiento (38). El tratamiento de la ND

se basa en tres estrategias principales: 1) control glucémico estricto y manejo de factores de riesgo, 2) tratamientos basados en mecanismos fisiopatológicos (tratamientos modificadores de la enfermedad) y 3) tratamientos para el control del dolor. Es importante mencionar, que las evidencias científicas han demostrado que el control glucémico o el manejo de estilo de vida no es, por sí sólo, una terapia efectiva para revertir la ND en los pacientes con DMT2, y hasta el momento solo la intervención farmacológica ha mejorado los síntomas (26, 100).

El dolor neuropático es el síntoma principal en la ND. Por lo tanto, las guías de práctica clínica actuales recomiendan el uso de fármacos dirigido al tratamiento sintomático. En este contexto, se han obtenido resultados prometedores con la terapia farmacológica observándose que algunos de los fármacos alivian ~ 30 a 50% del dolor (100).

El tratamiento farmacológico de la ND incluye las siguientes tres clases principales de fármacos: 1) los antidepresivos del grupo de a) los tricíclicos (ATC), b) inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) y c) los inhibidores de la recaptura de serotonina y norepinefrina (IRSN), 2) algunos tipos de antiepilépticos como los gabapentinoides y la carbamazepina y 3) los opioides débiles como el tramadol (Tabla 7). Es importante mencionar que los tratamientos utilizan estimadores para identificar la eficacia y seguridad del fármaco. Los dos estimadores más utilizados son el NNT (*por sus siglas en inglés Number Needed Treat*) y NNH (*por sus siglas en inglés Number Needed to Harm*). El NNT se refiere al número de pacientes que es necesario tratar para lograr un alivio del dolor, siendo así que el NNT ideal para obtener el efecto deseado sería 1. Por otro lado el NNH o número de pacientes que es necesario tratar para hacer daño nos indica el número de pacientes que debemos tratar para encontrar efectos adversos o producir un daño (38). Así el NNH debería ser lo más alto posible.

Tabla 7. Terapia oral sintomática de la neuropatía diabética. Modificada de (32).

Grupo farmacológico	Fármacos	Dosis (mg/día)	NNT	NNH
Antidepresivos	Amitriptilina	10 – 150	2.1 (1.5 – 3.5)	2.7 (2.1 – 3.9)
	Imipramina	10 – 150	2.7 (2.0 – 3.0)	2.7 (2.1 – 3.9)
	Duloxetina	60 – 120	5.2 (4.7 – 5.2)	SD
	Venlafaxina	150 – 225	4.5 (4.1 – 5.6)	SD
Antiepilépticos	Gabapentina	300 – 3600	3.7 (2.4 – 8.3)	2.7 (2.2 – 3.4)
	Pregabalina	150 – 600	3.3 (2.3 – 5.9)	3.7

NTT: número de pacientes que es necesario tratar; **NNH:** número necesario para hacer daño; **SD:** sin datos.

Debido al problema que representa la ND, algunas organizaciones internacionales han establecieron guías para el tratamiento de la ND con la finalidad de mejorar la calidad del paciente. En estas guías se distinguen 3 líneas de tratamiento farmacológico que se muestran en la tabla 8 (101).

Tabla 8. Pautas actuales para el tratamiento de la ND dolorosa. Modificado (101).

Línea de tratamiento	Federación Europea de sociedades Neurológicas (EFNS, 2010)	Academia Americana de Neurología (AAN, 2011)	Instituto Nacional de Excelencia clínica (NICE, 2013)	Asociación Americana de Endocrinólogos clínicos AACE (2015)	Asociación Americana de Diabetes (ADA, 2017)
1 ^{er}	Amitriptilina Duloxetina Pregabalina Venlafaxina Valproato de sodio Gabapentina Tramadol	Pregabalina	Amitriptilina Duloxetina Pregabalina Gabapentina	Amitriptilina Duloxetina Pregabalina Gabapentina Clonidina	Duloxetina Pregabalina
2 ^{da}		Amitriptilina Duloxetina Valproato de sodio Venlafaxina Gabapentina Tramadol Capsaicina	Amitriptilina Duloxetina Pregabalina Gabapentina	Tramadol Tapentadol Topiramato Oxcarbazepina Lidocaína 5% Capsaicina	Amitriptilina Gabapentina
3 ^{er}			Tramadol Capsaicina		

Estas 5 organizaciones internacionales llegaron al consenso que la primera línea de tratamiento en la ND debe ser los antiepilépticos gabapentinoides (pregabalina y gabapentina) y los antidepresivos amitriptilina y duloxetina (Tabla 8). Adicionalmente, algunos pacientes presentan mejoría utilizando opioides o terapia tópica con capsaicina y lidocaína transdérmica (100). A continuación, se describe cada una de las familias de fármacos utilizados en el tratamiento de la ND conforme a la línea de tratamiento.

1.12.1. Primera línea de tratamiento

1.12.1.1. Antidepresivos tricíclicos (ATC)

Los ATC son un grupo de fármacos que ejercen sus efectos a través de varios mecanismos de acción como son: 1) la modulación de las vías descendentes noradrenérgicas y serotoninérgicas; 2) inhibiendo la recaptura de las monoaminas serotonina (5HT) y norepinefrina (NA) y 3) bloqueando a receptores de diferentes neurotransmisores como el histaminérgico H₁, el serotoninérgico 5HT₂, el adrenérgico α₁, y el muscarínico M₁. Dentro de los antidepresivos ATC la amitriptilina y la imipramina han demostrado ser eficaces en el tratamiento de la ND dolorosa (100). Son los fármacos más recetados y se dosifican de entre 10 y 150 mg al día. El bloqueo de los receptores H₁ de histamina contribuye a los efectos sedantes asociados al fármaco, mientras que el antagonismo a los receptores colinérgicos muscarínicos favorece la disminución cognitiva y la presencia de efectos adversos en el sistema nervioso parasimpático como visión borrosa, boca seca, taquicardia, estreñimiento y dificultad para orinar. En consecuencia los pacientes frecuentemente abandonan el tratamiento debido a los efectos adversos asociados al uso (102).

1.12.1.2. Inhibidores de la recaptura de la serotonina-noradrenalina (IRSN)

Los IRSN son fármacos que ejercen sus efectos mediante la inhibición de los transportadores de monoaminas. Es decir, inhiben la recaptura de monoaminas lo que resulta en el incremento de la concentración de los neurotransmisores 5HT y NA en las vías descendentes del dolor provocando así el alivio del dolor neuropático

(103). Además, la inhibición inicial del transportador de monoaminas induce la activación de autoreceptores 5HT_{1A} y 5HT_{1D} lo que lleva a la disminución de la neurotransmisión serotoninérgica por un mecanismo de retroalimentación negativa y que perdura hasta que se produce la desensibilización de estos autoreceptores lo que resulta en un mayor incremento de la concentración de 5HT, lo cual favorece que ésta interactúe con sus receptores postsinápticos (102).

Los IRSN alivian el dolor asociado a la ND dolorosa y también son utilizados en otras condiciones dolorosas como la neuralgia postherpética, fibromialgia y dolor lumbar. En la terapéutica comúnmente se utiliza la duloxetina y en menor medida la venlafaxina. También se utiliza desvenlafaxina, sin embargo, los resultados muestran una eficacia menor en comparación con duloxetina y venlafaxina. Cabe resaltar que la duloxetina fue el primer fármaco antidepresivo aprobado por la FDA para el tratamiento de la ND. Los estudios de eficacia del fármaco demostraron que la dosis de 60 mg es significativamente más efectiva que el placebo, ya que alivio el dolor hasta en un 50% (104). Estos fármacos presentan efectos adversos como disminución del apetito, somnolencia, insomnio, disminución de la concentración, mareos, visión borrosa, sequedad en la boca, náuseas, estreñimiento y disminución de la libido (105).

1.12.1.3. Antiepilépticos

Los antiepilépticos son un grupo diverso de fármacos que se utilizan principalmente para el tratamiento de distintos tipos de epilepsia. Sin embargo, algunos de estos también son usados ampliamente en el tratamiento de afecciones de dolor crónico, como la fibromialgia, migraña, neuralgia postherpética y la ND (106). La epilepsia y el dolor crónico tienen una relación similar ya que existe un incremento de la excitabilidad neuronal en ambas condiciones. Por lo tanto, el uso de los antiepilépticos en el alivio el dolor neuropático se fundamenta en su capacidad para reducir la hiperexcitabilidad neuronal. Los antiepilépticos disminuyen la excitabilidad a través de distintos mecanismos de acción como, por ejemplo: el bloqueo de la actividad de canales iónicos, la inhibición de la neurotransmisión, el incremento de la actividad GABAérgica, y bloqueo de receptores NMDA (107, 108).

Los antiepilépticos más utilizados en el tratamiento de la ND dolorosa son los gabapentinoides pregabalina y gabapentina, y la carbamazepina (109). Los gabapentinoides se incorporaron recientemente en la terapéutica de la ND dolorosa. Tienen una estructura similar al GABA, pero no interactúan sobre el sistema GABAérgico. Estos fármacos actúan disminuyendo la actividad de canales de calcio dependiente de voltaje, particularmente de aquellos que contiene la subunidad $\alpha 2-\delta$, y por lo tanto inhiben la liberación de neurotransmisores (110). La pregabalina fue aprobada por la FDA en el 2004 para su uso en el tratamiento de la ND dolorosa, debido a su mayor potencia y eficacia demostrada en varios ensayos clínicos (111, 112). La pregabalina alivia el dolor de manera dependiente de la dosis esto se demostró en un estudio donde se evaluó las siguientes dosis 150, 300 y 600 mg/día (administradas en dos dosis al día) las tres dosis tuvieron efecto, sin embargo, la dosis de 600 mg/día fue la que resultó en el mayor alivio del dolor, por lo tanto, también se demostró ser tolerada y segura, mejorando el estado de salud general de los pacientes con ND dolorosa (113). La gabapentina también ha demostrado en estudios clínicos un efecto significativo en la sintomatología del dolor en la ND, se informó que la gabapentina a una dosis de 3600 mg/día es más eficaz que el placebo en la ND dolorosa. El mismo estudio reportó que para obtener un alivio de dolor al 50% con gabapentina el NNT debe ser 3.7 (114). Algunos de los efectos adversos más comunes de los gabapentinoides son mareos y somnolencias (102).

La carbamazepina fue uno de los primeros antiepilépticos estudiado y empleado para la ND dolorosa, hace aproximadamente más de 40 años (109). El mecanismo de acción por el cual actúa la carbamazepina es bloqueando los canales de Na^+ dependiente de voltaje para disminuir la excitabilidad de las fibras sensoriales (115). La carbamazepina ha sido utilizada en el dolor crónico principalmente en la neuralgia del trigémino, en la neuralgia postherpética, el dolor del miembro fantasma y la ND dolorosa (116). Un estudio demostró que los pacientes con ND dolorosa tratados con carbamazepina de 300 mg/día dos veces al día presentan una reducción del dolor en la escala visual analógica (EVA) de $\geq 30\%$ (117). Otro estudio multicéntrico abierto con una duración de 12 semanas con una dosis de 800 mg/día demostró una reducción del dolor de 50% en el 70% y una reducción de la intensidad

del dolor del 30% de la población estudiada reportando también una mejora en su calidad de vida (118). Sin embargo, sus efectos adversos severos (supresión de la médula espinal y la osteoporosis) han llevado a los pacientes a abandonar el tratamiento y ha sido remplazado por antiepilépticos que presenten menos efectos adversos (100).

Otro antiepilépticos que también han sido estudiados para el tratamiento de la ND dolorosa son el topiramato y lamotrigina pero hasta el momento no han demostrado resultados concluyentes en el alivio del dolor (100, 119).

1.12.2. Segunda línea de tratamiento

1.12.2.1. Analgésicos opioides

Los analgésicos opioides son un grupo de fármacos utilizados en el alivio del dolor, estos siguen siendo los analgésicos más eficaces para diferentes síndromes de dolor agudo o crónico, pero su utilidad clínica está limitada por la tolerancia y la adicción (120). Los opioides son productos derivados del opio extraídos de la amapola (*Papaver somniferum*). Los analgésicos opioides se dividen en 1) alcaloides naturales derivados de la amapola (p. ej. morfina, codeína, papaverina, tebaína), 2) opioides semisintéticos (p. ej. dimorfina, dihidrocodeína, buprenorfina, naloxona, oxicodona) y opioides sintéticos (p. ej. petidina, fentanilo, metadona, tapentadol). Los opioides interactúan mediante tres tipos de receptores opioides como: MOR (μ), DOR (δ) y KOR (κ) (121, 122). Los opioides se pueden clasificar por interacción de los receptores opioides (actividad intrínseca) como agonistas completos (tramadol, morfina, codeína metadona, etc.), agonistas parciales (buprenorfina), agonistas-antagonistas (pentazocina) y antagonistas (naloxona, naltrexona), también se clasifican por su potencia analgésica (Tabla 8) (123).

Tabla 9. Clasificación de los opioides según su potencia. Modificada de (123).

Opioides débiles	Opioides fuertes
<ul style="list-style-type: none"> • Codeína • Dihidrocodeína • Tramadol 	<ul style="list-style-type: none"> • Morfina • Hidrocodona • Metadona • Fentanilo

	<ul style="list-style-type: none">• Hidromorfona• Buprenorfina• Carfentanilo
--	--

El mecanismo de acción de los opioides mediante el cual se produce analgesia es por activación de los receptores opioides acoplados a proteínas G inhibitorias. A nivel del asta dorsal el mecanismo de acción inicia en las terminales aferentes primarias presinápticas (fibras C) y postsinápticas en las neuronas de segundo orden. La activación de los receptores MOR bloquean la apertura de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje, mientras en las neuronas de segundo orden la activación de MOR mejora la apertura de los canales de K^+ que lleva a la hiperpolarización de la membrana, disminuyendo la excitabilidad y evitando la transmisión de la información hacia centros superiores. Mientras a nivel de la SGPA la acción de los opioides provoca la activación de MOR que inhiben la liberación de GABA de los sistemas de la SGPA tónicamente activos que regulan la actividad de las proyecciones de la médula espinal. La activación de las proyecciones de la SGPA a la médula espinal liberan 5HT y NA, disminuyendo la excitabilidad del asta dorsal (102).

El perfil de los efectos adversos de los opioides es complejo, esto debido a la distribución de los receptores en el SNC. El uso de opioides a largo y corto plazo se asocia a múltiples efectos adversos. En el SNC los efectos adversos incluyen euforia, sedación, somnolencia, depresión respiratoria, miosis, rigidez del tronco, náuseas y vómito; en el tracto gastrointestinal encontramos estreñimiento, disminución en la motilidad y en la digestión del intestino delgado; en la piel se encuentra prurito y sudoración y en el sistema cardiovascular se presentan efectos adversos como disminución en la presión arterial y ritmo cardíaco (121).

Los opioides han sido utilizados para tratamiento del dolor agudo de gran intensidad por mucho tiempo, sin embargo su uso en el tratamiento del dolor crónico se ha limita debido a su perfil de seguridad y potencial de abuso (102). Debido a lo anterior las pautas internacionales los consideran actualmente en la tercera línea de tratamiento. Entre estos fármacos destaca el opioide débil tramadol.

El tramadol es un opioide de acción central agonista parcial de los receptores μ . Se le considera un opioide atípico porque éste también inhibe la recaptura de 5HT y NA (124). Debido a estas características se ha estudiado su utilidad en diversas condiciones que cursan con dolor crónico. La colaboración de Cochrane realizó una revisión sobre el estudio del tramadol en pacientes con dolor neuropático, de los estudios revisados un estudio evaluó a los pacientes con ND dolorosa, en este estudio doble ciego aleatorizado con placebo se inició con una dosis de 50 mg/día hasta alcanzar una dosis de 400 mg/día presentando un alivio del dolor del 30% en los pacientes. Los pacientes del estudio reportaron efectos adversos principalmente náuseas (23.1%), estreñimiento (21.5%), dolor de cabeza (16.9%) y somnolencia (12.3%) (124). Los opioides analgésicos en el tratamiento de la ND dolorosa siguen siendo restringidos, debido que la mayoría de los estudios realizados han sido pequeños en tamaño de muestra y duración y no han demostrado el riesgo beneficio en los pacientes. Los efectos adversos a largo plazo de dependencia y abuso opioides limitan su uso (100).

1.12.3. Tercera línea de tratamiento

1.12.3.1. Medicamentos tópicos

Los tratamientos tópicos para la ND dolorosa se recomiendan en pacientes que no toleran terapias sistémicas convencionales, o bien en aquellos con múltiples comorbilidades y con polifarmacia con la finalidad de reducir el riesgo de las interacciones medicamentosas. Los tratamientos tópicos más utilizados son capsaicina 0.075% y lidocaína 5% (101).

La capsaicina es un alcaloide natural que se encuentra en los chiles rojos. Ésta actúa agotando la SP de las terminales nerviosas impidiendo así su interacción con los canales TRPV1. Esto provoca una reducción en la transmisión de la información nociceptiva en el SNC. En cuanto a su eficacia en la ND, el grupo de estudio de capsaicina realizó una evaluación para demostrar la eficacia de la crema de capsaicina tópica (0.075%) en el alivio del dolor. Se encontró que la capsaicina tópica con un esquema de administración de 4 veces al día por 8 semanas mostró

efecto del alivio del dolor 58.4% en comparación con el placebo (45.3%) y también se reportó una disminución en la intensidad 38.1%. Se encontró que este tópico produjo un alivio en el dolor significativo a comparación del placebo. Los efectos adversos más comunes fueron ardor transitorio, estornudos y tos, estos se presentaron durante la aplicación de la capsaicina (125).

La lidocaína en parches al 5% ha funcionado como analgésico tópico en la ND. Los estudios con lidocaína comparándola con fármacos como amitriptilina, pregabalina y gabapentina han sido pocos. En un estudio multicéntrico aleatorizado de 4 semanas de evaluación se comparó la lidocaína 5% parche contra la pregabalina (sistémica). La lidocaína al 5% en parche se permitió administrar 4 parches en el área dolorosa cada 12 horas dentro de un periodo de 24 horas, mientras que la pregabalina en la primera semana se inició con una dosis de 150 mg/día, en la segunda semana 300 mg/día y las semanas 3 y 4 600 mg/día de pregabalina. Los resultados fueron que la lidocaína 5% mejora el alivio del dolor y calidad de vida del paciente en comparación con la pregabalina, la lidocaína 5% presenta efectos adversos menores como dolor de cabeza e irritación en el sitio de aplicación (126).

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1. Modelos animales de neuropatía diabética

Los modelos animales son herramientas importantes para el estudio de la fisiopatología de la ND, así como para la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento. Debido al incremento del número de casos de DM y por ende de sus complicaciones, también ha habido un incremento en el desarrollo de diversos modelos animales disponibles para el estudio de esta patología y sus complicaciones (127). Los modelos existentes se han desarrollado en diferentes especies de animales que incluyen cerdos, perros, gatos, conejos, ratas y ratones. Los modelos desarrollados en animales grandes son difíciles de mantener y requieren de mayores costos de manutención por lo que no se utilizan frecuentemente. Por otro lado, entre los modelos implementados en especies pequeñas, los desarrollados en roedores son la primera opción debido a su tamaño,

su naturaleza omnívora y su conducta no agresiva que permiten un fácil manejo para los investigadores, así como una reducción significativa en los costos de mantenimiento y alimentación (128). Sin embargo, cuando se considera usar un modelo animal es importante preguntarnos lo siguiente: 1) ¿los animales desarrollan las principales características de la enfermedad?, 2) ¿esta característica surge como consecuencia del mismo proceso fisiopatológico? En este contexto es claro que pocos modelos animales son réplicas exactas de la enfermedad en el humano. Sin embargo, las discrepancias a veces pueden mitigarse razonablemente con otras ventajas como la capacidad de realizar experimentos no permitidos en humanos, la progresión acelerada de la enfermedad que hace que los estudios longitudinales sean viables, o un costo reducido en comparación con la investigación clínica (129).

Por otro lado, para estudiar complicaciones de la DM, en primer lugar, se debe contar con modelos de DM que lleven al desarrollo de estas. Los primeros modelos animales de DM se produjeron extirpando total o parcialmente el páncreas, posteriormente se utilizaron sustancias químicas, principalmente toxinas como estreptozotocina (STZ) y aloxano (130), y más adelante se introdujeron modelos genéticos. Actualmente, los modelos de DM existentes pueden clasificarse en genéticos o espontáneos, y no genéticos o inducidos experimentalmente. Adicionalmente, se pueden diferenciar por el tipo de DM en modelos de DMT1 y DMT2. Estos modelos buscan replicar de manera robusta la sintomatología del humano tanto a corto como a largo plazo. En este aspecto es importante destacar que la ND se produce tanto en pacientes con DMT1 como en pacientes con DMT2. Sin embargo, evidencia reciente sugiere que la ND resultante de la DMT1 puede ser un desorden distinto de la ND derivada de la DMT2. Esta premisa tiene como base los resultados de estudios clínicos en donde se observó que el control glucémico estricto atenúa y retrasa el inicio y desarrollo de la ND en pacientes con DMT1, pero no en pacientes con DMT2 (131).

Debido a la complejidad de la fisiopatología de la DM, las numerosas complicaciones que se desarrollan como consecuencia de estas y al incremento de la investigación en este campo, los institutos nacionales de salud de los Estados

Unidos de América crearon el Consorcio de Complicaciones de la Diabetes (DiaComp) cuyo principal objetivo es identificar y caracterizar nuevos modelos animales de las complicaciones de la DM. En cuanto a modelos de ND el DiaComp estableció que un modelo animal de esta complicación debe presentar características presentes en la patología humana, como son: 1) síntomas sensoriales anormales, 2) alteraciones en la velocidad de conducción nerviosas (NCV, *del inglés nerve conduction velocity*), y 3) disminución de la densidad de fibras nerviosas intraepidérmicas (IENFD). Un modelo animal de ND debe presentar al menos dos de los criterios anteriores (Figura 5). Además, durante el desarrollo de un modelo de ND es importante caracterizar el fenotipo metabólico mediante seguimiento de parámetros como el peso corporal, niveles de glucosa en sangre en ayunas y la intolerancia a la glucosa (132).

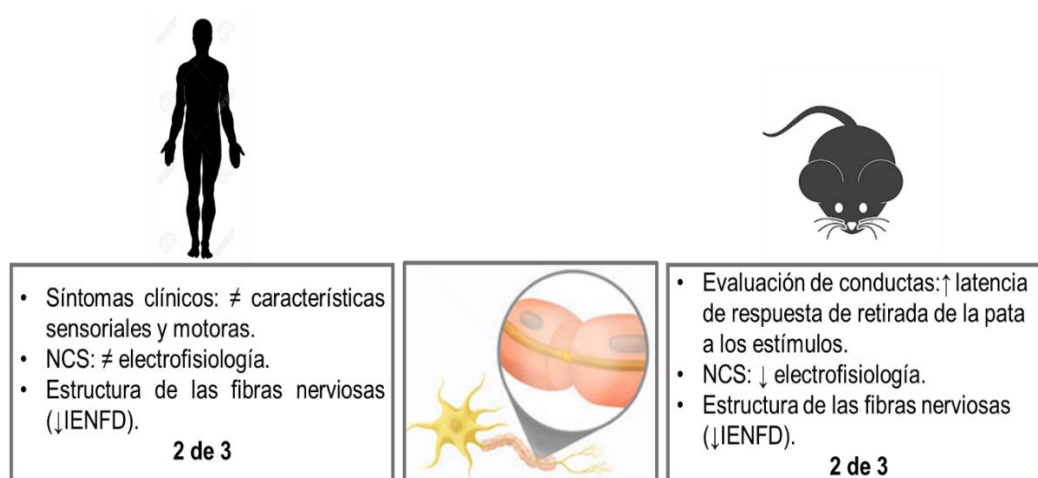


Figura 5. Criterios comparativos para modelos humanos y roedores en la neuropatía diabética. Modificada de (133). NCS: estudios de conducción nerviosa, IENFD: densidad de fibras nerviosas intraepidérmicas.

Así en el desarrollo y caracterización de un modelo animal de ND se utilizan diversos métodos para evaluar conductualmente los cambios sensoriales, NCV, e IENFD. La evaluación sensorial se realiza mediante evaluaciones conductuales que permiten identificar la presencia de alodinia, hiperalgesia e hipoalgesia en respuesta a la aplicación de estímulos térmicos o mecánicos. Para esto el DiaComp recomienda las pruebas de tail flick y la prueba de filamentos de von Frey, respectivamente. Por

otro lado, para evaluar función nerviosa el DiaComp recomienda medir la NCV de nervios motores y sensoriales, ya que este parámetro se considera el “gold standar” para identificar déficit neuronal. Finalmente, la determinación de IENFD se realiza para analizar la morfología neuronal a nivel anatómico (134). Este parámetro es un marcador sensitivo que muestra la pérdida de fibras nerviosas sensoriales pequeñas tanto a nivel clínico como preclínico (135). A continuación, se describen los modelos de DM más utilizados, así como las características fenotípicas que evidencian el desarrollo de ND.

2.1.1. Modelos de neuropatía en roedores con DMT1

Los modelos de DMT1 existentes pueden ser espontáneos o inducidos. Los modelos inducidos son los más frecuentemente utilizados, y en su mayoría se generan por destrucción de las células β -pancreáticas mediante la inyección de sustancias químicas como aloxano y estreptozotocina (STZ). Estas son consideradas las sustancias diabetogénicas más potentes utilizadas en investigación científica. Sin embargo, la inducción de DMT1 por aloxano ha sido remplazada en gran medida por la inducción con STZ. La popularidad de este modelo radica en la facilidad de la inducción de la DM y la capacidad de sincronizar consistentemente la DM en una cohorte de animales. Además, los modelos de DM inducidos por STZ son baratos. La STZ es un antibiótico producto de *Streptomyces achromogenes*. Desde el punto de vista químico es un análogo de nitrosourea con características estructurales similares a las de la glucosa lo que favorece su captación por las células β -pancreáticas a través del transportador de glucosa 2 (GLUT 2) (136). La alta toxicidad de la STZ se atribuye a su poderosa actividad alquilante que interfiere con el transporte de glucosa e induce ruptura de la doble cadena de ADN (137).

Para inducir modelos experimentales de DMT1 utilizando STZ el DiaComp recomienda dos esquemas de administración por vía intraperitoneal. Estos han sido empleados tanto en rata como ratón. El primer esquema consiste en la administración de una única dosis alta, generalmente entre 90 y 260 mg/Kg (Tabla 10) (138-147), mientras que el segundo consiste en la administración de múltiples dosis bajas, comúnmente 5 administraciones consecutivas (una por día) de entre

25 y 55 mg/Kg (Tabla 11) (127, 135, 148-155). Además, existe una variante del esquema de múltiples dosis en donde se ha utilizado un esquema de tres dosis (55, 70 y 85 mg/Kg) que se administran en forma creciente o decreciente (una por día). Utilizando cualquiera de estos esquemas de administración se produce DM y los roedores desarrollan características del fenotipo neuropático (156-158). Por ejemplo, en ratas Sprague Dawley o Wistar inducidas con una dosis de 90 o 100 mg/kg de STZ, respectivamente, se observaron alteraciones sensoriales como lo son el incremento de la latencia a estímulos térmicos, acompañado de una disminución de la NCV motora y sensorial, y una disminución en la IENFD. Estos cambios se observaron entre las 12 y 25 semanas post-STZ (138-141). En ratón la cepa más utilizada para modelos de DMT1 es la C57BL/6 y la mayoría de los estudios se realizó en ratones macho adultos. El rango de dosis de STZ para la inducción osciló entre 100 y 180 mg/Kg. En estas condiciones los ratones exhiben un fenotipo neuropático robusto y temprano que se caracteriza por aumento de la latencia térmica y disminución de la sensibilidad mecánica, de la NCV y de la IENFD. Estos cambios se observaron generalmente entre las 3 y las 12 semanas post-STZ (141-145). Cabe mencionar que la inducción de DMT1 con una sola dosis de STZ, también se ha realizado en otras cepas de ratón (Swiss webster y BALB/C), sin embargo, destaca el hecho de que la inducción de DM se realizó con dosis mucho mayores de STZ (200-260 mg/Kg). En estos modelos el fenotipo neuropático se observó desde las 3 y las 8 semanas post-inducción. Sin embargo, los cambios fueron más robustos a las 8 semanas post-STZ (146, 147). Además, es importante mencionar que, con una sola dosis alta, particularmente aquellas mayores de 180 mg/Kg se observó toxicidad severa y altos índices de mortalidad post-inyección.

Tabla 10. Modelos de neuropatía en roedores con DMT1 inducidos por una sola dosis de STZ.

Dosis de STZ	Especie/ cepa/ peso	Duración de la DM (semanas)	Fenotipo neuropático			Ref
			Alteraciones sensoriales	NCVs	Densidad de fibras nerviosas	
90 mg/Kg	Rata Sprague Dawley macho 275-325 g	20, 24	↑ Latencia a estímulos térmicos (12-24 semanas post-STZ)	ND	↓ IENFD ↓ SNP (20, 24 semanas post-STZ)	(138, 139)

	Rata Sprague Dawley hembra 200-250 g	22	↑ Latencia a estímulos térmicos (22 semanas post-STZ)	↓ SNCV ↓ MNCV (12-22 semanas post-STZ)	ND	(159)
100 mg/Kg	Rata Wistar Macho 250-300g	12	↑ Latencia a estímulos térmicos, ↑ del umbral de retiro a estímulos mecánicos, Alodinia táctil (12 semanas post-STZ)	↓ SNCV ↓ MNCV (12 semanas post-STZ)	↓ IENFD (12 semanas post-STZ)	(160)
	Ratón C57BL/6 Macho 20-25 g	6	↑ Latencia a estímulos térmicos, hipersensibilidad mecánica (6 semanas post-STZ)	↓ SNCV ↓ MNCV (6, 12 semanas post-STZ)	↓ IENFD (6, 12 semanas post-STZ)	(142)
		12	↑ Latencia a estímulos térmicos ↑ del umbral de retiro a estímulos mecánicos Alodinia táctil (12 semanas post-STZ)			(160)
150 mg/Kg		8	↑ Latencia a estímulos térmicos (8 semanas post-STZ)	↓ SNCV ↓ MNCV (8 semanas post-STZ)	ND	(161)
180 mg/Kg	Ratón C57BL/6 Macho 8 semanas de edad	3	ND	↓ MNCV (3, 4, 8 semanas post-STZ)	ND	(144)
		4, 8	↑ Latencia a estímulos térmicos Alodinia mecánica Hipoalgesia química (4, 8 semanas post-STZ)		↓ IENFD (8 semanas post-STZ)	(145)
200 mg/Kg	Ratón Swiss webster Macho 20-30 g	8	↑ Latencia a estímulos térmicos (8 semanas post-STZ)	↓ MNCV (8 semanas post-STZ)	ND	(162)
260 mg/Kg	Ratón BALB/cJ	6	Sin cambios en el umbral de retiro mecánico (0-6 semanas post-STZ)	↓ MNCV (6 semanas post-STZ)	↓ IENFD (6 semanas post-STZ)	(163)

NCV: Velocidad de conducción nerviosa, **MNCV:** Velocidad de conducción de nervios motores, **SMCV:** velocidad de conducción nerviosa sensorial, **IENFD:** Densidad de las fibras nerviosa intraepidérmicas.

Por su parte el protocolo de múltiples dosis bajas genera menor toxicidad, y una elevación gradual de los niveles de glucosa en sangre, con infiltración de linfocitos

a los islotes pancreáticos, lo cual refleja mejor lo que ocurre en la patología humana (134). En ratas, utilizando un esquema de 5 dosis de 25 o 30 mg/Kg solo se detectaron cambios sensoriales como hipersensibilidad mecánica e incremento de la latencia a estímulos térmicos entre las 4 y 8 semanas post-inducción. Sin embargo, en estos estudios no se determinaron las alteraciones en la NVC y la IENFD (148, 149). En ratones, la inducción de DMT1 utilizando múltiples dosis pequeñas se ha usado con más frecuencia que en rata. La cepa de ratón más utilizada es la C57BL/6 y nuevamente la mayoría de los estudios fueron realizados en machos adultos. Las dosis de STZ empleadas han sido diferentes de estudio a estudio, así encontramos esquemas de 5 dosis de 25, 40, 45, 50 y 55 mg/Kg (127, 135, 150, 151, 154, 155). Mientras que el fenotipo neuropático se ha estudiado en diferentes tiempos. Una desventaja de la inducción de DMT1 con esta aproximación es que se produce neuropatía moderada y en algunos casos o ausencia de los signos neuropatía (127, 155). El fenotipo neuropático se observa en algunos casos desde las 6 semanas, pero parece ser más robusto 24 semanas después de la inducción. De forma similar, el esquema de 3 dosis crecientes o decrecientes para inducir DMT1 en ratones macho de la cepa Swiss Webster en donde se observaron los tres componentes del fenotipo neuropático 12 y 36 semanas post-STZ (156-158). Estos hallazgos se resumen en la tabla 11.

Tabla 11. Modelos de neuropatía en roedores con DMT1 inducidos por múltiples dosis bajas de STZ.

Esquema de administración	Especie/ cepa/ peso	Duración de la DM (semanas)	Fenotipo neuropático			Ref
			Evaluación conductual	NCVs	Densidad de fibras nerviosas	
25 mg/Kg/día, 5 dosis	Rata Lewis Macho 200-250 g	4	Hiperalgnesia mecánica (2-4 semanas post-STZ)	ND	ND	(148)

30 mg/Kg/día, 3 dosis	Rata Wistar Macho	8	↑ Latencia a estímulos térmicos y ↑ del umbral de retiro a estímulos mecánicos (8 semanas post-STZ) Hiperalgnesia mecánica (4 semanas post-STZ)			(149)
40 mg/Kg/día, 5 dosis	Ratón C57BL/6 Macho 8 semanas de edad	6, 24	ND	↓ SNCV ↓ MNCV (6, 24 semanas post-STZ)	ND	(135, 150)
	Ratón C57BL/6 Macho 4 semanas de edad	14	↑ Latencia a estímulos térmicos (14 semanas post-STZ)	ND		(151)
	Ratón DBA 22 g	24	↑ Latencia a estímulos térmicos (24 semanas post-STZ)	↓ SNCV ↓ MNCV (24 semanas post-STZ)		(164)
45 mg/Kg/día, 5 dosis	Ratón ICR Macho 10 semanas de edad	6	↑ Latencia a estímulos térmicos (7 semanas post-STZ)	↓ SNCV ↓ MNCV (8 semanas post-STZ)	↓ IENFD (8 semanas post-STZ)	(165)
50 mg/Kg/día, 5 dosis	Ratón C57BL/6 Macho 8 semanas de edad	22	↑ Latencia a estímulos térmicos ↑ del umbral de retiro a estímulos mecánicos (22 semanas post-STZ)	ND	↓ IENFD (22 semanas post-STZ)	(154)
55 mg/Kg/día (i.p.), 5 dosis	Ratón C57BL/6 Macho 8 semanas de edad	24	SC en la latencia a estímulos térmicos (12, 24 semanas post-STZ)	SC en: SNCV y MNCV (24 semanas post-STZ)	ND	(127, 155)
55, 70 o 85 mg/Kg/día (i.p.), 3 dosis crecientes	Ratón C57BL/6 Hembra/ Macho 8 semanas de edad	24	↑ Latencia a estímulos térmicos Hiperalgnesia mecánica (12 semanas post-STZ)	↓ SNCV ↓ MNCV (12, 24 semanas post-STZ)	↓ IENFD (24 semanas post-STZ)	(166)

85, 70 o 55 mg/Kg/día (i.p.), 3 dosis decrecientes	Ratón Swiss Webster 19-21 g	12	↑ Latencia a estímulos térmicos ↑ del umbral de retiro a estímulos mecánicos (12 semanas post-STZ)	↓ SNCV ↓ MNCV (12, 36 semanas post-STZ)	↓ IENFD (12, 36 semanas post-STZ)	(157)
	Ratón Swiss Webster Macho 20-30 g	36	ND			(167)

NCV: Velocidad de conducción nerviosa, **MNCV:** Velocidad de conducción de nervios motores, **SMCV:** Velocidad de conducción nerviosa sensorial, **IENFD:** Densidad de las fibras nerviosa intraepidérmicas, **ND:** No determinado, **SC:** Sin cambios.

Como se puede observar hasta el momento, existe una gran variabilidad en los modelos de DM inducidos por STZ, tanto en las dosis empleadas, el tipo y la cepa de roedor utilizada y los tiempos en los que se evaluaron las características del fenotipo neuropático. Lo anterior se debe en parte a diferencias en la potencia de la STZ de distintos lotes, lo que resulta en variaciones en la severidad de la diabetes que puede variar considerablemente dentro y entre laboratorios. Esta variabilidad puede afectar el número de ratones que desarrollan DM en una cohorte de animales inyectados con STZ (% de inducción), la severidad de la insulinopenia, el inicio y la magnitud de los indicadores de neuropatía y la duración de la supervivencia del animal (129). En este contexto, es particularmente importante diseñar experimentos en donde se incluyan todos los grupos necesarios para formar un estudio completo cuyos resultados se puedan interpretar, ya que puede ser problemático hacer comparaciones entre estudios incluso dentro de un mismo laboratorio.

Por otro lado, se han desarrollado una variedad de modelos genéticos (espontáneos) de DMT1 generados ya sea por la destrucción autoinmune del páncreas (ratón NOD) o alterando el plegamiento de la proinsulina lo que lleva a una disminución de la secreción de insulina y falla de las células β -pancreáticas (mutación Insulina^{2Akita}). El ratón NOD, es un ratón sin obesidad que desarrolla DM como consecuencia de una inmunodeficiencia poligénica heredable que refleja muy bien la DMT1 del humano. En esta cepa de ratón la diabetes inicia entre las 12 y 14 semanas de edad (168). Sin embargo, la progresión presenta una gran variabilidad

y factores como la dieta y el hospedaje afectan el desarrollo y prevalencia entre cohortes de animales. El sexo también afecta el inicio de la diabetes, las hembras desarrollan los síntomas de la DM más rápido y con mayor frecuencia por lo que se prefieren en comparación de los machos. Sin embargo, todo lo anterior se traduce en que se requieren grupos grandes de animales que tengan un fenotipo diabético similar. En cuanto al fenotipo neuropático, solo se ha evidenciado que estos ratones presentan alteraciones sensoriales a las 8 semanas de edad. De forma similar, los ratones Akita presentan DM que inicia alrededor de las siete semanas de edad. Estos ratones no secretan insulina por lo que presentan hiperglucemia severa y requieren terapia con insulina (169). En estos ratones se ha observado una disminución de la NCV a las 16 semanas de edad (170, 171). Sin embargo, en un estudio realizado en ratones de 24 semanas de edad, no se observaron estos cambios, aunque se observó una tendencia a incrementar la latencia de respuesta a estímulos térmicos e hiperalgesia (Tabla 12) (127, 172). Ambos tipos de ratones están disponibles comercialmente. Sin embargo, no se han utilizado ampliamente en estudios de neuropatía por las siguientes razones: 1) su alto costo, 2) limitada disponibilidad, 3) la existencia de un sesgo con respecto al sexo en los ratones (machos).

Tabla 12. Modelos de neuropatía en modelos genéticos de DMT1

Cepa	Edad (Semanas)	Fenotipo neuropático			Ref
		Evaluación conductual	NCVs	Densidad de fibras nerviosas	
Ratones NOD Hembra	18, 32	↓ Latencia térmica (8 semanas) ↑ Latencia térmica (8 semanas)	ND	ND	(173, 174)
Ratones NOD (Ins.D ^{d1}) Macho	28	ND	↓ SNCV ↓ MNCV (16 semanas)	↓ MNFD del nervio sural y ciático	(175)
Ratones C-57BL/6 Ins2 ^{C96Y} Akita Macho	20	ND	↓ SNCV (16 semanas)	ND	(176)

Ratones Akita, Macho	20	↓ Latencia mecánica ↓ Latencia térmica ↓ Alodinia táctil (16 semanas)	↓ SNCV ↓ MNCV (16 semanas)	↓ MNFD del nervio tibial	(171)
Ratones B6Ins2 Akita Macho	24	Abstinencia de latencia térmica (24 semanas)	SC en: SNCV MNCV	ND	(177)
Ratones C57BL/6 Akita (C96Y)	24	↓ Latencia térmica (24 semanas)	Sin cambios en: MNCV ↓ SNCV	ND	(178)

NVCV: Velocidad de conducción nerviosa, **MNCV:** Velocidad de conducción de nervios motores, **SNCV:** velocidad de conducción nerviosa sensorial, **INFD:** Densidad de las fibras nerviosas intraepidérmicas, **ND:** no determinado, **SC:** sin cambios.

2.1.2. Modelos de neuropatía en roedores con DMT2

La DMT2 es una enfermedad que se produce por diversos factores entre los que se incluyen el background genético, dietas hipercalóricas y vida sedentaria. Por esta razón los modelos de DMT2 desarrollados recientemente se inducen utilizando algunas de estas aproximaciones. Los modelos animales existentes de DMT2 se pueden clasificar en 1) modelos genéticos, 2) inducidos por químicos, 3) inducidos por dieta hipercalóricas o 4) la combinación de dieta hipercalórica y químicos (127). Estos modelos reproducen las complicaciones de la patología observada en los humanos ya que afectan principalmente a la retina, el riñón y los nervios periféricos. El objetivo principal de las investigaciones científicas actuales es el desarrollo de modelos de DM que reproduzcan las complicaciones de la diabetes a largo plazo. A continuación, se describen los principales modelos de DMT2. Así como las características el fenotipo neuropático que manifiestan.

Los modelos genéticos de DMT2 pueden ser monogénicos (alteración de un solo gen) y poligénicos (alteración de más de un gen). Estos modelos desarrollan RI, hiperinsulinemia, hiperglucemia o síndromes similares a la diabetes. Los modelos más utilizados en la investigación son los que se producen por mutaciones en el gen de Leptina (ratones *ob/ob*) o en el receptor de leptina (ratones *db/db*) y también se encuentran ratones con el receptor de insulina inactivo (Tabla 13). La leptina es

una hormona secretada postprandialmente por los adipocitos y controla el apetito mediante la señalización hipotalámica. Los modelos de leptina imitan el perfil metabólico diabético provocando hiperfagia y consecutivamente obesidad, hiperglucemia e hiperinsulinemia. Al comparar a estos dos modelos se encontró que los ratones *ob/ob* presentan deficiencia de insulina y desarrollan obesidad temprana que se caracteriza por hiperfagia, gasto energético reducido, RI asociada a hiperglucemia e hiperinsulinemia e infertilidad, considerándose un modelo de obesidad y DMT2 leve. En cuanto a las características de ND, estos ratones exhiben disminución de la NVC motora y sensorial, hipoalgesia térmica, alodinia táctil y alteraciones en la IENFD a partir de las 11 semanas de edad (179). Por otro lado, los ratones *db/db* desarrollan hiperglucemia marcada en diferentes cepas de ratones, su principal diferencia es la resistencia a la leptina debido a la mutación del receptor, estos ratones se caracterizan por obesidad mórbida, niveles elevados de leptina, RI y DM. Cabe destacar que estos dos modelos genéticos han sido los más caracterizados en su tipo mediante diferentes pruebas como el tail flick, placa caliente, método de *up-down*, alodinia por frío, prueba electrofisiológica para la evaluación de NCV e inmunohistoquímica para determinar la IENFD. Uno de los hallazgos más importantes es que no desarrollan el fenotipo completo de la ND. Algunas veces estos modelos presentan ND y en otras ocasiones es ausente, y la gravedad de la ND depende de la cepa del ratón con la que se desee trabajar. Estudios realizados en los ratones desarrollan hipoalgesia térmica entre las 12 y 16 semanas de edad e hipersensibilidad mecánica a partir de las 10 semanas de edad. Las alteraciones sensoriales se acompañan de alteraciones en la NCV motora y sensorial que se observa de las 8 a las 16 semanas de edad acompañada de disminución de la IENFD a las 24 semanas de edad (127, 155, 157, 179-185).

Tabla 13. Modelos de neuropatía en ratones con DMT2 inducida por alteraciones en la Leptina.

Cepa	Duración del estudio	Fenotipo neuropático			Ref
		Evaluación conductual	NCVs	Densidad de fibras	
Ratón KO C57BLKS/J- m ^{+/+} Lep ^{db} (db/db) macho de 8 – 12 semanas	4	↓ Latencia térmica (12 semanas de edad)	↓ MNCV ↓ SNCV (8, 10 y 12 semanas de edad)	ND ↓ Densidad capilar (12 semanas de edad)	(180)
Ratón KO C57BKS.Cs- m ^{+/+} Lep ^{db} /J (db/db) macho de 16 semanas	16	↓ Latencia térmica ↓ Latencia táctil (19 y 24 semanas)	↓ MNCV ↓ SNCV (19 y 24 semanas)	↓ IENFD (24 semanas)	(181)
Ratón KO C57BLKS/J-m ^{+/+} Lep ^{db} (db/db) Macho de 4 semanas	24	↓ umbral mecánico (4, 8, 12, 16, 20 y 24 semanas de edad)	ND	ND	(182)
Ratón KO C57BKSDock7 ^{m+/+} Lep ^{db} /J (db/db) Macho de 10 semanas	8	↓ Latencia táctil NS: Latencia térmica (14 y 18 semanas de edad)	↓ MNCV ↓ SNCV (14 y 18 semanas de edad)	↓ IENFD (18 semanas de edad)	(157)
Ratón KO BKS.Cg-m ^{+/+} Lep ^{db} /J (db/db) Machos de 8 semanas	16	NS: Latencia térmica (24 semanas de edad)	↓ TSNCV ↓ MNCV ↓ TDML (24 semanas de edad)	↓ IENFD (24 semanas de edad)	(127)
Ratón KO C57BL/KsJm/Leptdb (db ⁻ /db ⁻) Macho de 5 a 6 semanas	28 semanas	↑ Latencia térmica ↓ Latencia al frío ↓ Latencia táctil (6, 4,6,13 y 28 semanas de edad)	↓ NMCV (27 y 28 semanas de edad)	↓ Neuronas DGR (27 y 28 semanas de edad)	(183)

Ratón KO B6. Cg-m+/+Lepr ^{db} /J a.k.a. (db/db) Macho de 6 a 8 semanas	16	↓ Latencia térmica (8 y 12 semanas de edad)	↓ MNCV (12 y 24 semanas de edad)	↓ IENFD (24 semanas de edad)	(155)
Ratón KO C57Bl6/J (ob / ob) macho Edad: 4 semanas	6	↓ Latencia táctil ↓ Latencia térmica (11 semanas de edad)	↓ SNCV (11 semanas de edad)	↓ IENFD (11 semanas de edad)	(179)
Ratón KO C57BLKS / J-m ^{+/+} Lepr ^{db} (db/db) Macho de 5 semanas	12	↓ Umbral mecánico (8 semanas de edad)	ND	ND	(184)
Rata KO ZDF/crl-lepr/fa (db/db) Machos de 8 semanas	28	↓ Umbral mecánico Ns: Latencia térmica (12 y 28 semanas de edad)	↓ MNCV ↓ SMCV (12 y 28 semanas de edad)	ND	(185)

NCV: Velocidad de conducción nerviosa, **MNCV:** Velocidad de conducción de nervios motores, **SMCV:** velocidad de conducción nerviosa sensorial, **IENFD:** Densidad de las fibras nerviosa intraepidérmicas, **ND:** no determinado, **SC:** sin cambios.

Finalmente tenemos los modelos de DMT2 inducidos por dietas hipercalóricas solas (Tabla 14) o su combinación con STZ (Tabla 15). En estos modelos se busca producir un desbalance metabólico gradual que lleve a la progresión natural de obesidad y finalmente a la DMT2. Los modelos por dieta alta en grasas se inducen en la mayoría de los casos, utilizando dietas de roedor comerciales que poseen distinto porcentaje de grasa y/o carbohidratos (del 45 al 60%), y con cada una de ellas se presenta diferente fenotipo neuropático. Para estos modelos los ratones más utilizados son machos C57BL6 de 3 a 12 semanas de edad al inicio del experimento. La duración de la aproximación dietética alta en grasa (45%) tuvo una duración entre 12 y 34 semanas. En estos estudios se observó que de las 12 semanas y hasta al término del experimento se presentaron principalmente alteraciones sensoriales como el incremento de la latencia a estímulos térmicos, disminución en la NCVs y IENFD (186-188). Por otro lado, los C57BL6 machos de

7 semanas alimentados por 8 semanas con una dieta alta en grasas de 54% mostraron incremento en la latencia térmica, disminución del umbral de retiro y disminución en la NCVs (189). De igual forma, en modelos de prediabetes en donde los ratones fueron alimentados con una dieta alta en carbohidratos y grasa (58%) a partir de las 8 semanas de edad, por un periodo de 16, 23 o 24 semanas presentaron un incremento en la latencia térmica y táctil, una disminución del umbral mecánico y disminución de la NVC en todos los tiempos evaluados. Sin embargo, no se estudiaron los cambios en la IENFD después de 16 y 23 semanas (190, 191). En un estudio posterior con características similares se reportó disminución de la IENFD (141, 192). Finalmente, en dos modelos con ratones C57Bl6/J de entre 6 a 16 semanas se trataron con una dieta alta en grasas de 60% durante 8 semanas a las semanas 16 presentaron incremento en la latencia térmica, disminución de la NCV y déficit en la densidad de fibras (193, 194). En estos modelos se puede observar que la inducción del fenotipo neuropático se presentó de forma robusta después de 16 semanas de tratamiento. Sin embargo, el punto de tiempo más estudiado fue 24 semanas. Cabe destacar que en algunos de estos estudios no está reportado el perfil metabólico.

Tabla 14. Modelos de neuropatía diabética en ratones con DMT2 inducida por una dieta alta en grasas.

Composición y duración del tratamiento dietético	Especie/ cepa/ edad	Semana de ev.	Parámetros bioquímicos	Fenotipo neuropático		Ref
				Parámetro	Resultado	
24% grasa (Dieta D12451; Research Diets,) por 12 semanas	Ratón C57/BL6 macho de 12 semanas	12	↑ peso (≈ 10 g) S/C en [glucosa] ↑ en % de grasa corporal Tolerancia a la glucosa	Alteración sensorial	↑ Latencia térmica	(187, 188)
				NCVs	↓ SNCV ↓ MNCV	
				Densidad de fibras nerviosas	ND	
45% de grasa (Dieta D12451i de Research Diets) por 34 semanas	Ratón C57/BL6 de 3 semanas	12 y 34	↑ peso (≈ 8 g) ↑ [insulina] Hb1Ac ≈ 6.6 Intolerancia a la glucosa Glucosa NR	Alteración sensorial	↑ Latencia térmica	(195)
				NCVs	↓ NCVs	
				Densidad de fibras nerviosas	↓ IENFD (≈ 15%, semana 34)	
58% grasa con almidón de maíz (D 12330, de Research	Ratón C57Bl6/J Macho	16, 20	↑ peso (≈ 8 g) S/C en [glucosa]	Alteración sensorial	↑ Latencia táctil y térmica	(141)

diets) por 16, 20, 22, 23 o 24 semanas	23 a 25g		↑ [insulina] ↑ [Colesterol total] ↑ [triglicéridos]		↓ Umbral mecánico	(196, 197)
				NCVs	↓ SNCV ↓ MNCV	
				Densidad de fibras nerviosas	ND	
		16, 22	↑ peso (≈ 12 g) S/C en [glucosa] ↑ [insulina] Tolerancia a la glucosa	Alteración sensorial	↓ Umbral mecánico ↑ Latencia térmica	
				NCVs	↓ SNCV ↓ MNCV	
				Densidad de fibras nerviosas	S/C ↓ IENFD (≈37.5 %)	
		16, 24	↑ peso (≈ 20 g) [Glucosa] ≈ 162 mg/dL	Alteración sensorial	↓ Umbral mecánico ↑ Latencia térmica	
				NCVs	↓ SNCV ↓ MNCV	
				Densidad de fibras nerviosas	↓ IENFD (≈50%)	
		16 y 23	↑ peso (≈ 40%) ↑ [glucosa] (casual ≈ 17%)	Alteración sensorial	↑ Latencia táctil y térmica ↓ Umbral mecánico	
60% de grasa (D12492 de Research diets) por 18 semanas	Ratón C57Bl6/J Macho de 6 semanas	18	↑ peso (≈ 15 g) ↑ % grasa corporal (≈ 15 g) Tolerancia a la glucosa	Alteración sensorial	ND	(193)
				NCVs	↓ NCV sural ↓ NCV ciático	
				Densidad de fibras nerviosas	↓ IENFD (≈27%)	
60% de grasa (D12492 de Research diets) por 18 semanas	Ratón C57Bl6/J Macho de 10-16 semanas	8	↑ peso (≈ 6 g) ↑ [Glucosa] (≈ 250 mg/dL en la semana 7-8)	Alteración sensorial	↑ Latencia térmica	(194)
				NCVs	S/C SNCV ↓ SNAP	
				Densidad de fibras nerviosas	↓ IENFD (≈50%)	

NCV: Velocidad de conducción nerviosa, **MNCV:** Velocidad de conducción de nervios motores, **SMCV:** Velocidad de conducción de nervios sensoriales, **IEFND:** Densidad de las fibras nerviosas intraepidérmicas, **SNAP:** Potencial de acción del nervio, **ND:** No determinado, **SC:** Sin cambios, **Ns:** No significativo, **Ev:** Evaluación; **[]** concentración, **S/C:** sin cambios.

Por otro lado, los modelos inducidos por combinación de dieta alta en grasa y /o carbohidratos con esquemas de administración de dosis bajas de STZ se están empezando a utilizar más frecuentemente, debido a que se busca reproducir mejor el fenotipo neuropático. Para ello este tipo de modelos se ha implementado en ratones C57BL/6J, pero con mayor frecuencia en ratas (Wistar y Sprague-Dawley). En estos modelos se han probado diferentes composiciones dietéticas y distintas dosis de STZ. Por ejemplo, en estudios realizados en ratones C57BL/6J de entre 4 y 12 semanas que fueron alimentados con una dieta con 60% grasas por 12, 20 o 36 semanas y dos dosis de STZ (75 mg/Kg y tres días después STZ 50 mg/Kg), presentaron incremento de la latencia térmica a las 16 a 24 semanas post-STZ, disminución de umbral de retiro a partir de la semana 12 acompañado de una disminución de NVCs e IENFD en la semana 12 y 36 post-STZ (199-201). Otro estudio similar utilizó la misma dieta en combinación con una dosis de 100 mg/Kg de STZ y una segunda dosis de STZ de 50 mg/Kg i.p (202). En este modelo se reportó incremento en la latencia térmica y disminución del umbral de retiro a las 4 y 8 semanas post-STZ, sin reporte en la NVCs y IENFD (203). De forma similar, estudios realizados en ratas Wistar y Sprague-Dawley de 10-11 semanas de edad alimentadas con dieta alta en grasas 45% (manteca de cerdo) y una dosis de STZ 30 mg/Kg, i.p se encontró un incremento en la latencia térmica, disminución de NCVs y IENFD de la semana 8 y 12 post-STZ (204-208). Un estudio evaluó en ratas con dieta alta en grasas 58% (8 semanas) + STZ 35 mg/Kg, se observaron alteraciones en las pruebas conductuales a las 4 semanas post-STZ (209). En modelos donde se utiliza dieta alta grasas 60% + STZ 45 mg/Kg una dosis, i.p (citrate 0,05 M pH 4,5), se observó una disminución del umbral de retiro de la semana 8 a 12 post-STZ, asimismo a las 10 semanas disminuyó el número de neuronas en la médula espinal (210). También se han evaluado modelos con dieta alta en grasas y azúcares + una sola dosis STZ de 30 a 35 mg/Kg, i.p, en las ratas de un peso de 120 – 210g se observó que la latencia térmica incremento, el umbral de retiro y el NVCs disminuyeron a partir de la semana 10 post-STZ, sin observar cambio en la IENFD (211, 212). En estos modelos se han estudiado con mayor frecuencia la ND a nivel preclínico debido que el fenotipo neuropático es robusto

para el estudio de nuevas terapéuticas. Sin embargo, cabe destacar que el porcentaje de inducción de la DM varía de estudio a estudio y por otro lado la fuente de grasas proviene normalmente de una única fuente, generalmente manteca de cerdo.

Tabla 15. Modelos de neuropatía diabética en ratones con DMT2 inducida por la combinación de dieta alta en grasas y dosis bajas de estreptozotocina.

Composición y duración del tratamiento dietético	Especie/ cepa/ edad	Semana de ev.	Parámetros bioquímicos	Fenotipo neuropático		Ref
				Parámetro	Resultado	
DAG 60% grasa (D12492, de Research diets) por 8 semanas + STZ 75 mg/Kg y tres días después STZ 50 mg/Kg; i.p.	Ratón C57B1/6J Macho 22–24g de peso de 12 semanas	12 Post-STZ	↑ Peso (≈ 5g) Glucosa 350 mg/dL Hb1Ac 8.2% Triglicéridos (67.4 mg/dL) Colesterol (1.77 mg/mL)	Alteración sensorial	↑ Latencia térmica, ↓ Umbral mecánico	(199)
				NCVs	↓ SNCV ↓ MNCV	
				Densidad de fibras	↓ IENFD (≈ 27.2)	
DAG 60% base manteca de cerdo (D12492, de Research diets) por 8 semanas + STZ 75 mg/Kg y tres días después STZ 50 mg/Kg; i.p.	Ratón C57B1/6J Macho de 4 semanas	16, 24, 36 Post-STZ	↑ Peso (≈ 17g) ↑ [Glucosa] >400 mg/dL ↑ Insulina (1.43 ng/mL) Tolerancia a la glucosa e insulina CT (199.4 mg/dL) C- LDL (61.3 mg/dL)	Alteración sensorial	↑ Latencia térmica	(200)
				NCVs	NS: ↓ SNCV ↓ MNCV	
				Densidad de fibras	↓ IENFD (≈ 31.0)	
DAG 60% grasa (D12492, de Research diets) por 16 semanas + STZ 75 mg/Kg y tres días después STZ 50 mg/Kg; i.p.	Ratón C57BL/6 Macho de 5 semanas	24 Post-STZ	↑ Peso (≈ 10g) ↑ Glucosa (≈ 250 mg/dL) Colesterol total (≈180 mg/dL)	Alteración sensorial	↑ Latencia térmica	(201)
				NCVs	↓ SNCV ↓ MNCV	
				Densidad de fibras	↓ IENFD (≈ 32.2)	
DAG 60% grasa (D12492, de Research diets) por 8 semanas + STZ 100 mg/Kg, si es necesario a los 3 días una dosis STZ 50 mg/Kg	Ratón C57BL/6 macho 25 - 26g de peso de 12 semanas	6 Post-STZ	Glucosa (>425 mg/dL) Triglicéridos (111 mg/dL) Colesterol (4.0 mg/mL)	Alteración sensorial	↑ Latencia térmica ↓ Umbral mecánico	(202)
				NCVs	↓ SNCV ↓ MNCV	
				Densidad de fibras	↓ IENFD (≈ 80.7)	
DAG por 8 semanas + STZ 100	Ratón C57BL/6	2,4,6,8 Post-STZ		Alteración sensorial	↓ Latencia térmica	(203)

mg/Kg/día; 2 dosis, i.p.	Macho 25 – 26g de peso de 8 semanas		Glucosa (>540 mg/dL)		↓ Umbral mecánico	
				NCVs	ND	
				Densidad de fibras	ND	
DAG (45% de grasa; Dieta D12451 de Research diets) por 8 semanas + STZ 30 mg/Kg	Rata Wistar macho de 12 semanas	16 y 28 post-STZ	Pérdida de peso [Glucosa] ≈ 400 mg/dL ↑ TG ↑CT	Evaluación conductual	↑ Latencia térmica	(204)
				NCVs	↓ SNCV ↓ MNCV	
				Densidad de fibras nerviosas	↓ IENFD (≈ 33 %)	
DAG (24% grasa; Dieta D12451; Research Diets,) por 8 semanas + STZ 30 mg/Kg	Rata Wistar macho de 12 semanas	2, 8 y 16 semanas post-STZ	Pérdida de peso [Glucosa] ≈ 400 mg/dL ↑ TG ↑CT	Evaluación conductual	↑ Latencia térmica Desde la semana 8	(206)
				NCV	↓ SNCV ↓ MNCV Desde la semana 2	
				Densidad de fibras nerviosas	↓ IENFD (≈ 33 %) Desde la semana 2	
		16 semanas post-STZ	S/C peso [Glucosa] ≈ 380 mg/dL HB1Ac 14.2 ↑ % de grasa corporal ↑ [Insulina] Tolerancia a la glucosa	Evaluación conductual	↑ Latencia térmica	(205, 207, 208)
				NCV	↓ SNCV ↓ MNCV	
				Densidad de fibras nerviosas	↓ IENFD (≈ 30 %)	
DAG (58% grasa; Dieta PF 4269, Mucedola srl) por 2 semanas + STZ 35 mg/Kg	Rata Sprague-Dawley Macho de 160 a 200g	15, 30, 45 y 60 días post-STZ	↑ % de masa corporal ↑ [Glucosa] (≈ 400 mg/dL desde el día 15	Evaluación conductual	/C Latencia térmica ↑ Latencia al frío ↓ Umbral mecánico desde el día 30	(209)
				NCVs	ND	
				Densidad de fibras nerviosas	ND	
DAG (%60 grasa; Dieta D12492; Research Diets,) por 3 semanas + STZ 30 mg/Kg	Rata Sprague-Dawley macho de 200 a 250g	-5, 22, 43, 72, 134 post-STZ	↑ [Glucosa] (≈ 400 mg/dL ↓ [Insulina desde el día 22 Tolerancia a la glucosa y a la insulina] en el día 120	Evaluación conductual	↓ Umbral mecánico desde el día 43	(210)
				NCVs	ND	
				Densidad de fibras nerviosas	ND	

DAGyC (67% dieta norma, 10% Manteca de cerdo, 20% sacarosa, 1% chocolate y 2% colesterol) por 8 semanas + STZ 35 mg/Kg	Rata Sprague-Dawley Macho de 120 a 210g	4 semanas post-STZ	S/C en el peso [Glucosa]	Evaluación conductual	↓ Latencia térmica ↓ Umbral mecánico	(211)
				NCVs	ND	
				Densidad de fibras nerviosas	ND	
DAGyC (dieta norma más 10% Manteca de cerdo, 20% por 6 semanas + STZ 30 mg/Kg)	Rata Wistar macho de 140 a 160 g 6 semanas	4 semanas post-STZ	↑ [Glucosa] (≈ 200 y 300 mg/dL)	Evaluación conductual	ND	(212)
				NCVs	↓ SNCV ↓ MNCV (10 semanas)	
				Densidad de fibras nerviosas	ND	

DAG: Dieta alta en grasas, **NCV:** Velocidad de conducción nerviosa, **MNCV:** Velocidad de conducción de nervios motores, **SMCV:** Velocidad de conducción de nervios sensorial, **IENFD:** Densidad de fibras nerviosa intraepidérmicas, **SNAP:** Potencial de acción del nervio, **ND:** No determinado, **SC:** Sin cambios, **Ns:** No significativo; **Ev:** Evaluación; **[]** concentración, **S/C:** sin cambios.

3. JUSTIFICACIÓN

El término Diabetes mellitus (DM) se refiere a un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia crónica, debido a defectos en la secreción o acción de la insulina, o ambas. La DM es un problema mundial de salud pública debido a su alta morbilidad y mortalidad, por lo que se considera la epidemia del siglo XXI. Tan solo en el 2019 se estimó que existían aproximadamente 463 millones de diabéticos en todo el mundo y se prevé que incrementarán a 578.4 millones en el 2030. En este escenario, México ocupa el sexto lugar entre los países con mayor prevalencia. Entre los diferentes tipos de DM, la DMT2 representa más del 90% de los casos debido al incremento de factores de riesgo como la obesidad, inactividad física y dietas hipercalóricas. En concordancia existen reportes que muestran que el 90% de los pacientes con DMT2 son obesos o tienen sobrepeso. La DM conduce al desarrollo de complicaciones macrovasculares o microvasculares como consecuencia de la hiperglicemia crónica. Entre estas, la ND es una de las más frecuentes ya que afecta aproximadamente al 50% de los diabéticos, y es el principal factor de riesgo que lleva a la ulceración y amputación del pie. La ND se produce como consecuencia de alteraciones en la función de los nervios periféricos que conduce al desarrollo de alteraciones sensoriales (parestesias, disestesias, dolor), alteraciones en la velocidad de conducción nerviosa y disminución de la densidad de fibras nerviosa intraepidérmicas. Sin embargo, el síntoma más debilitante y difícil de tratar es el dolor persistente que se manifiesta en forma de alodinia e hiperalgesia. Actualmente no se conocen con certeza los mecanismos fisiopatológicos que subyacen la ND y la información existente al respecto proviene de estudios realizados en modelos de DMT1, en donde tanto la hiperglicemia como las características de la neuropatía aparecen de forma súbita y temprana, a diferencia de la lenta evolución que se presenta en la DMT2. Además, datos recientes sugieren que los mecanismos que llevan al desarrollo de ND presente en pacientes con DMT2 son diferentes a la ND en pacientes con DMT1. Debido a lo anterior, existe un incremento en la investigación y desarrollo de modelos de neuropatía que reflejen mejor la condición del paciente con DMT2, en donde además de la hiperglicemia se observen las alteraciones metabólicas

características de esta patología. Así han surgido modelos genéticos e inducidos por dietas altas en grasa y carbohidratos, o bien la combinación de aproximaciones dietéticas con químicos como la estreptozotocina. Sin embargo, muchos de estos modelos no son accesibles, por la disponibilidad y los costos, para todos los investigadores y en algunos casos no reflejan lo que sucede en el humano. Con base en lo anterior, el objetivo del presente proyecto fue implementar un modelo de DMT2 inducido por la combinación de una dieta de cafetería cuyos componentes son de fácil acceso, y muy consumidos por los humanos, y la administración de dosis bajas de estreptozotocina, y caracterizar en estas condiciones, el desarrollo de alodinia mecánica como principal manifestación de ND. Además, se validó el modelo determinando si los fármacos utilizados actualmente en la terapéutica convencional del dolor neuropático revierten la alodinia mecánica.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Los ratones hembra C57 desarrollaran obesidad y DMT2?
2. ¿Cuándo desarrollaran alodinia mecánica los ratones con DMT2?
3. ¿La alodinia mecánica en los ratones con DMT2 se revertirá con fármacos utilizados en el tratamiento clínico actual?

5. HIPÓTESIS

1. La dieta de cafetería y la administración de dosis bajas de STZ contribuirán al desarrollo de obesidad y diabetes mellitus tipo 2 en los ratones hembra C57.
2. Los ratones diabéticos-obesos desarrollarán alodinia mecánica.
3. Los fármacos utilizados en el tratamiento de pacientes con dolor neuropático revertirán la alodinia mecánica en ratones con DMT2.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Caracterizar el curso temporal del desarrollo de alodinia mecánica, como principal manifestación de la neuropatía diabética periférica (NDP) en ratones con DMT2, así como validar el modelo determinando si los fármacos utilizados en el tratamiento del dolor neuropático revierten la alodinia mecánica.

6.2. Objetivos específicos

1. Implementar un modelo de DMT2 inducido por dieta de cafetería y dosis bajas de STZ.
2. Caracterizar el curso temporal del desarrollo de alodinia mecánica en ratones con DMT2.
3. Evaluar y validar, si el tratamiento agudo con diferentes fármacos utilizados actualmente en el tratamiento del dolor neuropático, revierten la alodinia mecánica en ratones con DMT2.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Animales

Se utilizaron ratones hembra de la cepa C57 con un peso corporal de 20 gramos al inicio del experimento. Los ratones se mantuvieron con libre acceso al agua y alimento, en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los experimentos se realizaron bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y manejo de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) (213). El protocolo se sometió a evaluación por el comité para el cuidado y uso de animales de la Facultad de Medicina de la UAEM (CCUAL-FM-UAEM). Al finalizar los ensayos los ratones fueron perfundidos por vía intracardiaca para posteriormente obtener tejidos.

7.2. Fármacos

Para la inducción de DMT2 se utilizó estreptozotocina (Sigma-Aldrich No. Lote WXBC874V) y fue disuelta en agua milliQ. Para la prueba de tolerancia a la glucosa oral se utilizó sacarosa comercial. Para validar el modelo se utilizaron los siguientes fármacos: Gabapentina (Sigma-Aldrich No. Lote LRAA5714), Carbamazepina (Sigma-Aldrich No. Lote MKCF7846), Amitriptilina (Sigma-Aldrich No. Lote LRAA9172), Duloxetina (Sigma-Aldrich No. Lote LRAB0283), Pregabalina (Neo IPHARMA No. Lote LRAA5714), Tramadol (AMSA Sol. inyectable No. Lote B18A950). Además, como control negativo se utilizó Diclofenaco (Arroli Organics No. Lote 05/1502/0086B). Todos los fármacos fueron disueltos en solución salina al 0.9% y fueron preparados el día del experimento.

7.3 Inducción de DMT2

Para el establecimiento de un modelo de DMT2 se utilizaron dos aproximaciones experimentales. La primera fue alimentar a los ratones por un periodo de 32 semanas con una dieta de cafetería con la finalidad de inducir ganancia de peso y finalmente obesidad. La segunda fue inducir una ligera disfunción de las células β -pancreáticas a través de la inyección de dosis bajas de estreptozotocina 8 semanas después de iniciada la dieta (figura 5). Lo anterior debido a que tanto la obesidad

como la disfunción de las células β -pancreáticas desempeñan un papel fundamental en la fisiopatología de la DMT2.

7.3.1 Inducción de obesidad

Para la inducción de ganancia de obesidad inicialmente se formaron dos grupos experimentales de 20 ratones cada uno. El primer grupo fue alimentado, durante todo el periodo experimental (32 semanas), con dieta estándar de roedor con un peso equivalente a 4.12 Kcal/Kg (Rodent Diet® 500I) y agua de beber (Tabla 9).

Tabla 16. Contenido de la dieta estándar de roedor Rodent Diet® 500I equivalente a 4.12 Kcal/Kg.

Contenido	Calorías (%)
Proteína	26.1
Grasas (extracto de éter)	10.7
Carbohidratos	63

El segundo grupo fue alimentado durante todo el periodo experimental (32 semanas) con una dieta de cafetería adaptada partir del estudio de Leffa., *et al*/2015 (214). La dieta de cafetería empleada está compuesta con diferentes alimentos ricos en grasa y carbohidratos de fácil acceso para la población mexicana, y proporciona un aporte calórico de 8.24 Kcal/Kg. Esta cantidad de Kcal contiene 36.5% grasas; 42.2% carbohidratos y 22.3% proteínas. Cabe mencionar que con los diferentes componentes de la dieta se diseñó un menú para cada día de la semana (tabla 10). Cada día por la mañana los diferentes alimentos de la dieta correspondientes al menú del día fueron pesados antes de alimentar a los ratones con la finalidad de poner la cantidad que aporte el contenido calórico establecido.

Tabla 17. Alimentos que componen el menú semanal de la dieta de cafetería (equivalente 8.24 Kcal/Kg).

Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes/ Sábado/ Domingo
Jamón de pavo FUD®	Salchicha de pavo FUD®	Jamón de pavo FUD®	Salchicha de pavo FUD®	Salchicha de pavo FUD®
Chocolate Carlos V®	Papas fritas Sabritas®	Crema de avellana Nutella®	Chocolate Carlos V®	Papas fritas Sabritas®
Ruffles de queso Sabritas®	Ruffles de queso Sabritas®	Ruffles de queso Sabritas®		Galletas Oreo®
Pellets LabDiet®	Pellets LabDiet®	Pellets LabDiet®	Pellets LabDiet®	Pellets LabDiet®
Malvavisco Great Value®	Galletas Oreo®			Malvavisco Great Value®
Refresco de naranja/Agua purificada Mirinda® /Ciel®	Refresco de naranja/Agua purificada Mirinda® /Ciel®	Refresco de naranja/Agua purificada Mirinda® /Ciel®	Refresco de cola/Agua purificada Coca-cola®/ Ciel®	Refresco de cola/Agua purificada Coca-cola®/ Ciel®

7.3.2 Inducción de disfunción de las células β -pancreáticas con dosis bajas de STZ

Para la inducción de disfunción de las células β -pancreáticas con dosis bajas de STZ se empleó un esquema de administración de STZ que consiste en 4 inyecciones intraperitoneales consecutivas (1 por día) a una dosis de 30 mg/Kg. Las inyecciones de STZ se realizaron 8 semanas después de iniciado el tratamiento dietético. Para esto cada grupo experimental de los dos tratamientos dietéticos fueron subdivididos en dos grupos de los cuáles uno recibió vehículo (agua milliQ) o bien STZ. Con base en lo anterior se formaron los siguientes cuatro grupos: Grupo 1) Dieta estándar (DS) + vehículo (VEH); Grupo 2) Dieta estándar + estreptozotocina (STZ); Grupo 3) Dieta de cafetería (DC) + vehículo, y Grupo 4) Dieta de cafetería + STZ. Para realizar cada una de las 4 inyecciones de STZ o vehículo, los ratones se dejaron en ayuno diurno (6 horas) con libre acceso al agua (Figura 6). Después de la administración de STZ los animales continuaron con su respectivo tratamiento dietético por 24 semanas más.

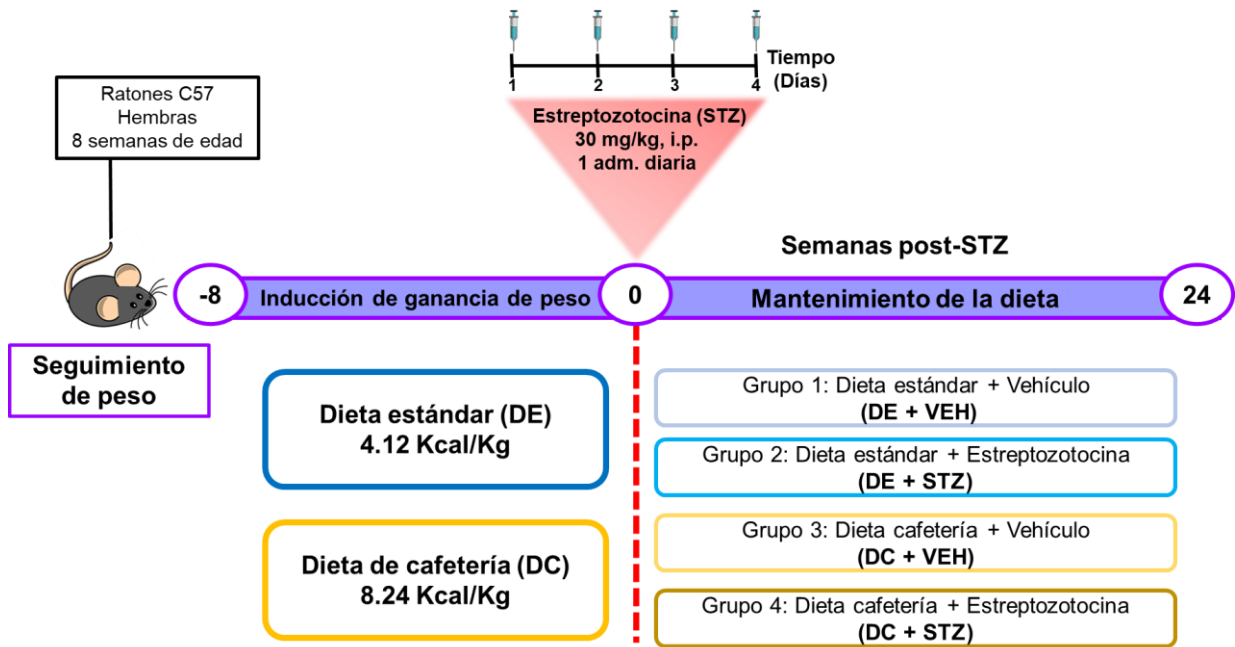


Figura 6. Inducción de obesidad y DMT2 en ratones hembra de la cepa C57.

Por otro lado, es importante mencionar que durante las 32 semanas del experimento se realizó el seguimiento de peso corporal. Además, para confirmar el desarrollo de DMT2 se realizó el seguimiento de los niveles de glucosa en sangre, y pruebas de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) y a la insulina (CTI), y la cuantificación de la concentración sérica de insulina (figura 7).

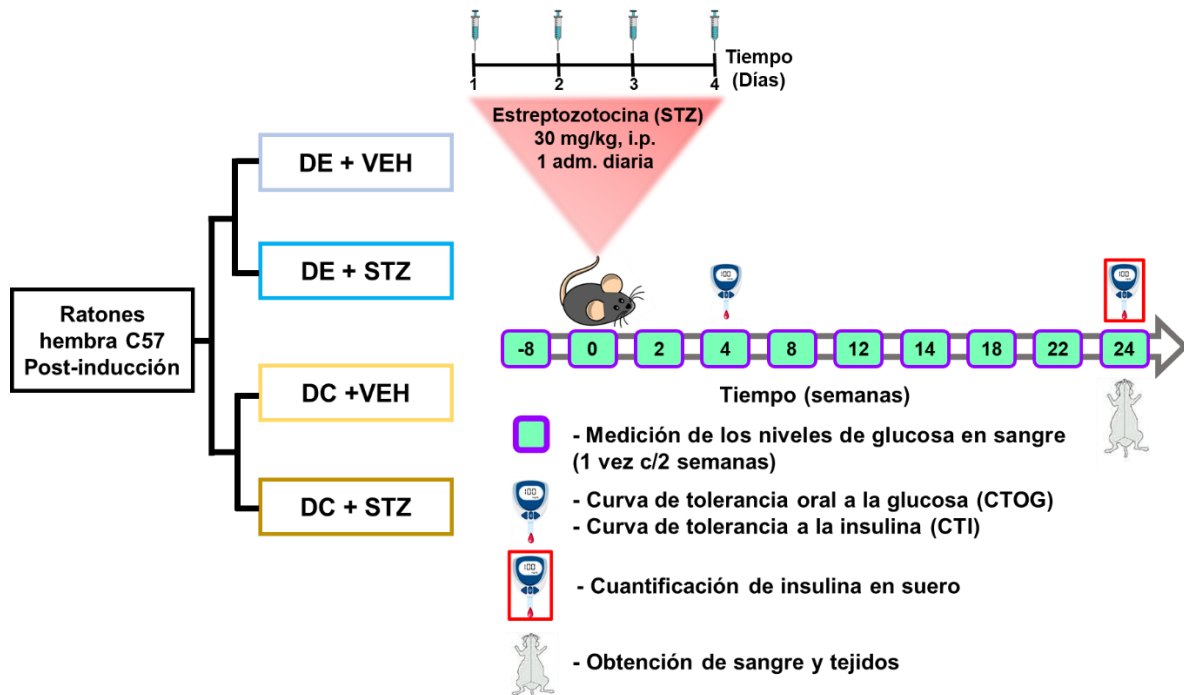


Figura 7. Comprobación de la Inducción de DMT2. Para determinar el desarrollo de DMT2 se realizó el seguimiento de los niveles de glucosa en sangre, así como las curvas de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) y a la insulina (CTI), y la cuantificación de insulina sérica.

7.3.3. Seguimiento de peso y de los niveles de glucosa en sangre

Con la finalidad de determinar si los ratones de los diferentes grupos tuvieron ganancia de peso, se realizó el monitoreo de peso corporal dos veces por semana durante todo el periodo experimental. Para esto el día correspondiente se pesó a cada animal, con una balanza granataria, antes de colocar los componentes de la dieta correspondientes al menú del día.

7.3.4. Seguimiento de los niveles de glucosa en sangre

Para confirmar el desarrollo de hiperglicemia, característica principal de la DM, se realizó el seguimiento de los niveles de glucosa en sangre cada dos semanas durante las 32 semanas del experimento. La medición de glucosa en sangre se realizó en una gota de sangre obtenida de la cola del ratón utilizando un glucómetro comercial (ACCU-CHEK® Performa, Roche). Para obtener la muestra de sangre se realizó un corte de aproximadamente 1 mm de la punta de la cola del ratón,

desechando la primera gota de sangre, la segunda gota de sangre fue la que se colocó en el glucómetro.

7.3.5 Curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG)

Para determinar si los ratones desarrollaban tolerancia a la glucosa se realizó la CTOG 4 y 24 semanas después de la última administración de STZ, específicamente en el día 4 de la semana correspondiente. Previo al experimento los ratones se dejaron en ayuno por 12 horas con libre acceso al agua. Al cumplirse el periodo de ayuno, inicialmente se realizó la medición de glucosa basal e inmediatamente después se realizó la administración, por vía oral, de una carga de sacarosa (2 g/Kg). Posteriormente se midió la concentración de glucosa en sangre a los 15, 30, 60, y 120 minutos después de la administración de la sacarosa (215).

7.3.6 Curva de tolerancia a la insulina (CTI)

Para determinar si los ratones presentaban intolerancia a la insulina, se realizó una CTI 5 y 24 semanas después de la cuarta administración de STZ en el día 1 de la semana correspondiente. Previo al experimento los ratones se dejaron en ayuno diurno por 2 horas con libre acceso al agua. Al cumplirse el ayuno, se realizó la medición de glucosa capilar basal. Posteriormente, se realizó la administración, por vía intraperitoneal, de insulina humana NPH (Pisa No. Lote: S19V698), a una dosis de 0.75 UI/Kg. Después, se midió nuevamente la concentración de glucosa a los 15, 30, 60, 120 y 180 minutos después de la inyección de insulina (215).

7.3.7 Cuantificación de insulina en suero

La cuantificación de insulina sérica se realizó por el método de ELISA. La obtención de las muestras de sangre se realizó, en la semana 24 post-STZ, por punción intracardiaca en ratones anestesiados con ketamina/xilacina 100/10 mg/Kg (i.p.). Para esto los ratones se colocaron en posición decúbito supino y posteriormente se realizó una incisión transtorácica para exponer el corazón y ubicar el ventrículo derecho, en donde se insertó una jeringa con una aguja (23G x1" de 0.6 x 25 mm) para obtener la muestra sanguínea. Las muestras de sangre se dejaron coagular

durante 30 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Al término de la centrifugación se separó el suero en alícuotas debidamente rotuladas, que fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso. Las muestras hemolizadas fueron descartadas del estudio. La cuantificación de insulina por ELISA se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante del Kit Elisa (Merck Millipore No Lote: 3388216).

7.3.8 Cálculo del Índice de HOMA 2

Para determinar si la dieta de cafetería en conjunto con la administración de dosis bajas de estreptozotocina produjo la resistencia a la insulina (IR) se utilizó el índice HOMA-2. El índice HOMA 2 es una modificación del índice HOMA descrito por Jonathan Levy en 1998, en donde para su cálculo se toma en cuenta las variaciones en la resistencia a la glucosa hepática y periférica, los aumentos en la curva de secreción de insulina para concentraciones de glucosa plasmática por encima de 10 mmol/L (180 mg/dL) y la contribución de la proinsulina circulante. En el presente proyecto el índice de HOMA-2 se calculó utilizando un programa computacional desarrollado por la Universidad de OXFORD y que se encuentra disponible <https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/> (216). (Figura 6).

7.4. Cuantificación de alodinia por el método up and down

El desarrollo de alodinia mecánica se determinó midiendo el 50% de umbral de retiro cada 2 semanas a partir de la última administración de estreptozotocina y hasta la semana 16 post-inyección de STZ. A partir de este tiempo el seguimiento se realizó de forma semanal hasta la semana 24 post-STZ (Figura 8).

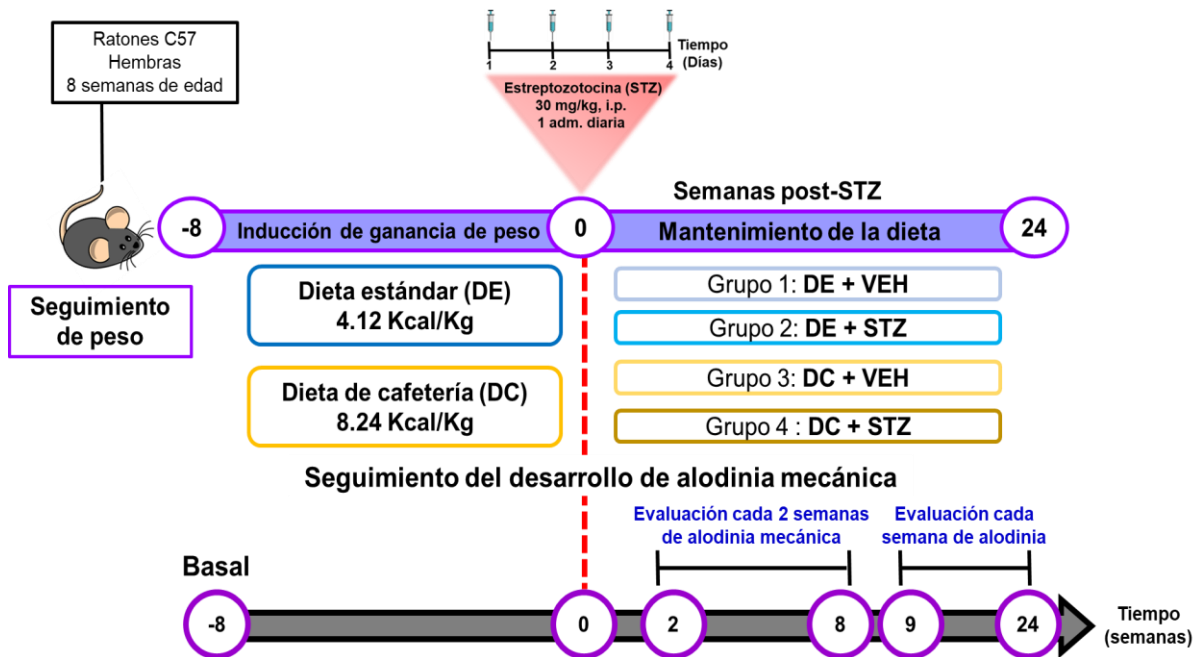


Figura 8. Evaluación del seguimiento del desarrollo de alodinia mecánica en ratones diabéticos-obesos.

La medición del 50% de umbral de retiro se realizó mediante la aplicación de filamentos de von Frey. Estos filamentos están calibrados para aplicar estímulos mecánicos con un rango de fuerza entre 0.007 y 3.24 gramos. Para calcular el 50% de umbral de retiro se utilizó el método de Up and Down, el cual consiste en aplicar por 3 segundos diferentes filamentos de von Frey en la superficie plantar de cada una de las patas posteriores del ratón. El filamento que se aplica se determina con base en la respuesta positiva o negativa del ratón, iniciando con la aplicación del filamento de 0.6 gramos. Se considera una respuesta positiva cuando la aplicación del filamento en la superficie plantar produce una respuesta de retirada de la pata, sin embargo, si no se observa ninguna respuesta se considera una respuesta negativa. Si la respuesta es positiva el siguiente estímulo se aplica con el siguiente filamento más pequeño y si es negativa se aplica un estímulo con el siguiente filamento más grande. Se continúa así hasta identificar el primer cambio de respuesta positiva y negativa o viceversa. Una vez identificado este cambio se realizan 4 mediciones consecutivas adicionales utilizando el mismo sistema de

arriba y abajo. Con la secuencia de respuesta positivas y negativas se calcula el 50 % de umbral de retiro utilizando la siguiente fórmula:

$$50 \% \text{ umbral de retiro} = \frac{10^{[x_f + \kappa \delta]}}{10,000}$$

Donde:

X_f : Valor del último filamento utilizado (en valor logarítmico)

κ : Valor asignado al patrón positivo/negativo de acuerdo a la tabla de Dixon (217).

δ : La diferencia entre la fuerza de los estímulos (en valor logarítmico)

Es importante mencionar que valores menores a 0.4 g del 50% de umbral de retiro indican la presencia de alodinia. Con los valores de 50 % de umbral de retiro obtenidos en los distintos tiempos se construyó el curso temporal del desarrollo de alodinia mecánica.

Por otro lado, es importante mencionar que se consideró que existe un efecto antialodínico (analgésico) cuando los valores de 50 % de umbral de retiro incrementan significativamente por arriba de 0.4 g en el grupo que recibió un tratamiento con respecto al grupo tratado con el vehículo.

7.5 Evaluación del efecto antialodínico de fármacos utilizados en el tratamiento del dolor neuropático

Finalmente, y con el objetivo de validar el modelo, se determinó si los fármacos utilizados comúnmente en el tratamiento convencional del dolor neuropático eran capaces de disminuir la alodinia mecánica inducida por la DMT2. Los fármacos evaluados fueron: diclofenaco 50 mg/Kg (control negativo) (218), de la primera línea de tratamiento se evaluaron los antidepresivos amitriptilina (30 mg/Kg) (219) y duloxetina (30 mg/Kg) (219), y los antiepilépticos gabapentina (100 mg/Kg) (220), y carbamazepina (100 mg/Kg) (221); mientras que de la segunda línea de tratamiento se evaluó el opioide tramadol (30 mg/Kg) (222), en una relación de volumen de administración de 0.1 mL/10g por vía i.p. Cabe mencionar que las dosis evaluadas fueron seleccionadas de estudios previos en donde estos fármacos mostraron tener

efecto antialodínico en roedor. Para cumplir con este objetivo se utilizaron ratones con DMT2 que presentaron alodinia mecánica establecida, es decir ratones con 50% de umbral de retiro menores a 0.4 g (22 a 24 semanas post- STZ). Este experimento se realizó en un total de 16 animales que fueron asignados al azar a uno de dos grupos experimentales. Para la evaluación de los diferentes fármacos se utilizó un diseño cruzado, en donde el grupo 1 recibió el vehículo y el grupo 2 recibió el tratamiento. Una vez finalizada la evaluación se permitió un periodo de lavado de 7 vidas media del fármaco utilizado (esto permite una eliminación del fármaco del 99%). Transcurrido este tiempo el grupo 1 recibió el tratamiento y el grupo 2 el vehículo, se continuó de esta forma hasta finalizar la evaluación de los fármacos ya mencionados. El día del experimento inicialmente se midió la alodinia basal, posteriormente se realizó la administración intraperitoneal del vehículo o del tratamiento y posteriormente se realizó la evaluación del 50% de umbral de retiro en los tiempos que se indican en la figura 9.

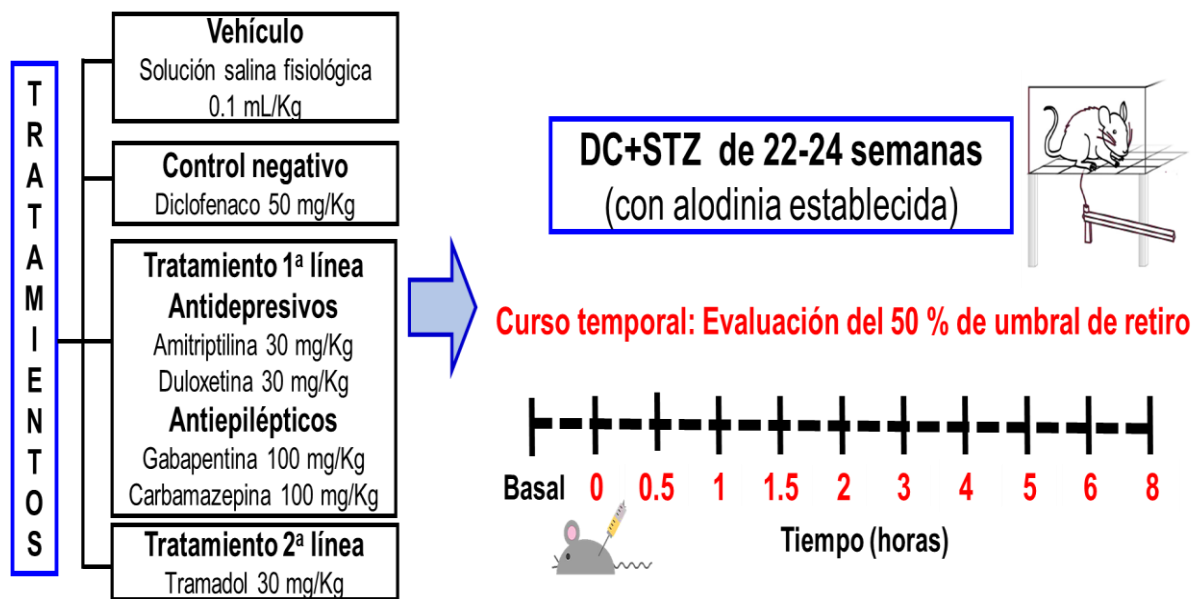


Figura 9. Evaluación del efecto antialodínico de los fármacos utilizados en el tratamiento del dolor neuropático en ratones con alodinia inducida por DMT2.

7.6 Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como la media de 10 animales \pm el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism 8 (Software, Inc.). Para determinar si existían diferencias estadísticas (Dieta y STZ) se utilizó el análisis de varianza de ANOVA de dos vías. En los casos en donde el tiempo es un factor adicional que contribuye al resultado, se utilizó ANOVA de tres vías de medidas repetidas seguido de la post-prueba de Tukey o Bonferroni. Para los resultados del tejido se utilizó ANOVA de dos vías seguida de la post-prueba de Bonferroni. El área bajo la curva (ABC) en la CTOG y CTI se realizó mediante ANOVA de dos vías seguida de post-prueba Bonferroni. En el caso de la evaluación del efecto antialodínico mediante fármacos en el dolor neuropático inducido por la DC y STZ se utilizó ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguida de la comparación de Bonferroni. Se consideró que existe diferencia estadísticamente significativa cuando el valor P fue menor a 0.05.

8 RESULTADOS

8.1. Implementación del modelo de DMT2

Con la finalidad de implementar y validar un modelo de DMT2 en el presente proyecto se utilizaron 2 aproximaciones experimentales la primera fue alimentar a los ratones con una dieta de cafetería (dieta hipercalórica) por 32 semanas para favorecer la ganancia de peso y la obesidad; y la segunda fue inducir disfunción de las células β -pancreáticas a través de la inyección de 5 dosis bajas de estreptozotocina. Para comprobar el establecimiento de DMT2 se realizó el seguimiento de peso corporal, niveles de glucosa, CTOG, CTI, cuantificación de insulina en suero, cálculo del índice HOMA 2 IR y el pesado de diferentes tejidos (adiposo intraperitoneal, hígado y páncreas) al finalizar el experimento.

8.1.1. Seguimiento de peso corporal

El monitoreo del peso corporal se realizó una vez a la semana con la finalidad de determinar la ganancia de peso en los ratones de las cuatro condiciones experimentales. En la figura 10 se muestra el curso temporal del peso corporal durante las 32 semanas del experimento. Se observa que al inicio del experimento el peso corporal de los ratones de las 4 condiciones experimentales fue similar ($20.8 \pm 0.34\text{g}$). También se observa que en los ratones de los grupos de DE+VEH y DE+STZ el peso corporal incrementó de forma similar durante todo el experimento, alcanzado un peso final de $25.9 \pm 1.0\text{g}$ y $26.1 \pm 0.8\text{g}$. Por otra parte, los ratones de los grupos alimentados con dieta de cafetería (DC+VEH y DC+STZ) ganaron peso corporal de forma similar durante las primeras 8 semanas, sin embargo, en este periodo de tiempo ganaron aproximadamente 10g más en comparación con los grupos alimentados con la dieta estándar (DE+VEH y DE+STZ). En este punto se realizó la administración de STZ o vehículo, y a partir de aquí se observó que los ratones del grupo DC+VEH continuaron ganando peso gradualmente y de forma estadísticamente significativa en comparación con los ratones del resto de los grupos, hasta alcanzar un peso final de $51.2 \pm 2.8\text{g}$. Por otro lado, el grupo de DC+STZ continuó ganando peso de forma significativa en comparación con los

grupos alimentados con dieta estándar, pero en menor medida que el grupo de DC+VEH. El peso final del grupo DC+STZ 1 fue de $43.6 \pm 1.0\text{g}$ y DC+STZ 2 $44.9 \pm 0.9\text{g}$.

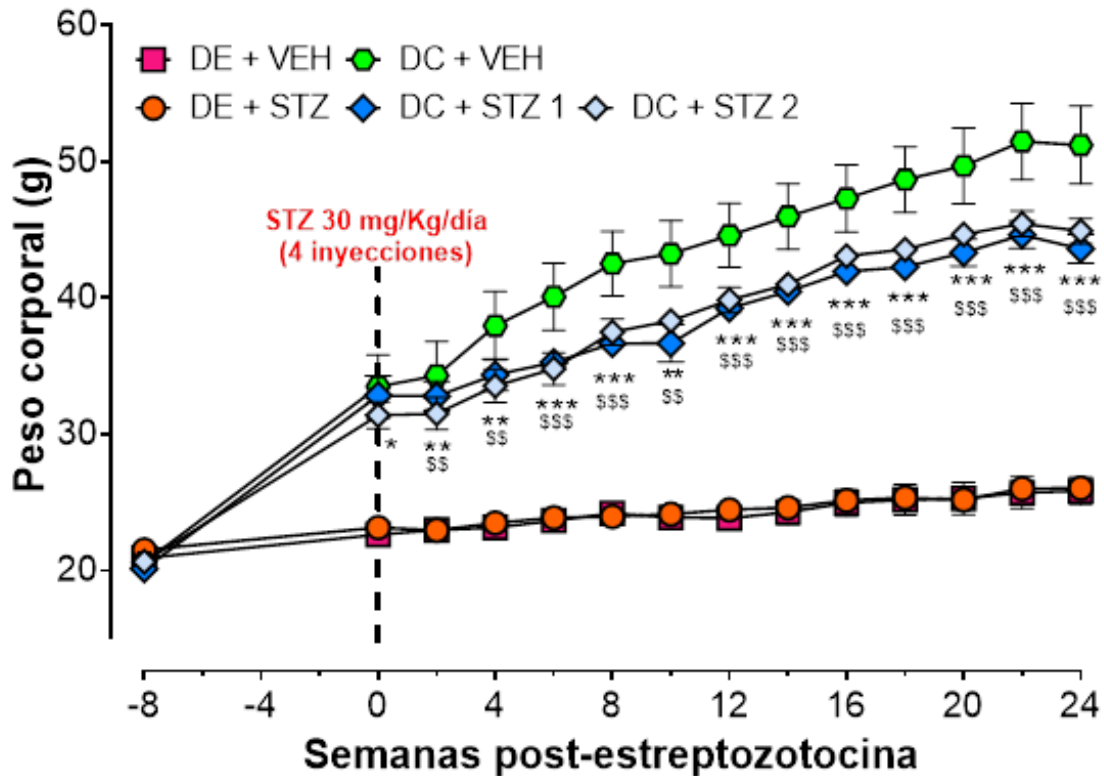


Figura 10. Curso temporal del peso corporal de ratones hembra C57 de las cuatro condiciones experimentales. Cada punto representa el promedio de 10 animales \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ con respecto al grupo DE+VEH, \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$, \$\$\$ $P < 0.001$ con respecto al grupo DE+STZ, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ con respecto al grupo DC+VEH por ANOVA de tres vías seguida de la prueba de Bonferroni.

Con la finalidad de evidenciar visualmente la ganancia de peso inducida por la dieta de cafetería, en la semana 24 post-STZ se tomaron fotografías representativas de las 4 condiciones experimentales (figura 11). Además, se calculó el % de ganancia de peso tomando como valor de referencia el peso de los ratones del grupo DE+VEH (0%). Los resultados mostraron que en comparación con los ratones de DE+VEH, los ratones del grupo DE+STZ no ganaron peso de forma significativa ($0.54 \pm 3.57\%$), mientras que los ratones del grupo DC+VEH y DC+STZ ganaron un $90.7 \pm 9.3\%$ y $47.7 \pm 9.1\%$, respectivamente. Estos datos en conjunto muestran que

la dieta de cafetería indujo una ganancia de peso significativa, sin embargo, este efecto se vio atenuado en los animales tratados con STZ.

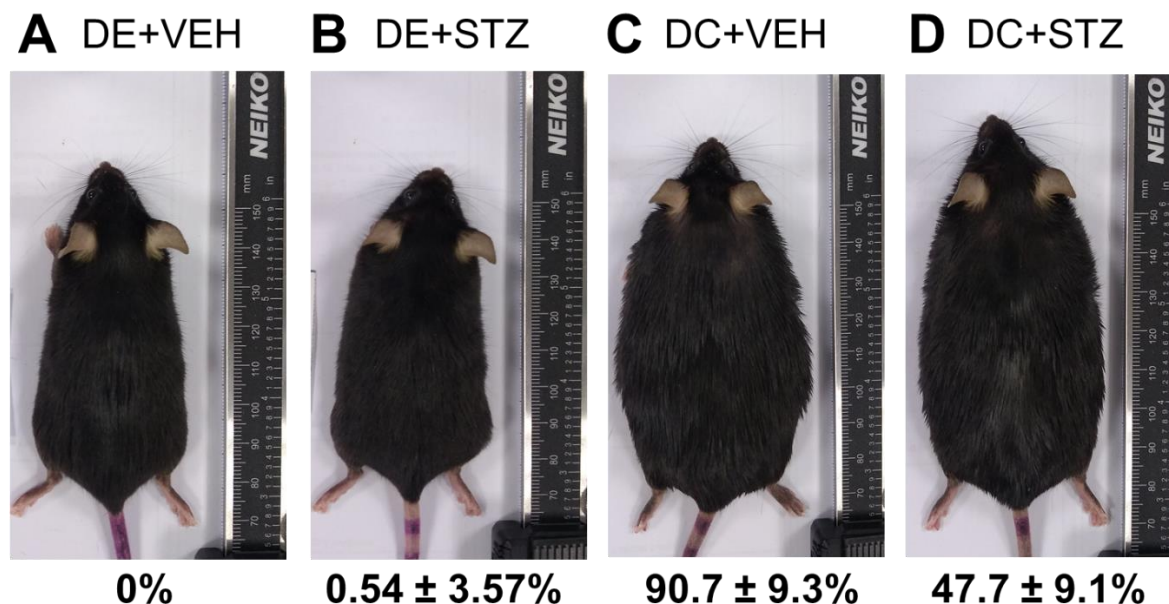
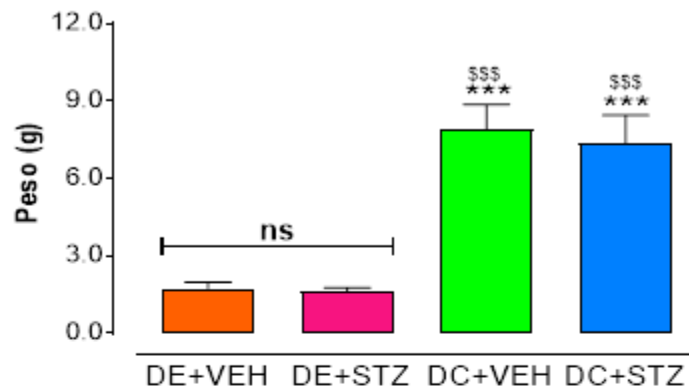


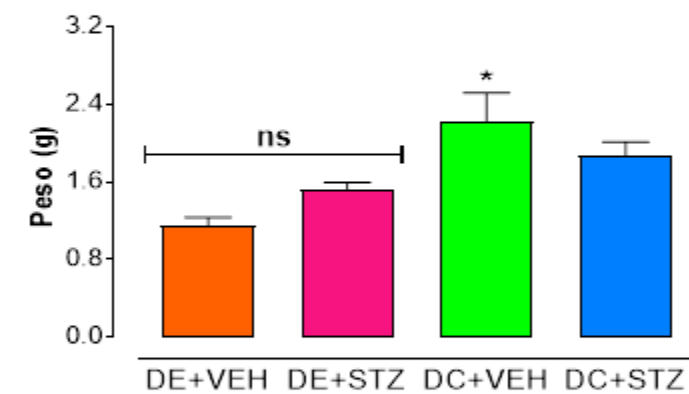
Figura 11. Fotografías representativas de los ratones alimentados con dieta estándar y dieta de cafetería en la semana 24 post-STZ.

Adicionalmente al finalizar el experimento (semana 24 post-estreptozotocina), se realizó la obtención y pesaje de diversos tejidos de los ratones de las 4 condiciones experimentales (figura 12). En la figura 12A, se muestra el peso del tejido adiposo intraperitoneal, se observó que en los ratones de los grupos de DE+VEH y DE+STZ el peso del tejido adiposo intraperitoneal fue similar. En contraste, el peso del tejido adiposo de los ratones de los grupos DC+VEH y DC+STZ fue significativamente mayor en comparación con los grupos DE+VEH y DE+STZ. De forma similar, el peso del hígado de los grupos DC+VEH y DC+STZ fue significativamente mayor en comparación con los grupos DE+VEH y DE+STZ (Figura 12B). En el caso del páncreas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso de este tejido en las diferentes condiciones experimentales (figura 12C). Con base en estos resultados, podemos concluir que la dieta de cafetería indujo un incremento en el peso del tejido adiposo intraperitoneal y el hígado.

A Tejido adiposo intraperitoneal



B Hígado



C Páncreas

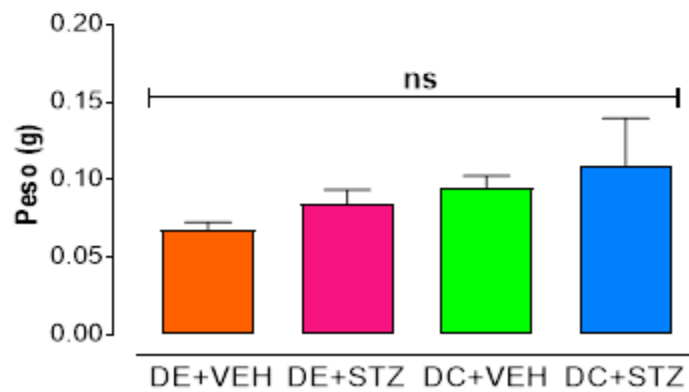


Figura 12. Peso de tejidos, diseccionados en la semana 24 post-estreptozotocina, de ratones de las 4 condiciones experimentales. Panel A, Tejido adiposo intraperitoneal. Panel B, Hígado. Panel C, Páncreas. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 con respecto al grupo DE+VEH, [§]P < 0.05, ^{\$\$\$}P < 0.001 con respecto al grupo DE+STZ por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni. ns: no significativo.

8.1.2. Seguimiento de glucosa capilar en ratones C57

Para verificar el desarrollo de hiperglicemia crónica, característica principal de la DM, se realizó el seguimiento de los niveles de glucosa en sangre al inicio del experimento y cada dos semanas a partir de la administración de STZ (Figura 13). Se observó que los grupos de DE+VEH y DE+STZ presentaron niveles de glucosa entre 100 y 120 mg/dL durante todo el experimento. En el grupo DC+VEH los niveles de glucosa incrementaron hasta llegar valores de aproximadamente 150 mg/dL y se mantuvieron así durante todo el periodo experimental. En contraste, los niveles de glucosa del grupo DC+STZ incrementaron gradualmente hasta alcanzar valores ≥ 200 mg/dL desde la semana 12 post-STZ y hasta el final del experimento.

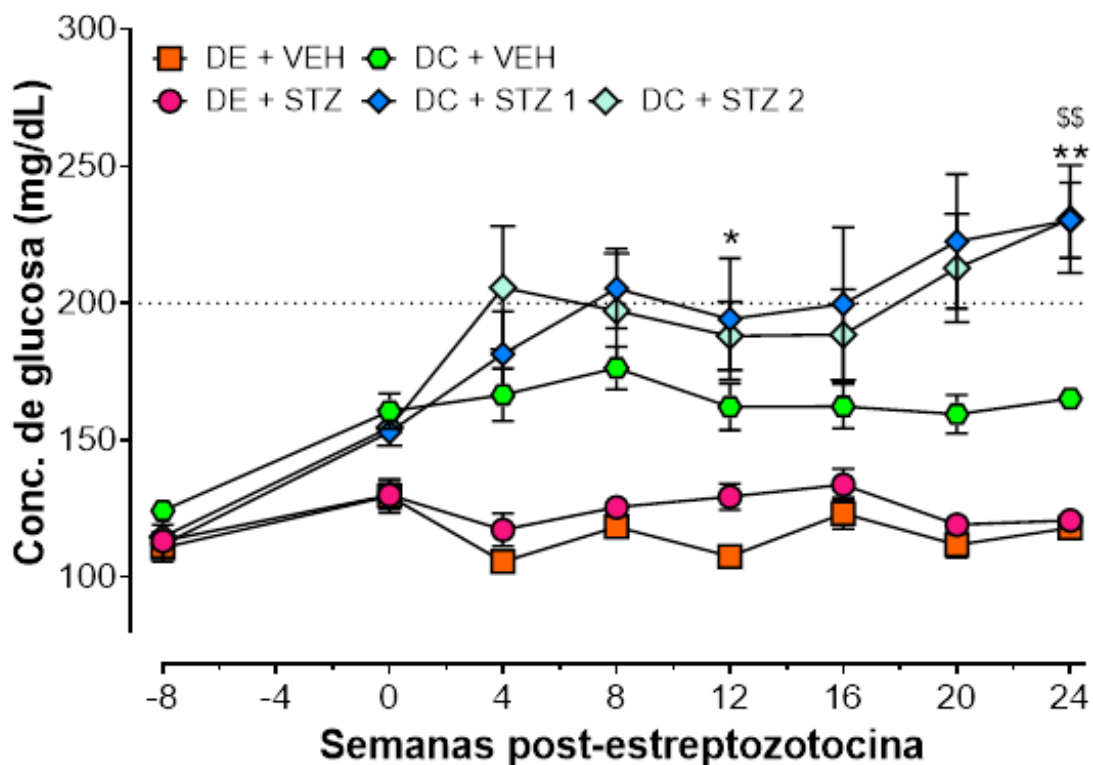
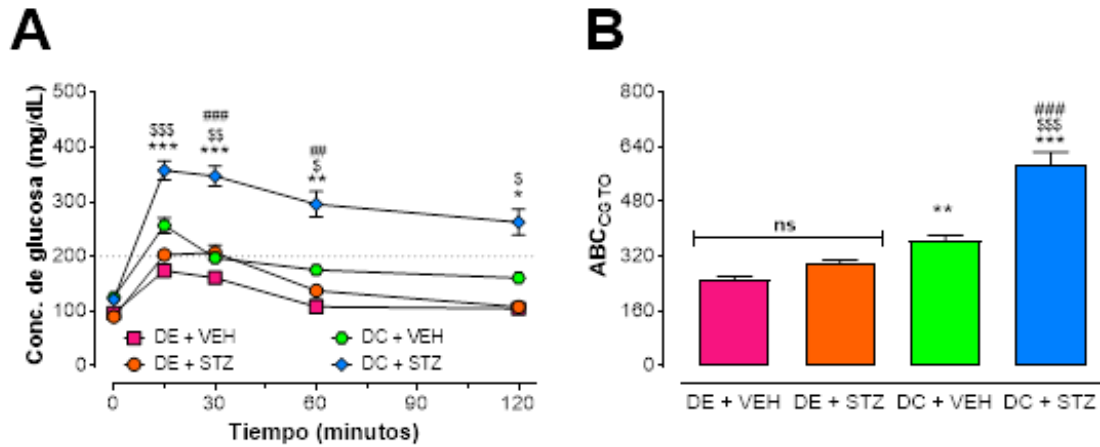


Figura 13. Curso temporal de los niveles de glucosa ratones hembra C57 de las cuatro condiciones experimentales. Cada punto representa el promedio de 10 animales \pm SEM. *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001 con respecto a la DE+VEH, \$P <0.05, \$\$P <0.01, \$\$\$P <0.001 con respecto a la DE+STZ, por ANOVA de tres vías seguida de la prueba de Bonferroni.

8.1.3. Curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG)

Para determinar si los ratones de DC+STZ presentaban tolerancia a la glucosa, lo cual es uno de los criterios utilizados para diagnosticar DM en humanos, se realizó la CTOG 4 y 24 semanas post-STZ (Figura 14). La CTOG realizada 4 semanas post-STZ mostró que los ratones de las condiciones DE+VEH y DE+STZ presentaron niveles de glucosa basal cercanos a 100 mg/dL, 15 min después de la administración de la carga de sacarosa se observó un pico en los niveles de glucosa de 174 ± 7.5 mg/dL y 203 ± 8.3 mg/dL, respectivamente. A partir de este punto los niveles de glucosa disminuyeron gradualmente hasta alcanzar valores basales 2 post-administración de sacarosa. Por su parte los ratones del grupo DC+VEH y DC+STZ presentaron niveles de glucosa basales de 125.5 ± 10.9 mg/dL y 121.6 ± 7.1 mg/dL, respectivamente. Posteriormente 15 min después de la administración de la carga de sacarosa en el grupo de DC +VEH se observó un pico en la concentración de glucosa de 256.9 ± 14.3 mg/dL, y posteriormente los niveles de glucosa disminuyeron hasta valores menores a 200 mg/dL, 2 horas post-sacarosa. Estos resultados indican que los grupos de DE+VEH, DE+STZ y DC+VEH no presentaron tolerancia a la glucosa. En contraste, 15 min post-sacarosa el grupo de DC+STZ mostró un pico en la concentración de glucosa de 357.6 ± 17.6 mg/dL. Además, los valores de glucosa se mantuvieron por arriba de 200 mg/dL dos horas después de iniciado el experimento (Figura 14A). El análisis de Área Bajo la Curva (ABC) en la semana 4 post-STZ mostró que el grupo de DC+STZ presentó un ABC significativamente mayor que los otros tres grupos experimentales, confirmado los resultados anteriores (Figura 14B). En la semana 24 post-STZ se observaron resultados similares. Sin embargo, el incremento en los niveles de glucosa del grupo DC+ STZ fue más marcado (Figura 14 C, D). Estos resultados en conjunto indican que la tolerancia a la glucosa se produce desde etapas tempranas y se mantiene por al menos 24 semanas.

4 SEMANAS POST-STZ



24 SEMANAS POST-STZ

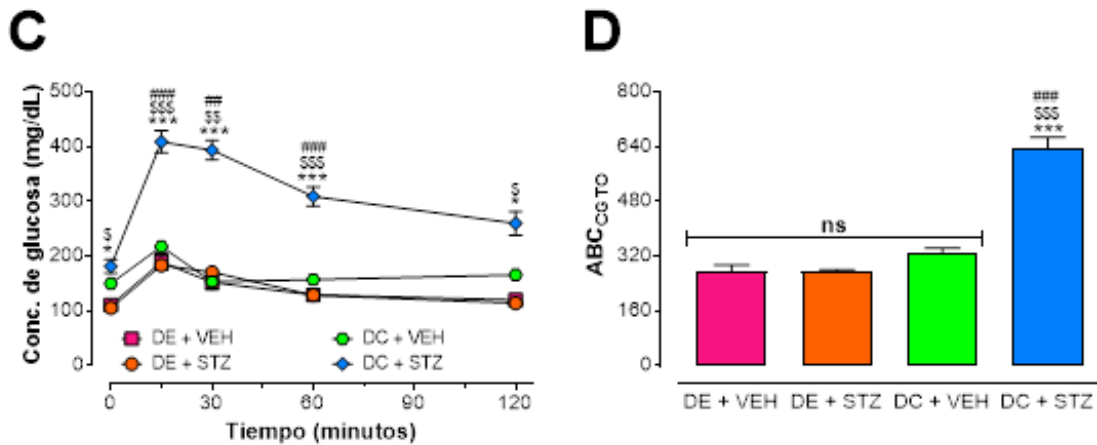


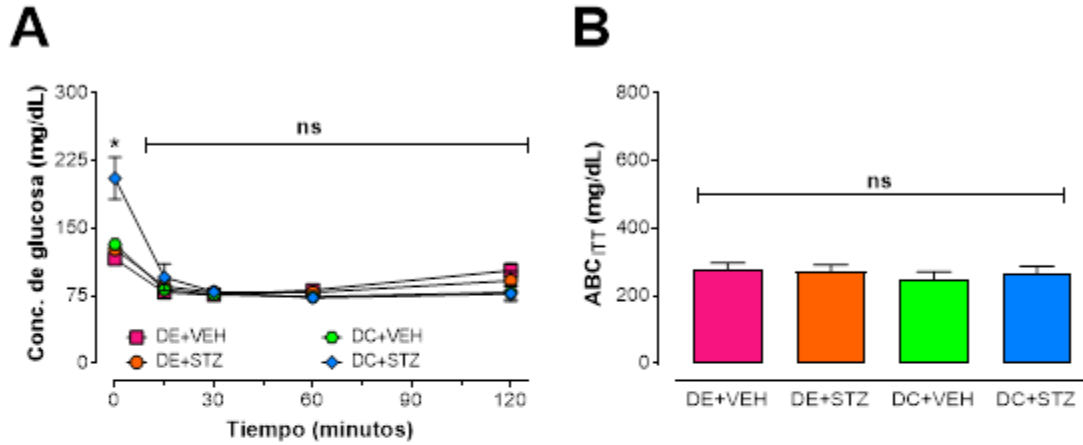
Figura 14. Curva de tolerancia oral a la glucosa 4 y 24 semanas post-STZ. Panel A y C, CTOG semana 4 y 24 post-inyección de estreptozotocina. Panel B y D, Área Bajo la Curva (ABC) calculada a partir de la CTOG. Cada punto representa el promedio de 10 animales \pm SEM. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 con respecto a la DE+VEH, \$P < 0.05, \$\$P < 0.01, \$\$\$P < 0.001 con respecto a la DE+STZ, #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 con respecto de la DC+VEH por ANOVA de tres vías seguida de la prueba de Bonferroni (CTOG) y ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni (gráfica de barras). ns: no significativo.

8.1.4. Curva de tolerancia a la insulina (CTI)

Con el objetivo de determinar si los ratones presentaban resistencia a la insulina una característica de la DMT2 y la obesidad en los humanos, se realizó la prueba de tolerancia a la insulina en las semanas 4 y 24 post-STZ en las cuatro condiciones experimentales. En la semana 4 post-estreptozotocina se observó que después de

dos horas de ayuno los ratones de los grupos de DE+VEH, DE+STZ, DC+VEH y DC+STZ presentaron concentraciones de glucosa de 115 ± 6.6 mg/dL, 126.8 ± 7.1 mg/dL, 132.3 ± 3.9 mg/dL y 205.4 ± 23.3 mg/dL, respectivamente. Posteriormente, la insulina a una dosis de 0.75 mg/Kg disminuyó los niveles de valores entre 100 y 120 mg/dL. El análisis de ABC no mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Figura 15 A, B). Lo anterior indica que no existe resistencia a la insulina en este tiempo. En la semana 24 post-STZ se observaron resultados similares en las condiciones de DE+VEH y DE+STZ. Mientras que en la condición de DC+VEH se observaron concentraciones de glucosa entre 150 y 160 mg/dL durante las dos horas del experimento. En contraste, en el grupo DC+STZ se observó un incremento en los niveles de glucosa 15 y 30 minutos después de la inyección de insulina alcanzando un pico de 227.3 ± 34.1 mg/dL. Es importante mencionar que en este grupo los niveles de insulina se mantuvieron arriba de 200 mg/dL dos horas post-administración de insulina. En el análisis ABC se observó que el grupo de DC+STZ presentó un incremento de ABC estadísticamente significativo en comparación con el resto de los grupos (Figura 15D).

4 SEMANAS POST-STZ



24 SEMANAS POST-STZ

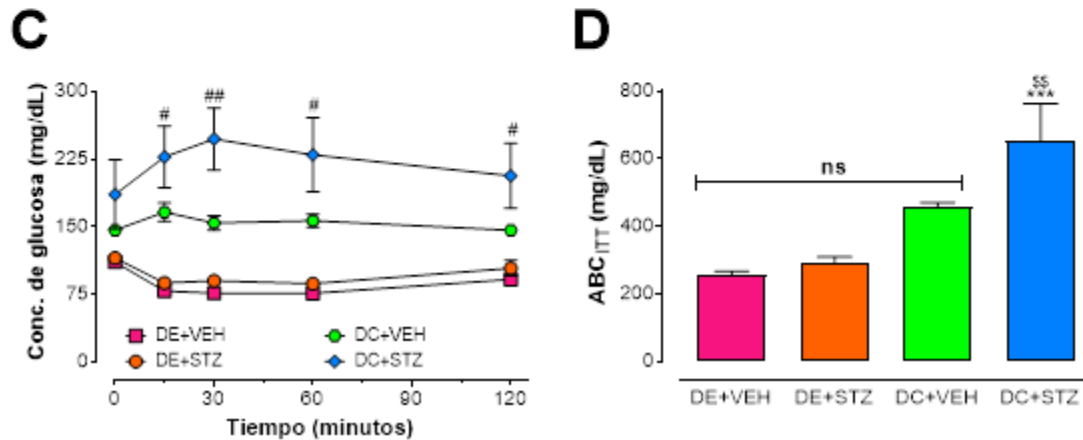


Figura 15. Curva de tolerancia a la insulina (CTI) 4 y 24 semanas post-STZ. Panel A y C, CTI semana 4 y 24 post-inyección de estreptozotocina, respectivamente. Panel B y D, Área Bajo la Curva (ABC) calculada a partir de la CTI. Cada punto representa el promedio de 8 animales \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ con respecto a la DE+VEH, \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$, \$\$\$ $P < 0.001$ con respecto a la DE+STZ, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ con respecto de la DC+VEH por ANOVA de tres vías seguida de la prueba de Bonferroni (CTI). ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni (gráfica de barras) con respecto de la DE+VEH. ns: no significativo.

8.1.5. Cuantificación de insulina en suero

Para confirmar si nuestros ratones presentaban resistencia a la insulina, se llevó a cabo la cuantificación de insulina en suero y el cálculo del índice HOMA-IR2 en la semana 24 post-estreptozotocina. En la figura 16A se muestra la concentración de insulina presente en las 4 condiciones experimentales en la semana 24 post-STZ. Se observa que los niveles de insulina son similares en los grupos de DE+VEH, DE+STZ. Mientras que en los grupos de DC+STZ y DC+VEH se observó un incremento estadísticamente significativo de los niveles de insulina en comparación de los demás grupos. A partir de estos datos se calculó el índice HOMA IR2 (Figura 16B). Los resultados mostraron que los ratones de las condiciones DE+VEH, y DE+STZ presentaron un índice <2 que indica la ausencia de resistencia a la insulina, mientras las condiciones DC+VEH y DC+STZ muestran un valor >2 que nos indica la presencia de resistencia a la insulina (Figura 16B). Podemos concluir que la dieta de cafetería con o sin STZ produjo resistencia a la insulina.

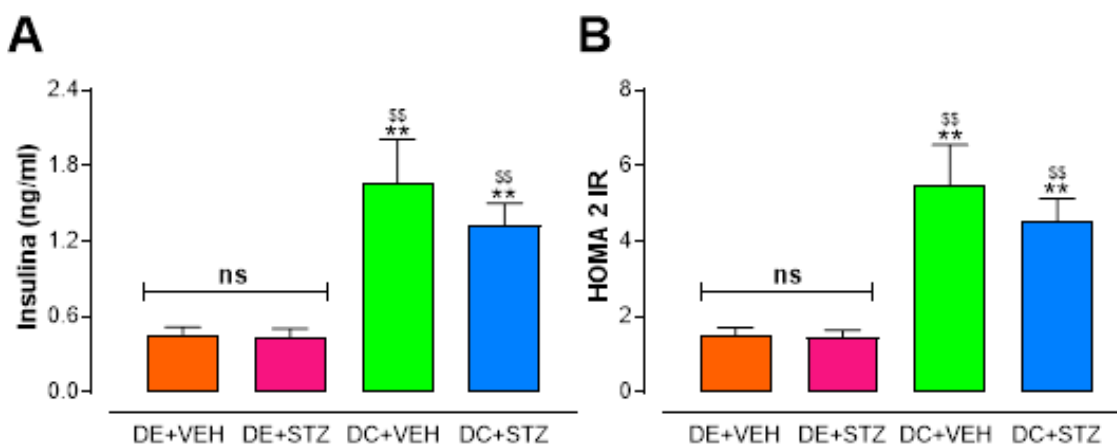


Figura 16. Niveles de insulina e índice HOMA-IR2 en la semana 24 post-STZ. Panel A, Concentración de insulina. Panel B, Índice HOMA 2 IR. Cada punto representa el promedio de 8 animales \pm SEM. *P <0.05 , ** , \$\$ P <0.01 . ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni con respecto a los grupos DE+VEH y DE+STZ. ns: no significativo.

8.2. Caracterización del curso temporal de alodinia mecánica en ratones con DMT2

Para la caracterización y la validación de un modelo de ND en primer lugar se determinó si en nuestras condiciones experimentales se desarrollaba hipersensibilidad mecánica (alodinia mecánica), un signo de dolor que presentan las personas con ND. Para esto se realizó la medición del 50% de umbral de retiro de las patas posteriores, mediante filamentos de von Frey cada dos semanas después de la administración y hasta el término del experimento. Se observó que en condiciones normales los ratones presentan un umbral de retiro de $1.16 \pm 0g$. Posteriormente se observó que el 50% de umbral de retiro de ambas patas posteriores de los grupos DE+VEH, DE+STZ, y DC+VEH se mantuvo en valores mayores a 0.8g (valores normales) durante todo el experimento. Mientras que en el grupo de DC+STZ se observó una disminución bilateral y gradual de los valores de 50% de umbral de retiro indicando la presencia de hipersensibilidad o alodinia mecánica. Esta disminución fue estadísticamente significativa a partir de la semana 12 y hasta la semana 24 post-STZ. Sin embargo, es importante notar que es en las semanas 22-24 post-STZ cuando la alodinia es más marcada y ya no presenta variaciones.

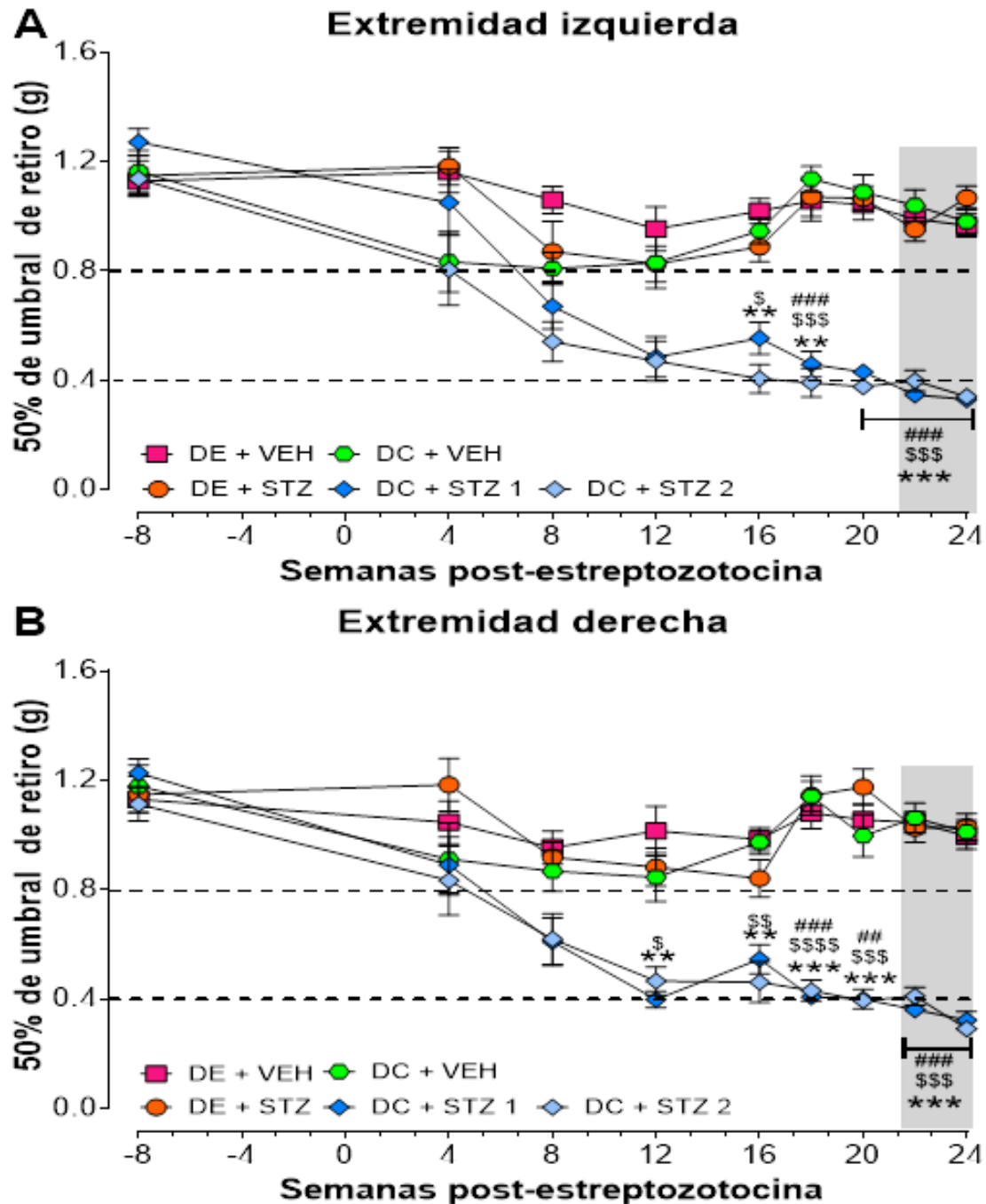


Figura 17. Caracterización del desarrollo de alodinia mecánica. Panel A y B curso temporal del 50% de umbral de retiro de las 4 condiciones en experimento en la extremidad izquierda y derecha, respectivamente. Cada punto representa el promedio de 10 animales \pm SEM. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 con respecto a la DE+VEH, \$P < 0.05, \$\$P < 0.01, \$\$\$P < 0.001 con respecto a la DE+STZ, #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 con respecto de la DC+VEH por ANOVA de tres vías seguida de la prueba de Bonferroni. ns: no significativo.

8.3. Validación del modelo con diferentes fármacos utilizados actualmente en el tratamiento del dolor neuropático

Finalmente, para validar el modelo de ND se determinó si el tratamiento con una dosis única de fármacos que se utilizan actualmente en el tratamiento actual del dolor neuropático revierte la alodinia mecánica en los ratones con DMT2. Para esto se evaluó el efecto antialodínico de los fármacos antidepresivos amitriptilina y duloxetina, los antiepilépticos gabapentina y carbamazepina, el opioide débil tramadol, y como control negativo el diclofenaco, en ratones con alodinia establecida (22-24 semanas post-STZ). La amitriptilina (30 mg/Kg i.p.) y la duloxetina (30 mg/Kg) produjeron un incremento del 50% de umbral de retiro significativo que se observó 0.5 horas después de la administración con una duración 2.5 horas. El efecto máximo se observó una hora post-administración (Figura 18 A, D). Por otro lado, la gabapentina a la dosis de 100 mg/Kg incremento significativamente el 50% de umbral de retiro en ambas patas, a partir de la primera hora post-administración, alcanzando su efecto máximo dos horas post -inyección. El efecto antialodínico de la gabapentina tuvo una duración de 4 horas (Figura 18 B). La carbamazepina (100 mg/Kg) también mostró un efecto antialodínico desde la primera hora y hasta la hora ocho post-inyección. Su efecto máximo se observó 2 horas después de la administración (Figura 18 E). En la figura 18C, se observa la evaluación del efecto antialodínico del tramadol 30 mg/Kg, el efecto antialodínico inicio a la 0.5 horas después de la administración con una duración de 2.5 horas mientras que efecto máximo se observó 1 horas post-administración. En contraste, el diclofenaco 50 mg/Kg (Control negativo) no modifico los valores del 50% de umbral de retiro en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 18F).

Extremidad izquierda

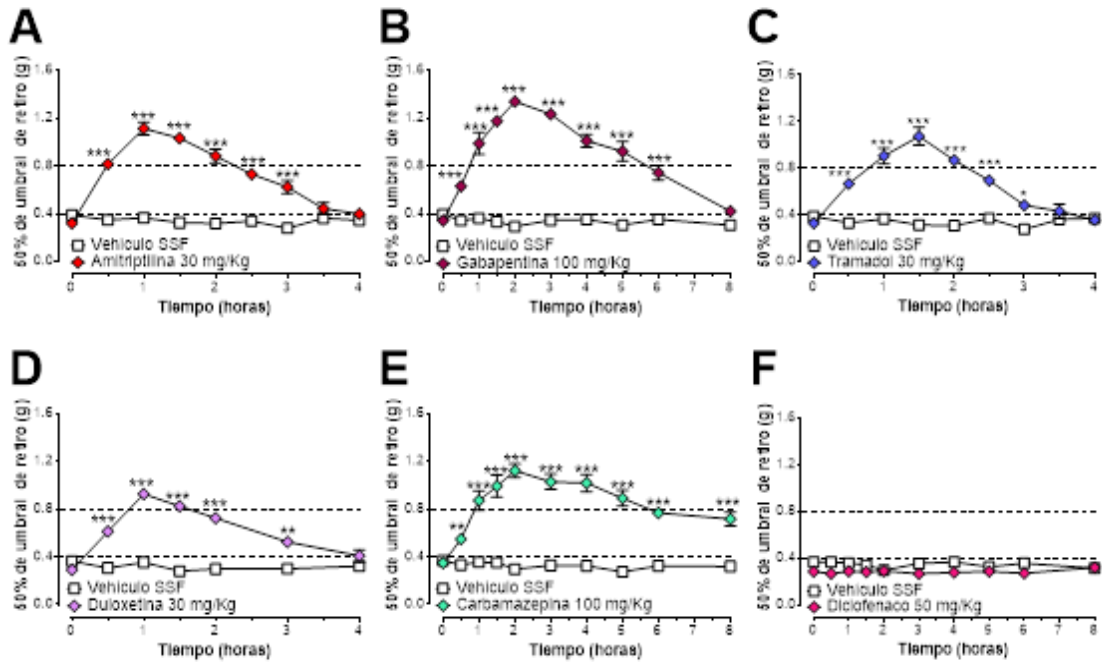


Figura 18. Efecto del tratamiento agudo con fármacos utilizados en el tratamiento del dolor neuropático en ratones con alodinia mecánica inducida por DMT2. Panel A y D, Curso temporal de los antidepresivos amitriptilina y duloxetina. Panel B y E, Curso temporal de los antiépilépticos gabapentina y carbamazepina. Panel C Curso temporal del opioide débil tramadol y panel F curso temporal del diclofenaco. Cada punto representa el promedio de 8 animales \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ con respecto al grupo tratado con el vehículo por ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni. SSF: Solución Salina Fisiológica, ns: no significativo.

9. DISCUSIÓN

9.1. Inducción de obesidad y DMT2

El presente proyecto se caracterizó y validó un modelo de ND en ratones hembra de la cepa C57 con la finalidad de utilizarlo en el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo y establecimiento de la ND, así como en la búsqueda de nuevos tratamientos. Para esto en primer lugar se implementó y caracterizó un modelo de DMT2. La DMT2 es el tipo de DM más prevalente ya que se presenta en aproximadamente el 90 de los casos y actualmente se considera un problema de salud pública (8, 223). Se presenta por defectos en la secreción o acción de la insulina, o ambos, que resulta en hiperglicemia crónica (1). Los factores que contribuyen al desarrollo de esta patología incluyen factores genéticos, malos hábitos alimenticios, inactividad física, obesidad etc. (16). Sin embargo, la RI se atribuye principalmente a la obesidad. Para que una persona sea diagnosticada con DM existen criterios que deben cumplirse y que en su mayoría están relacionados con los niveles de glucosa en sangre, en conjunto con la presencia de los síntomas clásicos de la DM. Así una persona se diagnostica con DM cuando presenta niveles de glucosa en ayuno mayores a 126 mg/dL, niveles de glucosa plasmática mayores a 200 mg/dL después de una medición casual, o 2 horas después de una carga de glucosa de 75 g, presenta niveles de Hb1ac mayores a 6.5%, o bien cuando presenta los síntomas clásicos más una glucosa casual mayor a 200 mg/dL (7). Estos pacientes frecuentemente son obesos y presentan resistencia a la insulina e hiperinsulinemia secundaria (10, 22). En el presente proyecto la inducción de DMT2 se realizó mediante una aproximación dietética que consistió en alimentar a los ratones, por un periodo de 32 semanas, con una dieta de cafetería alta en grasa y carbohidratos que trata de emular los hábitos alimenticios actuales y que están asociados a la actual pandemia de obesidad (224-226). Esta dieta está constituida por una serie de alimentos procesados y que son de consumo humano y como galletas, chocolates, embutidos, bebidas azucaradas, etc. Además, es importante tomar en cuenta que estos alimentos son baratos y que están ampliamente disponibles por lo que su consumo en la dieta de los humanos es muy frecuente y

lo cual fue otra de las razones para utilizar esta aproximación. En este escenario cabe mencionar que la dieta de cafetería ha sido utilizada previamente y se ha demostrado que induce obesidad en roedores acompañada de hiperfagia ya que los alimentos que constituyen la dieta son altamente apetecibles (214, 227, 228). Esto a diferencia de múltiples estudios en donde se utilizaron dietas altas en grasas que están disponibles comercialmente para investigación y en donde la principal fuente de grasa es manteca de cerdo, además son caras y difíciles de conservar por lo que son poco accesibles para muchos investigadores (127).

Otro componente importante de la fisiopatología de la DM es la disfunción de las células β -pancreáticas que se produce gradualmente como consecuencia de la lipotoxicidad y glucotoxicidad crónica y que eventualmente conducen a ausencia total de la secreción de insulina (22). Adicional al tratamiento dietético, en nuestro modelo se indujo una leve disfunción de las células β -pancreáticas a través de la administración de 4 dosis bajas de STZ (30 mg/kg/día) 8 semanas después del inicio del tratamiento dietético. Lo anterior debido a que en múltiples estudios se ha observado que el tratamiento dietético con dietas altas en grasa o dietas altas en grasa o carbohidratos, por sí solo, no es suficiente para generar hiperglicemia crónica es decir niveles de glucosa casual mayores a 200 mg/dL (194). Estas dietas generan un fenotipo prediabético más que DM *per se*. Además, se escogió este esquema de administración de STZ, debido a que por sí mismo no produce hiperglicemia. En este escenario nuestros resultados mostraron que los ratones alimentados por dieta de cafetería y administrados con dosis bajas de STZ mostraron un incremento significativo de peso, acompañado de un incremento de la grasa visceral en comparación con los animales alimentados con dieta estándar e inyectados con el vehículo o STZ, pero de menor magnitud que el observado en los ratones alimentados con la dieta de cafetería. Esto último podría ser un reflejo de la pérdida de peso observada en los humanos con DM2 establecida. Adicionalmente, en los ratones del grupo DC+STZ observamos el desarrollo gradual de hiperglicemia crónica (glucosa casual mayor a 200 mg/dL) que se mantuvo estable desde la semana 16 post-STZ y hasta el final del experimento. Sin embargo, la hiperglicemia crónica observada fue moderada pues se mantuvo por debajo de los 300 mg/dL.

Esto se acompañó de tolerancia a la glucosa observada desde etapas tempranas y hasta el final del experimento, acompañada con hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. Estos resultados en conjunto muestran que los ratones de DC+STZ presentaron DMT2. En el presente estudio también observamos que los ratones alimentados con DC+VEH también presentaron RI, ligera tolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia. Características del estado prediabético cafetería (229), lo cual está en concordancia con lo reportado en estudios previos en donde se utilizaron variaciones de la dieta de cafetería en roedores (214, 226) o bien se emplearon dietas comerciales altas en grasa y/o carbohidratos (187, 188, 191, 193, 196, 198).

9.2. Caracterización de alteraciones sensoriales en ratones con DMT2: alodinia mecánica

La ND es la complicación más común en los pacientes con DMT1 y DMT2 afectan aproximadamente al 50% de los diabéticos y presenta una mayor incidencia en la DMT2 (62, 230). Es una complicación de gran relevancia ya que incrementa la probabilidad de infecciones y el riesgo de desarrollar úlceras de pie y gangrena que eventualmente llevan a amputaciones de las extremidades inferiores (30).

Existen múltiples tipos de neuropatía, sin embargo, el tipo más común es la neuropatía diabética simétrica distal (29) por lo que la mayoría de los estudios relacionados con este tema, se refieren principalmente a este tipo de neuropatía. La ND se presenta por daño a los nervios del sistema nervioso autónomo o somático como resultado de las alteraciones metabólicas crónicas incluida la hiperglicemia crónica, estrés oxidativo e inflamación (43). Este daño a los nervios se manifiesta como una gran diversidad de signos y síntomas que inicia con el daño de los nervios largos que inervan los pies y progresa proximalmente afectando los nervios que inervan las manos (34). Los signos característicos incluyen cambios en la estructura nerviosa como regeneración y desmielinización segmentaria que conduce a alteraciones en la velocidad de conducción de los nervios sensoriales y motores, y a la disminución de la densidad de fibras nerviosas intraepidérmicas (75, 231). A nivel clínico se observan alteraciones sensoriales como pérdida de la sensibilidad, disestesias, parestesias, hipoestesia, entumecimiento y sensación de descargas

eléctricas (66, 67). Adicionalmente es importante destacar que el 25% de los pacientes presentan neuropatía diabética dolorosa en donde el dolor es el síntoma más debilitante y que afecta significativamente la calidad de vida de los pacientes. El dolor puede presentarse desde el inicio o puede desarrollarse durante el curso de la enfermedad y se manifiesta como dolor espontáneo o como dolor inducido por estímulos (dolor evocado) (35). El dolor evocado normalmente se evidencia como hiperalgesia y alodinia (74). Con base en lo anterior, el Diacomp estableció que un modelo de neuropatía diabética valido debe presentar al menos dos de las siguientes características observadas en el humano; 1) alteraciones sensoriales, 2) alteraciones en la velocidad de conducción nerviosa y 3) disminución de la densidad de fibras nerviosas intraepidérmicas (132). Debido a esto, en el presente estudio caracterizamos el curso temporal del desarrollo de alodinia mecánica en los ratones con DMT2 (ratones tratados con DC+STZ). Encontramos que en este grupo se produjo una disminución gradual y significativa del 50% de umbral de retiro de forma bilateral en las extremidades posteriores del ratón, desde la semana 12 post-STZ. Sin embargo, estos cambios fueron más consistentes desde la semana 16 y hasta la semana 24 post-STZ. Los cambios observados en la alodinia mecánica son congruentes con lo observado en un estudio realizado por Byrne y colaboradores en el 2015. En este estudio se indujo DMT2 en ratas macho con una dieta comercial alta en grasas (60% de grasa) y una dosis de STZ de 30 mg/kg administrada tres semanas después del inicio del tratamiento dietético. En cuanto a la alodinia, los autores encontraron alodinia marcada desde la semana 6 post-STZ y hasta el final del periodo experimental (17 post-STZ) (210). Es importante destacar que el estudio de Byrne y el nuestro son los únicos en donde se muestra el curso temporal de la alteración sensorial, es decir hipersensibilidad mecánica. Esto es de gran ventaja de nuestro modelo ya que podemos identificar cuando empieza a desarrollarse la alodinia y cuando ya se ha establecido. Además, la ventana de tiempo en la que se observó la alodinia es de gran relevancia ya que nos ofrece un periodo largo en donde se pueden evaluar posibles terapéuticas, tanto de forma aguda como crónica, ya sea de forma preventiva o como post-tratamiento. Por otro lado, en el resto de los estudios en donde se han empleado dietas altas en grasa con la combinación

de STZ, los cambios sensoriales solo se han evaluado en uno, dos o tres puntos del experimento (199-208). A pesar de esto parece ser claro que la combinación de dieta alta en grasas y STZ produce DMT2 en rata (204-212) y ratón (199-203) de forma robusta y con una duración que hasta 36 semanas post-STZ siempre y cuando se mantenga el tratamiento dietético. Esto refuerza la evidencia de que tanto la obesidad como la disfunción de las células β -pancreáticas contribuye al desarrollo de DMT2 y de ND, más aún teniendo en cuenta que cada una por separado no logran establecer un fenotipo neuropático robusto. Otro punto que es importante destacar que en la disminución del umbral de detección de estímulos o hipersensibilidad mecánicos se han detectado desde las 2 y hasta las 17 semanas post-STZ (199, 203, 209-211). Lo anterior es congruente con los resultados de nuestro estudio. Estos resultados muestran que la DMT2 produce alteraciones sensoriales, en este caso en particular alodinia mecánica de larga duración.

9.3. Validación farmacológica del modelo de ND

El tercer objetivo de nuestro proyecto fue validar nuestro modelo de ND con fármacos convencionales utilizados en el dolor neuropático, con el fin de demostrar que nuestro modelo puede ser predictivo para la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la neuropatía diabética, particularmente aquella que cursa con dolor. El tratamiento de la ND incluye el control glucémico estricto y manejo de factores de riesgo para retardar el progreso de la enfermedad, y el tratamiento sintomático particularmente el dolor. La piedra angular del tratamiento de la ND dolorosa es el tratamiento farmacológico. Este incluye diversos fármacos, que no se consideran analgésicos convencionales como lo son los AINES y los opioides, y que incluyen los siguientes tipos fármacos: 1) los antidepresivos a) tricíclicos, b) los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina y c) los inhibidores de la recaptura de serotonina y norepinefrina, 2) algunos tipos de antiepilépticos como los gabapentinoides y la carbamazepina y 3) los opioides débiles como el tramadol (101, 109). A pesar de que estos fármacos fueron diseñados para el tratamiento de otras patologías han mostrados cierta eficacia en el tratamiento del dolor neuropático por su capacidad de inhibir la hiperexcitabilidad neuronal, característica

principal del dolor neuropático desde un punto de vista fisiopatológico. Así algunos de estos fármacos alivian aproximadamente del 30 a 50% del dolor (100). Los mecanismos a través de los cuales estos fármacos disminuyen la excitabilidad neuronal son inhibición de canales de calcio que poseen la subunidad $\alpha_2\delta$ como es el caso de la gabapentina (110), inhibición de la recaptura de serotonina y noradrenalina (antidepresivos y tramadol) (100, 124), inhibición de los canales de sodio dependientes de voltaje (carbamazepina) (115) y activación de los receptores opioides (tramadol) (101, 102, 232, 233).

Debido a la gran diversidad de fármacos que se pueden utilizar algunas organizaciones internacionales establecieron guías de tratamiento en donde se distinguen 3 líneas de tratamiento farmacológico (101). Entre los fármacos más utilizados, de acuerdo con estas guías, se encuentran los antidepresivos como la amitriptilina y la Duloxetina, los antiepilépticos gabapentina y carbamazepina y el opioide débil tramadol. Con base en lo anterior en el presente estudio se evaluó si una dosis única, de los fármacos ya mencionados revertían la alodinia mecánica. Encontramos que los cinco fármacos evaluados tienen la capacidad de revertir la alodinia mecánica observada en las semanas 22-24 post-STZ. Estos resultados son congruentes con estudios realizados en roedores (218-222) y humanos con ND (101, 234, 235). Sin embargo, en ninguno de los modelos de ND validados por los criterios de Diacomp se ha realizado una evaluación farmacológica como la realizada en el presente trabajo.

Por otro lado, es importante mencionar que analgésicos como los AINES poseen baja o nula eficacia en el tratamiento del dolor neuropático. Por tal motivo, y como control positivo evaluamos diclofenaco (50 mg/Kg, i.p.) y se observó que este carece del efecto antialodínico en nuestras condiciones experimentales. Esto es congruente con los resultados de otros estudios en donde se ha observado que el diclofenaco carece de efecto antialodínico en ratas inyectadas con STZ (236, 237). De forma similar se observó que en pacientes diabéticos tratados con diclofenaco (100 mg c/12 horas por 10 meses no tiene efecto en la ND (238). Nuestros resultados sugieren que este es un modelo de ND confiable para la evaluación de diferentes

fármacos que potencialmente podrían utilizarse en el tratamiento de la ND asociada a DMT2.

10. CONCLUSIONES

El presente proyecto se logró la implementación de un modelo de ND en ratón hembra C57BL6 con obesidad y DMT2 a través de la alimentación de una dieta de cafetería más dosis bajas de STZ. En estas condiciones se observó el desarrollo de alteraciones sensoriales evidenciada como hipersensibilidad a estímulos mecánicos (alodinia mecánica) desde la semana 12 y hasta la semana 24 post-STZ. La alodinia mecánica fue revertida con los fármacos utilizados en el tratamiento actual del dolor neuropático. Estos resultados sugieren que el presente modelo podría ser útil para el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo y establecimiento de la ND y en la búsqueda de nuevas alternativas para su tratamiento.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar, mediante pruebas conductuales, si existen otras alteraciones sensoriales y/o manifestaciones de dolor espontáneo en el presente modelo de ND con el objetivo de identificar nuevas terapéuticas para su tratamiento.
- Evaluar mediante estudios electrofisiológicos si se producen alteraciones en la velocidad de conducción de fibras sensoriales y motoras en nuestro modelo.
- Evaluar la densidad de fibras nerviosas intraepidérmicas (IENFD) en distintos tiempos del experimento (16, 24 y 32 semanas post-STZ).
- Determinar si existen cambios en el perfil lipídico (triglicéridos y colesterol total) y en la hemoglobina glicosilada (HbA1c) a lo largo del periodo de inducción de DMT2
- Verificar si el modelo de ND se reproduce en ratones C57 machos.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Association AD. 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes care*. 2016;39(Supplement 1):S13-S22.
2. Ramachandran A. Know the signs and symptoms of diabetes. *Indian J Med Res*. 2014;140(5):579-81.
3. MacCracken J, Hoel D. From ants to analogues. Puzzles and promises in diabetes management. *Postgraduate medicine*. 1997;101(4):138-40, 43-5, 49-50.
4. Tattersall RB. The history of diabetes mellitus. *Textbook of diabetes*. 2017:1-22.
5. Leeder SR. The history of insulin: the mystery of diabetes. *The Medical journal of Australia*. 2013;199(4):227.
6. Association AD. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2019. *Diabetes Care*. 2019;42(Supplement 1):S13-S28.
7. Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*. 2020;43(Suppl 1):S14.
8. Federation ID. *IDF Diabetes Atlas*. 9th edn. Brussels ed2019.
9. Gillespie KM. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ*. 2006;175(2):165-70.
10. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2012;35 Suppl 1(Suppl 1):S64-S71.
11. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición [ENSANUT] 2018 [Available from: <https://ensanut.insp.mx/>].
12. Katsarou A, Gudbjörnsdóttir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nature reviews Disease primers*. 2017;3(1):1-17.
13. Zheng P, Li Z, Zhou Z. Gut microbiome in type 1 diabetes: A comprehensive review. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2018;34(7):e3043-e.
14. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*. 2010;464(7293):1293-300.
15. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet (London, England)*. 2018;391(10138):2449-62.
16. Kolb H, Martin S. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC medicine*. 2017;15(1):131.
17. De Lorenzo A, Soldati L, Sarlo F, Calvani M, Di Lorenzo N, Di Renzo L. New obesity classification criteria as a tool for bariatric surgery indication. *World J Gastroenterol*. 2016;22(2):681-703.
18. Organization WH. *Classification of diabetes mellitus*. 2019.
19. Chang-Chen KJ, Mullur R, Bernal-Mizrachi E. Beta-cell failure as a complication of diabetes. *Rev Endocr Metab Disord*. 2008;9(4):329-43.
20. Weinberg JM. Lipotoxicity. *Kidney international*. 2006;70(9):1560-6.
21. Surampudi PN, John-Kalarickal J, Fonseca VA. Emerging concepts in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*. 2009;76(3):216-26.
22. Guthrie RA, Guthrie DW. Pathophysiology of diabetes mellitus. *Critical care nursing quarterly*. 2004;27(2):113-25.
23. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature reviews Endocrinology*. 2018;14(2):88-98.
24. Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int J Med Sci*. 2014;11(11):1185-200.
25. Faselis C, Katsimardou A, Imprialos K, Deligkaris P, Kallistratos M, Dimitriadis K. Microvascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Current vascular pharmacology*. 2020;18(2):117-24.
26. Albers JW, Pop-Busui R. Diabetic neuropathy: mechanisms, emerging treatments, and subtypes. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2014;14(8):473-.
27. Sinnreich M, Taylor BV, Dyck PJB. Diabetic neuropathies: classification, clinical features, and pathophysiological basis. *The neurologist*. 2005;11(2):63-79.
28. Gylfadóttir SS, Weerachoenkul D, Andersen ST, Niruthisard S, Suwanwalaikorn S, Jensen TS. Painful and non-painful diabetic polyneuropathy: Clinical characteristics and diagnostic issues. *J Diabetes Investig*. 2019;10(5):1148-57.
29. Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, Zochodne DW, Wright DE, Bennett DL, et al. Diabetic neuropathy. *Nature reviews Disease primers*. 2019;5(1):42-.

30. Tesfaye S, Boulton AJM, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P, et al. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes care*. 2010;33(10):2285-93.
31. Gordon Smith A, Robinson Singleton J. Idiopathic neuropathy, prediabetes and the metabolic syndrome. *Journal of the neurological sciences*. 2006;242(1):9-14.
32. Boulton AJ. Diabetic neuropathy: classification, measurement and treatment. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 2007;14(2):141-5.
33. Vinik A, Ullal J, Parson HK, Casellini CM. Diabetic neuropathies: clinical manifestations and current treatment options. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2006;2(5):269-81.
34. Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, Zochodne DW, Wright DE, Bennett DL, et al. Diabetic neuropathy. *Nature reviews Disease primers*. 2019;5(1):41.
35. Scholz J, Finnerup NB, Attal N, Aziz Q, Baron R, Bennett MI, et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. *Pain*. 2019;160(1):53-9.
36. Rosenberger DC, Blechschmidt V, Timmerman H, Wolff A, Treede R-D. Challenges of neuropathic pain: focus on diabetic neuropathy. *J Neural Transm (Vienna)*. 2020;127(4):589-624.
37. Boulton AJ. Management of diabetic peripheral neuropathy. *Clinical diabetes*. 2005;23(1):9-15.
38. Singh R, Kishore L, Kaur N. Diabetic peripheral neuropathy: current perspective and future directions. *Pharmacological research*. 2014;80:21-35.
39. Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM, et al. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology*. 1993;43(4):817-24.
40. de Souza LR, Debiassi D, Ceretta LB, Simões PW, Tuon L. Meta-Analysis And Meta-Regression Of The Prevalence Of Diabetic Peripheral Neuropathy Among Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *International Archives of Medicine*. 2016;9.
41. Bansal V, Kalita J, Misra UK. Diabetic neuropathy. *Postgrad Med J*. 2006;82(964):95-100.
42. López JC. Prevalencia de neuropatía periférica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, atendidos en la Clínica Hospital del ISSSTE en Mazatlán, Sinaloa. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*. 2011;16(2):71-4.
43. Román-Pintos LM, Villegas-Rivera G, Rodríguez-Carrizalez AD, Miranda-Díaz AG, Cardona-Muñoz EG. Diabetic Polyneuropathy in Type 2 Diabetes Mellitus: Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function. *J Diabetes Res*. 2016;2016:3425617-.
44. Papanas N, Ziegler D. Risk Factors and Comorbidities in Diabetic Neuropathy: An Update 2015. *Rev Diabet Stud*. 2015;12(1-2):48-62.
45. Ziegler D, Papanas N, Vinik AI, Shaw JE. Epidemiology of polyneuropathy in diabetes and prediabetes. *Handbook of clinical neurology*. 2014;126:3-22.
46. Callaghan BC, Little AA, Feldman EL, Hughes RAC. Enhanced glucose control for preventing and treating diabetic neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;6(6):CD007543-CD.
47. Callaghan BC, Gallagher G, Fridman V, Feldman EL. Diabetic neuropathy: what does the future hold? *Diabetologia*. 2020;63(5):891-7.
48. Schlesinger S, Herder C, Kannenberg JM, Huth C, Carstensen-Kirberg M, Rathmann W, et al. General and abdominal obesity and incident distal sensorimotor polyneuropathy: insights into inflammatory biomarkers as potential mediators in the KORA F4/FF4 cohort. *Diabetes care*. 2019;42(2):240-7.
49. Callaghan BC, Xia R, Reynolds E, Banerjee M, Rothberg AE, Burant CF, et al. Association Between Metabolic Syndrome Components and Polyneuropathy in an Obese Population. *JAMA Neurol*. 2016;73(12):1468-76.
50. Dewanjee S, Das S, Das AK, Bhattacharjee N, Dihingia A, Dua TK, et al. Molecular mechanism of diabetic neuropathy and its pharmacotherapeutic targets. *European journal of pharmacology*. 2018;833:472-523.
51. Sifuentes-Franco S, Pacheco-Moisés FP, Rodríguez-Carrizalez AD, Miranda-Díaz AG. The Role of Oxidative Stress, Mitochondrial Function, and Autophagy in Diabetic Polyneuropathy. *J Diabetes Res*. 2017;2017:1673081-.
52. Dyck PJ, Giannini C. Pathologic alterations in the diabetic neuropathies of humans: a review. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1996;55(12):1181-93.
53. Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB. Inflammation and cancer. *Ann Afr Med*. 2019;18(3):121-6.

54. Mu ZP, Wang YG, Li CQ, Lv WS, Wang B, Jing ZH, et al. Association Between Tumor Necrosis Factor- α and Diabetic Peripheral Neuropathy in Patients with Type 2 Diabetes: a Meta-Analysis. *Molecular neurobiology*. 2017;54(2):983-96.
55. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 2015;4:180-3.
56. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(1):44-84.
57. Russell JW, Golovoy D, Vincent AM, Mahendru P, Olzmann JA, Mentzer A, et al. High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16(13):1738-48.
58. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*. 2011;435(2):297-312.
59. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417(1):1-13.
60. Vincent AM, Brownlee M, Russell JW. Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;959:368-83.
61. Leininger GM, Edwards JL, Lipshaw MJ, Feldman EL. Mechanisms of disease: mitochondria as new therapeutic targets in diabetic neuropathy. *Nature clinical practice Neurology*. 2006;2(11):620-8.
62. Tesfaye S, Vileikyte L, Rayman G, Sindrup SH, Perkins BA, Baconja M, et al. Painful diabetic peripheral neuropathy: consensus recommendations on diagnosis, assessment and management. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2011;27(7):629-38.
63. Ji R-R, Xu Z-Z, Gao Y-J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nature reviews Drug discovery*. 2014;13(7):533-48.
64. Bridgestock C, Rae CP. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2013;14(11):480-3.
65. Dureja GP, Iyer RN, Das G, Ahdal J, Narang P. Evidence and consensus recommendations for the pharmacological management of pain in India. *Journal of pain research*. 2017;10:709-36.
66. Aslam A, Singh J, Rajbhandari S. Pathogenesis of painful diabetic neuropathy. *Pain research and treatment*. 2014;2014:412041-.
67. Study RE, Kral MG. Spontaneous action potential activity in isolated dorsal root ganglion neurons from rats with a painful neuropathy. *Pain*. 1996;65(2-3):235-42.
68. Sun W, Miao B, Wang XC, Duan JH, Wang WT, Kuang F, et al. Reduced conduction failure of the main axon of polymodal nociceptive C-fibres contributes to painful diabetic neuropathy in rats. *Brain : a journal of neurology*. 2012;135(Pt 2):359-75.
69. Faber CG, Hoeijmakers JG, Ahn HS, Cheng X, Han C, Choi JS, et al. Gain of function Nav1.7 mutations in idiopathic small fiber neuropathy. *Annals of neurology*. 2012;71(1):26-39.
70. Orestes P, Osuru HP, McIntire WE, Jacus MO, Salajegheh R, Jagodic MM, et al. Reversal of neuropathic pain in diabetes by targeting glycosylation of Ca(V)3.2 T-type calcium channels. *Diabetes*. 2013;62(11):3828-38.
71. Pan YZ, Pan HL. Primary afferent stimulation differentially potentiates excitatory and inhibitory inputs to spinal lamina II outer and inner neurons. *Journal of neurophysiology*. 2004;91(6):2413-21.
72. Ji R-R, Nackley A, Huh Y, Terrando N, Maixner W. Neuroinflammation and Central Sensitization in Chronic and Widespread Pain. *Anesthesiology*. 2018;129(2):343-66.
73. Ablin J, Neumann L, Buskila D. Pathogenesis of fibromyalgia - a review. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2008;75(3):273-9.
74. Baron R, Binder A, Wasner G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *The Lancet Neurology*. 2010;9(8):807-19.
75. Chen SR, Pan HL. Hypersensitivity of spinothalamic tract neurons associated with diabetic neuropathic pain in rats. *Journal of neurophysiology*. 2002;87(6):2726-33.
76. Price GW, Wilkin GP, Turnbull MJ, Bowery NG. Are baclofen-sensitive GABAB receptors present on primary afferent terminals of the spinal cord? *Nature*. 1984;307(5946):71-4.
77. Wang X-L, Zhang H-M, Chen S-R, Pan H-L. Altered synaptic input and GABAB receptor function in spinal superficial dorsal horn neurons in rats with diabetic neuropathy. *J Physiol*. 2007;579(Pt 3):849-61.
78. Perez-Garci E, Gassmann M, Bettler B, Larkum ME. The GABAB1b isoform mediates long-lasting inhibition of dendritic Ca²⁺ spikes in layer 5 somatosensory pyramidal neurons. *Neuron*. 2006;50(4):603-16.

79. Bannister K, Dickenson AH. What do monoamines do in pain modulation? *Curr Opin Support Palliat Care*. 2016;10(2):143-8.
80. Vanegas H, Schaible HG. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain research Brain research reviews*. 2004;46(3):295-309.
81. Ossipov MH, Morimura K, Porreca F. Descending pain modulation and chronification of pain. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2014;8(2):143-51.
82. Morgado C, Silva L, Pereira-Terra P, Tavares I. Changes in serotonergic and noradrenergic descending pain pathways during painful diabetic neuropathy: the preventive action of IGF1. *Neurobiology of disease*. 2011;43(1):275-84.
83. Thompson SJ, Pitcher MH, Stone LS, Tarum F, Niu G, Chen X, et al. Chronic neuropathic pain reduces opioid receptor availability with associated anhedonia in rat. *Pain*. 2018;159(9):1856-66.
84. Mousa SA, Shaqura M, Khalefa BI, Zöllner C, Schaad L, Schneider J, et al. Rab7 silencing prevents μ -opioid receptor lysosomal targeting and rescues opioid responsiveness to strengthen diabetic neuropathic pain therapy. *Diabetes*. 2013;62(4):1308-19.
85. Akintoye OO, Owoyele BV, Fabunmi OA, Raimi TH, Oniyide AA, Akintoye AO, et al. Diabetic neuropathy is associated with increased pain perception, low serum beta-endorphin and increase insulin resistance among Nigerian cohorts in Ekiti State. *Heliyon*. 2020;6(7):e04377-e.
86. Austin PJ, Moalem-Taylor G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *Journal of neuroimmunology*. 2010;229(1-2):26-50.
87. McMahon SB, Cafferty WB, Marchand F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Experimental neurology*. 2005;192(2):444-62.
88. Tsuda M, Ueno H, Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. Activation of dorsal horn microglia contributes to diabetes-induced tactile allodynia via extracellular signal-regulated protein kinase signaling. *Glia*. 2008;56(4):378-86.
89. Tanga FY, Raghavendra V, DeLeo JA. Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochemistry international*. 2004;45(2-3):397-407.
90. Wang D, Couture R, Hong Y. Activated microglia in the spinal cord underlies diabetic neuropathic pain. *European journal of pharmacology*. 2014;728:59-66.
91. Rajchgot T, Thomas SC, Wang J-C, Ahmadi M, Balood M, Crosson T, et al. Neurons and Microglia; A Sickly-Sweet Duo in Diabetic Pain Neuropathy. *Front Neurosci*. 2019;13:25-.
92. Lanlua P, Prommahom A, Sricharoenvej S. Increased number of activated microglia in rat spinal cord during early stage of diabetic induction. *Folia morphologica*. 2020;79(4):662-71.
93. Gonçalves NP, Vægter CB, Andersen H, Østergaard L, Calcutt NA, Jensen TS. Schwann cell interactions with axons and microvessels in diabetic neuropathy. *Nature reviews Neurology*. 2017;13(3):135-47.
94. Østergaard L, Finnerup NB, Terkelsen AJ, Olesen RA, Drasbek KR, Knudsen L, et al. The effects of capillary dysfunction on oxygen and glucose extraction in diabetic neuropathy. *Diabetologia*. 2015;58(4):666-77.
95. Kim H, Kim JJ, Yoon Y-s. Emerging therapy for diabetic neuropathy: cell therapy targeting vessels and nerves. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2012;12(2):168-78.
96. Pop-Busui R, Boulton AJM, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, et al. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes care*. 2017;40(1):136-54.
97. Vinik AI, Nevoret ML, Casellini C, Parson H. Diabetic neuropathy. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2013;42(4):747-87.
98. Zhang Q, Yi N, Liu S, Zheng H, Qiao X, Xiong Q, et al. Easier operation and similar power of 10 g monofilament test for screening diabetic peripheral neuropathy. *J Int Med Res*. 2018;46(8):3278-84.
99. Boulton AJM, Armstrong DG, Albert SF, Frykberg RG, Hellman R, Kirkman MS, et al. Comprehensive foot examination and risk assessment: a report of the task force of the foot care interest group of the American Diabetes Association, with endorsement by the American Association of Clinical Endocrinologists. *Diabetes care*. 2008;31(8):1679-85.
100. Javed S, Petropoulos IN, Alam U, Malik RA. Treatment of painful diabetic neuropathy. *Therapeutic advances in chronic disease*. 2015;6(1):15-28.

101. Iqbal Z, Azmi S, Yadav R, Ferdousi M, Kumar M, Cuthbertson DJ, et al. Diabetic Peripheral Neuropathy: Epidemiology, Diagnosis, and Pharmacotherapy. *Clinical therapeutics*. 2018;40(6):828-49.
102. Laurence LB, Randa H-D, Bjorn CK. Goodman & Gilman's. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Decimotercera ed2013.
103. Allen R, Sharma U, Barlas S. Clinical experience with desvenlafaxine in treatment of pain associated with diabetic peripheral neuropathy. *Journal of pain research*. 2014;7:339-51.
104. Lunn MP, Hughes RA, Wiffen PJ. Duloxetine for treating painful neuropathy, chronic pain or fibromyalgia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014(1).
105. Calandre EP, Rico-Villademoros F, Slim M. An update on pharmacotherapy for the treatment of fibromyalgia. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2015;16(9):1347-68.
106. Rogawski MA, Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004;5(7):553-64.
107. Sidhu HS, Sadhotra A. Current status of the new antiepileptic drugs in chronic pain. *Front Pharmacol*. 2016;7:276.
108. Vranken JH. Mechanisms and Treatment of Neuropathic Pain. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*(Chemistry - Central Nervous System Agents). 2009;9(1):71-8.
109. Várkonyi T, Kempler P. Diabetic neuropathy: new strategies for treatment. *Diabetes, obesity and metabolism*. 2008;10(2):99-108.
110. Taylor CP, Angelotti T, Fauman E. Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: the calcium channel alpha2-delta (alpha2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. *Epilepsy research*. 2007;73(2):137-50.
111. Arezzo JC, Rosenstock J, LaMoreaux L, Pauer L. Efficacy and safety of pregabalin 600 mg/d for treating painful diabetic peripheral neuropathy: a double-blind placebo-controlled trial. *BMC neurology*. 2008;8(1):33.
112. Tassone DM, Boyce E, Guyer J, Nuzum D. Pregabalin: a novel gamma-aminobutyric acid analogue in the treatment of neuropathic pain, partial-onset seizures, and anxiety disorders. *Clin Ther*. 2007;29(1):26-48.
113. Tölle T, Freynhagen R, Versavel M, Trostmann U, Young Jr JP. Pregabalin for relief of neuropathic pain associated with diabetic neuropathy: a randomized, double-blind study. *European journal of pain*. 2008;12(2):203-13.
114. Mellegers MA, Furlan AD, Mailis A. Gabapentin for neuropathic pain: systematic review of controlled and uncontrolled literature. *Clin J Pain*. 2001;17(4):284-95.
115. Gierbolini J, Giarratano M, Benbadis SR. Carbamazepine-related antiepileptic drugs for the treatment of epilepsy - a comparative review. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2016;17(7):885-8.
116. Wiffen PJ, Derry S, Moore RA, McQuay HJ. Carbamazepine for acute and chronic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011(1):CD005451-CD.
117. Razazian N, Baziyar M, Moradian N, Afshari D, Bostani A, Mahmoodi M. Evaluation of the efficacy and safety of pregabalin, venlafaxine, and carbamazepine in patients with painful diabetic peripheral neuropathy. A randomized, double-blind trial. *Neurosciences (Riyadh, Saudi Arabia)*. 2014;19(3):192-8.
118. Saeed T, Nasrullah M, Ghafoor A, Shahid R, Islam N, Khattak MU, et al. Efficacy and tolerability of carbamazepine for the treatment of painful diabetic neuropathy in adults: a 12-week, open-label, multicenter study. *Int J Gen Med*. 2014;7:339-43.
119. Moore A, Wiffen P, Kalso E. Antiepileptic drugs for neuropathic pain and fibromyalgia. *Jama*. 2014;312(2):182-3.
120. Williams JT, Ingram SL, Henderson G, Chavkin C, von Zastrow M, Schulz S, et al. Regulation of μ -opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacol Rev*. 2013;65(1):223-54.
121. Levin M. Opioids in headache. *Headache*. 2014;54(1):12-21.
122. Pathan H, Williams J. Basic opioid pharmacology: an update. *British journal of pain*. 2012;6(1):11-6.
123. James A, Williams J. Basic Opioid Pharmacology—An Update. *British Journal of Pain*. 2020;14(2):115-21.
124. Duehmke RM, Derry S, Wiffen PJ, Bell RF, Aldington D, Moore RA. Tramadol for neuropathic pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017(6).

125. Group CS. Treatment of painful diabetic neuropathy with topical capsaicin. A multicenter, double-blind, vehicle-controlled study. *Archives of internal medicine*. 1991;151(11):2225-9.
126. Baron R, Mayoral V, Leijon G, Binder A, Steigerwald I, Serpell M. 5% lidocaine medicated plaster versus pregabalin in post-herpetic neuralgia and diabetic polyneuropathy: an open-label, non-inferiority two-stage RCT study. *Current medical research and opinion*. 2009;25(7):1663-76.
127. Sullivan KA, Hayes JM, Wiggin TD, Backus C, Su Oh S, Lentz SI, et al. Mouse models of diabetic neuropathy. *Neurobiology of disease*. 2007;28(3):276-85.
128. Islam MS, Wilson RD. Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2012;933:161-74.
129. Jolivald CG, Frizzi KE, Guernsey L, Marquez A, Ochoa J, Rodriguez M, et al. Peripheral Neuropathy in Mouse Models of Diabetes. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2016;6(3):223-55.
130. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2005;22(4):359-70.
131. Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *The Lancet Neurology*. 2012;11(6):521-34.
132. Biessels GJ, Bril V, Calcutt NA, Cameron NE, Cotter MA, Dobrowsky R, et al. Phenotyping animal models of diabetic neuropathy: a consensus statement of the diabetic neuropathy study group of the EASD (Neurodiab). *J Peripher Nerv Syst*. 2014;19(2):77-87.
133. Pregoça I, Alves A, Nunes S, Gomes P, Fernandes R, Viana SD, et al. Diet-Induced Rodent Models of Diabetic Peripheral Neuropathy, Retinopathy and Nephropathy. *Nutrients*. 2020;12(1):250.
134. O'Brien PD, Sakowski SA, Feldman EL. Mouse models of diabetic neuropathy. *ILAR J*. 2014;54(3):259-72.
135. Kellogg AP, Wiggin TD, Larkin DD, Hayes JM, Stevens MJ, Pop-Busui R. Protective effects of cyclooxygenase-2 gene inactivation against peripheral nerve dysfunction and intraepidermal nerve fiber loss in experimental diabetes. *Diabetes*. 2007;56(12):2997-3005.
136. Al-Awar A, Kupai K, Veszelka M, Szűcs G, Attieh Z, Murlasits Z, et al. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *J Diabetes Res*. 2016;2016:9051426-.
137. Bolzán AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutation research*. 2002;512(2-3):121-34.
138. Aghanoori M-R, Smith DR, Roy Chowdhury S, Sabbir MG, Calcutt NA, Fernyhough P. Insulin prevents aberrant mitochondrial phenotype in sensory neurons of type 1 diabetic rats. *Experimental neurology*. 2017;297:148-57.
139. Aghanoori M-R, Smith DR, Shariati-Ievari S, Ajisebutu A, Nguyen A, Desmond F, et al. Insulin-like growth factor-1 activates AMPK to augment mitochondrial function and correct neuronal metabolism in sensory neurons in type 1 diabetes. *Mol Metab*. 2019;20:149-65.
140. Schratzberger P, Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Pola R, Curry C, et al. Reversal of experimental diabetic neuropathy by VEGF gene transfer. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(9):1083-92.
141. Lupachyk S, Watcho P, Obrosov AA, Stavniichuk R, Obrosova IG. Endoplasmic reticulum stress contributes to prediabetic peripheral neuropathy. *Experimental neurology*. 2013;247:342-8.
142. Drel VR, Pacher P, Vareniuk I, Pavlov IA, Ilnytska O, Lyzogubov VV, et al. Evaluation of the peroxynitrite decomposition catalyst Fe(III) tetra-mesitylporphyrin octasulfonate on peripheral neuropathy in a mouse model of type 1 diabetes. *Int J Mol Med*. 2007;20(6):783-92.
143. Obrosova IG. Increased sorbitol pathway activity generates oxidative stress in tissue sites for diabetic complications. *Antioxidants & redox signaling*. 2005;7(11-12):1543-52.
144. Muller KA, Ryals JM, Feldman EL, Wright DE. Abnormal muscle spindle innervation and large-fiber neuropathy in diabetic mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1693-701.
145. Johnson MS, Ryals JM, Wright DE. Early loss of peptidergic intraepidermal nerve fibers in an STZ-induced mouse model of insensate diabetic neuropathy. *Pain*. 2008;140(1):35-47.
146. Demiot C, Tartas M, Fromy B, Abraham P, Saumet JL, Sigaud-Roussel D. Aldose reductase pathway inhibition improved vascular and C-fiber functions, allowing for pressure-induced vasodilation restoration during severe diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2006;55(5):1478-83.
147. Jack MM, Ryals JM, Wright DE. Protection from diabetes-induced peripheral sensory neuropathy--a role for elevated glyoxalase I? *Experimental neurology*. 2012;234(1):62-9.
148. Vieira WF, Malange KF, de Magalhães SF, Dos Santos GG, de Oliveira ALR, da Cruz-Höfling MA, et al. Gait analysis correlates mechanical hyperalgesia in a model of streptozotocin-induced diabetic neuropathy: A CatWalk dynamic motor function study. *Neuroscience letters*. 2020;736:135253.

149. Prnova MS, Kovacikova L, Svik K, Bezek S, Elmazoğlu Z, Karasu C, et al. Triglyceride-lowering effect of the aldose reductase inhibitor cemtirestat-another factor that may contribute to attenuation of symptoms of peripheral neuropathy in STZ-diabetic rats. 2020;393(4):651-61.
150. Kellogg AP, Pop-Busui R. Peripheral nerve dysfunction in experimental diabetes is mediated by cyclooxygenase-2 and oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*. 2005;7(11-12):1521-9.
151. Tam J, Rosenberg L, Maysinger D. INGAP peptide improves nerve function and enhances regeneration in streptozotocin-induced diabetic C57BL/6 mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(14):1767-9.
152. Wiggin TD, Kretzler M, Pennathur S, Sullivan KA, Brosius FC, Feldman EL. Rosiglitazone treatment reduces diabetic neuropathy in streptozotocin-treated DBA/2J mice. *Endocrinology*. 2008;149(10):4928-37.
153. Homs J, Ariza L, Pagès G, Verdú E, Casals L, Udina E, et al. Comparative study of peripheral neuropathy and nerve regeneration in NOD and ICR diabetic mice. *J Peripher Nerv Syst*. 2011;16(3):213-27.
154. Rojas DR, Kuner R, Agarwal N. Metabolomic signature of type 1 diabetes-induced sensory loss and nerve damage in diabetic neuropathy. *Journal of molecular medicine*. 2019;97(6):845-54.
155. Vincent AM, Russell JW, Sullivan KA, Backus C, Hayes JM, McLean LL, et al. SOD2 protects neurons from injury in cell culture and animal models of diabetic neuropathy. *Experimental neurology*. 2007;208(2):216-27.
156. Korngut L, Ma CH, Martinez JA, Toth CC, Guo GF, Singh V, et al. Overexpression of human HSP27 protects sensory neurons from diabetes. *Neurobiology of disease*. 2012;47(3):436-43.
157. Kan M, Guo G, Singh B, Singh V, Zochodne DW. Glucagon-like peptide 1, insulin, sensory neurons, and diabetic neuropathy. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2012;71(6):494-510.
158. Kennedy JM, Zochodne DW. Experimental diabetic neuropathy with spontaneous recovery: is there irreparable damage? *Diabetes*. 2005;54(3):830-7.
159. Schratzberger P, Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Pola R, Curry C, et al. Reversal of experimental diabetic neuropathy by VEGF gene transfer. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(9):1083-92.
160. Lupachyk S, Watcho P, Stavniichuk R, Shevalye H, Obrosova IG. Endoplasmic reticulum stress plays a key role in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes*. 2013;62(3):944-52.
161. Obrosova IG, Mabley JG, Zsengeller Z, Charniauskaia T, Abatan OI, Groves JT, et al. Role for nitrosative stress in diabetic neuropathy: evidence from studies with a peroxynitrite decomposition catalyst. 2005;19(3):1-21.
162. Demiot C, Tartas M, Fromy B, Abraham P, Saumet JL, Sigaud-Roussel D. Aldose Reductase Pathway Inhibition Improved Vascular and C-Fiber Functions, Allowing for Pressure-Induced Vasodilation Restoration During Severe Diabetic Neuropathy. 2006;55(5):1478-83.
163. Jack MM, Ryals JM, Wright DE. Protection from diabetes-induced peripheral sensory neuropathy--a role for elevated glyoxalase I? *Experimental neurology*. 2012;234(1):62-9.
164. Wiggin TD, Kretzler M, Pennathur S, Sullivan KA, Brosius FC, Feldman EL. Rosiglitazone treatment reduces diabetic neuropathy in streptozotocin-treated DBA/2J mice. *Endocrinology*. 2008;149(10):4928-37.
165. Homs J, Ariza L, Pagès G, Verdú E, Casals L, Udina E, et al. Comparative study of peripheral neuropathy and nerve regeneration in NOD and ICR diabetic mice. 2011;16(3):213-27.
166. Korngut L, Ma CHE, Martinez JA, Toth CC, Guo GF, Singh V, et al. Overexpression of human HSP27 protects sensory neurons from diabetes. *Neurobiol Dis*. 2012;47(3):436-43.
167. Kennedy JM, Zochodne DW. Experimental Diabetic Neuropathy With Spontaneous Recovery. Is There Irreparable Damage? 2005;54(3):830-7.
168. Leiter EH. The NOD mouse: a model for insulin-dependent diabetes mellitus. *Current protocols in immunology*. 2001;Chapter 15:Unit 15.9.
169. Leiter EH, Schile A. Genetic and Pharmacologic Models for Type 1 Diabetes. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2013;3(1):9-19.
170. Choeiri C, Hewitt K, Durkin J, Simard CJ, Renaud JM, Messier C. Longitudinal evaluation of memory performance and peripheral neuropathy in the Ins2C96Y Akita mice. *Behav Brain Res*. 2005;157(1):31-8.

171. Drel VR, Pacher P, Stavniichuk R, Xu W, Zhang J, Kuchmerovska TM, et al. Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition counteracts renal hypertrophy and multiple manifestations of peripheral neuropathy in diabetic Akita mice. *Int J Mol Med*. 2011;28(4):629-35.
172. Kakoki M, Sullivan KA, Backus C, Hayes JM, Oh SS, Hua K, et al. Lack of both bradykinin B1 and B2 receptors enhances nephropathy, neuropathy, and bone mineral loss in Akita diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(22):10190-5.
173. Obrosova IG, Mabley JG, Zsengellér Z, Charniauskaia T, Abatan OI, Groves JT, et al. Role for nitrosative stress in diabetic neuropathy: evidence from studies with a peroxynitrite decomposition catalyst. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(3):401-3.
174. Gabra BH, Sirois P. Hyperalgesia in non-obese diabetic (NOD) mice: a role for the inducible bradykinin B1 receptor. *European journal of pharmacology*. 2005;514(1):61-7.
175. Elias KA, Cronin MJ, Stewart TA, Carlsen RCJD. Peripheral neuropathy in transgenic diabetic mice: restoration of C-fiber function with human recombinant nerve growth factor. 1998;47(10):1637-42.
176. Choeiri C, Hewitt K, Durkin J, Simard CJ, Renaud J-M, Messier CJBbr. Longitudinal evaluation of memory performance and peripheral neuropathy in the Ins2C96Y Akita mice. 2005;157(1):31-8.
177. Sullivan KA, Hayes JM, Wiggan TD, Backus C, Su Oh S, Lentz SI, et al. Mouse models of diabetic neuropathy. *Neurobiology of disease*. 2007;28(3):276-85.
178. Kakoki M, Sullivan KA, Backus C, Hayes JM, Oh SS, Hua K, et al. Lack of both bradykinin B1 and B2 receptors enhances nephropathy, neuropathy, and bone mineral loss in Akita diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(22):10190-5.
179. Drel VR, Mashtalir N, Ilnytska O, Shin J, Li F, Lyzogubov VV, et al. The leptin-deficient (ob/ob) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes*. 2006;55(12):3335-43.
180. li M, Nishimura H, Kusano KF, Qin G, Yoon YS, Wecker A, et al. Neuronal nitric oxide synthase mediates statin-induced restoration of vasa nervorum and reversal of diabetic neuropathy. *Circulation*. 2005;112(1):93-102.
181. Wang L, Chopp M, Szalad A, Liu Z, Bolz M, Alvarez FM, et al. Phosphodiesterase-5 is a therapeutic target for peripheral neuropathy in diabetic mice. *Neuroscience*. 2011;193:399-410.
182. Cheng HT, Dauch JR, Hayes JM, Hong Y, Feldman EL. Nerve growth factor mediates mechanical allodynia in a mouse model of type 2 diabetes. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2009;68(11):1229-43.
183. Shi T-JS, Zhang M-D, Zeberg H, Nilsson J, Grünler J, Liu S-X, et al. Coenzyme Q10 prevents peripheral neuropathy and attenuates neuron loss in the db-/db- mouse, a type 2 diabetes model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(2):690-5.
184. Cheng HT, Dauch JR, Oh SS, Hayes JM, Hong Y, Feldman EL. p38 mediates mechanical allodynia in a mouse model of type 2 diabetes. *Molecular pain*. 2010;6:28-.
185. Brussee V, Guo G, Dong Y, Cheng C, Martinez JA, Smith D, et al. Distal degenerative sensory neuropathy in a long-term type 2 diabetes rat model. *Diabetes*. 2008;57(6):1664-73.
186. Vincent AM, Hayes JM, McLean LL, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, Feldman EL. Dyslipidemia-induced neuropathy in mice: the role of oxLDL/LOX-1. *Diabetes*. 2009;58(10):2376-85.
187. Coppey L, Davidson E, Lu B, Gerard C, Yorek M. Vasopeptidase inhibitor ilepatril (AVE7688) prevents obesity- and diabetes-induced neuropathy in C57Bl/6J mice. *Neuropharmacology*. 2011;60(2-3):259-66.
188. Coppey L, Lu B, Gerard C, Yorek MA. Effect of Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme and/or Neutral Endopeptidase on Neuropathy in High-Fat-Fed C57Bl/6J Mice. *J Obes*. 2012;2012:326806-.
189. Guilford BL, Ryals JM, Wright DE. Phenotypic changes in diabetic neuropathy induced by a high-fat diet in diabetic C57BL/6 mice. *Experimental diabetes research*. 2011;2011:848307-.
190. Watcho P, Stavniichuk R, Ribnický DM, Raskin I, Obrosova IG. High-fat diet-induced neuropathy of prediabetes and obesity: effect of PMI-5011, an ethanolic extract of *Artemisia dracuncululus* L. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:268547-.
191. Stavniichuk R, Drel VR, Shevalye H, Vareniuk I, Stevens MJ, Nadler JL, et al. Role of 12/15-lipoxygenase in nitrosative stress and peripheral prediabetic and diabetic neuropathies. *Free radical biology & medicine*. 2010;49(6):1036-45.

192. Li J, Liu HQ. Function of Adenosine 2A Receptor in High-Fat Diet-Induced Peripheral Neuropathy. 2020;2020:7856503.
193. Rumora AE, LoGrasso G, Hayes JM, Mendelson FE, Tabbey MA, Haidar JA, et al. The Divergent Roles of Dietary Saturated and Monounsaturated Fatty Acids on Nerve Function in Murine Models of Obesity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2019;39(19):3770-81.
194. Turkiew E, Falconer D, Reed N, Höke A. Deletion of Sarm1 gene is neuroprotective in two models of peripheral neuropathy. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*. 2017;22(3):162-71.
195. Vincent AM, Hayes JM, McLean LL, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, Feldman EL. Dyslipidemia-induced neuropathy in mice: the role of oxLDL/LOX-1. *Diabetes*. 2009;58(10):2376-85.
196. Obrosova IG, Ilnytska O, Lyzogubov VV, Pavlov IA, Mashtalir N, Nadler JL, et al. High-fat diet induced neuropathy of pre-diabetes and obesity: effects of "healthy" diet and aldose reductase inhibition. *Diabetes*. 2007;56(10):2598-608.
197. Stavniichuk R, Drel VR, Shevalye H, Vareniuk I, Stevens MJ, Nadler JL, et al. Role of 12/15-lipoxygenase in nitrosative stress and peripheral prediabetic and diabetic neuropathies. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(6):1036-45.
198. Li J, Liu H-Q, Li X-B, Yu W-J, Wang T. Function of Adenosine 2A Receptor in High-Fat Diet-Induced Peripheral Neuropathy. *J Diabetes Res*. 2020;2020:7856503-.
199. Yorek MS, Obrosova A, Shevalye H, Holmes A, Harper MM, Kardon RH, et al. Effect of diet-induced obesity or type 1 or type 2 diabetes on corneal nerves and peripheral neuropathy in C57Bl/6J mice. *J Peripher Nerv Syst*. 2015;20(1):24-31.
200. O'Brien PD, Hinder LM, Rumora AE, Hayes JM, Dauch JR, Backus C, et al. Juvenile murine models of prediabetes and type 2 diabetes develop neuropathy. *Dis Model Mech*. 2018;11(12):dmm037374.
201. O'Brien PD, Guo K, Eid SA, Rumora AE, Hinder LM, Hayes JM, et al. Integrated lipidomic and transcriptomic analyses identify altered nerve triglycerides in mouse models of prediabetes and type 2 diabetes. *Dis Model Mech*. 2020;13(2):dmm042101.
202. Obrosova A, Shevalye H, Coppey LJ, Yorek MA. Effect of tempol on peripheral neuropathy in diet-induced obese and high-fat fed/low-dose streptozotocin-treated C57Bl6/J mice. *Free Radic Res*. 2017;51(4):360-7.
203. Leng J, Li X, Tian H, Liu C, Guo Y, Zhang S, et al. Neuroprotective effect of diosgenin in a mouse model of diabetic peripheral neuropathy involves the Nrf2/HO-1 pathway. *BMC complementary medicine and therapies*. 2020;20(1):126-.
204. Coppey L, Davidson E, Shevalye H, Obrosova A, Yorek M. Effect of Early and Late Interventions with Dietary Oils on Vascular and Neural Complications in a Type 2 Diabetic Rat Model. *J Diabetes Res*. 2019;2019:5020465-.
205. Davidson EP, Coppey LJ, Holmes A, Dake B, Yorek MA. Effect of treatment of high fat fed/low dose streptozotocin-diabetic rats with Ilepatriol on vascular and neural complications. *European journal of pharmacology*. 2011;668(3):497-506.
206. Coppey L, Davidson E, Shevalye H, Obrosova A, Torres M, Yorek MA. Progressive Loss of Corneal Nerve Fibers and Sensitivity in Rats Modeling Obesity and Type 2 Diabetes Is Reversible with Omega-3 Fatty Acid Intervention: Supporting Cornea Analyses as a Marker for Peripheral Neuropathy and Treatment. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020;13:1367-84.
207. Holmes A, Coppey LJ, Davidson EP, Yorek MA. Rat Models of Diet-Induced Obesity and High Fat/Low Dose Streptozotocin Type 2 Diabetes: Effect of Reversal of High Fat Diet Compared to Treatment with Enalapril or Menhaden Oil on Glucose Utilization and Neuropathic Endpoints. *J Diabetes Res*. 2015;2015:307285-.
208. Fink B, Coppey L, Davidson E, Shevalye H, Obrosova A, Chheda PR, et al. Effect of mitoquinone (Mito-Q) on neuropathic endpoints in an obese and type 2 diabetic rat model. *Free radical research*. 2020;54(5):311-8.
209. Ferhatovic L, Banozic A, Kostic S, Kurir TT, Novak A, Vrdoljak L, et al. Expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and pain-related behavior in rat models of type 1 and type 2 diabetes. *Anesthesia and analgesia*. 2013;116(3):712-21.
210. Byrne FM, Cheetham S, Vickers S, Chapman V. Characterisation of pain responses in the high fat diet/streptozotocin model of diabetes and the analgesic effects of antidiabetic treatments. *J Diabetes Res*. 2015;2015:752481-.

211. Jia GL, Huang Q, Cao YN, Xie CS, Shen YJ, Chen JL, et al. Cav-1 participates in the development of diabetic neuropathy pain through the TLR4 signaling pathway. 2020;235(3):2060-70.
212. Shi X, Chen Y, Nadeem L, Xu G. Beneficial effect of TNF- α inhibition on diabetic peripheral neuropathy. *J Neuroinflammation*. 2013;10:69-.
213. NOM-062-ZOO-1999 NOM. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 1999.
214. Leffa DD, Valvassori SS, Varela RB, Lopes-Borges J, Daumann F, Longaretti LM, et al. Effects of palatable cafeteria diet on cognitive and noncognitive behaviors and brain neurotrophins' levels in mice. *Metabolic brain disease*. 2015;30(4):1073-82.
215. Nagy C, Einwallner E. Study of In Vivo Glucose Metabolism in High-fat Diet-fed Mice Using Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) and Insulin Tolerance Test (ITT). *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2018(131).
216. The Oxford Center for Diabetes EaM. HOMA2 Calculator 2014 [Available from: <https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/>].
217. Dixon WJ. Efficient Analysis of Experimental Observations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1980;20(1):441-62.
218. Grim TW, Ghosh S, Hsu KL, Cravatt BF, Kinsey SG, Lichtman AH. Combined inhibition of FAAH and COX produces enhanced anti-allodynic effects in mouse neuropathic and inflammatory pain models. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2014;124:405-11.
219. Kremer M, Yalcin I, Gourmon Y, Wurtz X, Nexon L, Daniel D, et al. A Dual Noradrenergic Mechanism for the Relief of Neuropathic Allodynia by the Antidepressant Drugs Duloxetine and Amitriptyline. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2018;38(46):9934-54.
220. Wagner K, Yang J, Inceoglu B, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase inhibition is antinociceptive in a mouse model of diabetic neuropathy. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2014;15(9):907-14.
221. Kiguchi S, Imamura T, Ichikawa K, Kojima M. Oxcarbazepine antinociception in animals with inflammatory pain or painful diabetic neuropathy. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2004;31(1-2):57-64.
222. Codd EE, Martinez RP, Molino L, Rogers KE, Stone DJ, Tallarida RJ. Tramadol and several anticonvulsants synergize in attenuating nerve injury-induced allodynia. *Pain*. 2008;134(3):254-62.
223. Alam F, Islam MA, Khalil MI, Gan SH. Metabolic Control of Type 2 Diabetes by Targeting the GLUT4 Glucose Transporter: Intervention Approaches. *Current pharmaceutical design*. 2016;22(20):3034-49.
224. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(6):1109-17.
225. Leigh S-J, Kendig MD, Morris MJ. Palatable western-style cafeteria diet as a reliable method for modeling diet-induced obesity in rodents. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2019(153):e60262.
226. Zeeni N, Dagher-Hamalian C, Dimassi H, Faour WH. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. *Inflammation Research*. 2015;64(7):501-12.
227. Feijó GDS, de Oliveira S, Thoen R, Schaab EE, de Moura AC, Franco F, et al. Food Selection of Cafeteria Diet Affects Memory Dysfunction Related to Obesity. *Neurochem Res*. 2019;44(8):1869-77.
228. Bortolin RC, Vargas AR, Gasparotto J. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. 2018;42(3):525-34.
229. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *The Lancet*. 2012;379(9833):2279-90.
230. Selvarajah D, Kar D, Khunti K, Davies MJ, Scott AR, Walker J, et al. Diabetic peripheral neuropathy: advances in diagnosis and strategies for screening and early intervention. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2019;7(12):938-48.
231. Chandrasekaran K, Anjaneyulu M, Choi J, Kumar P, Salimian M, Ho C-Y, et al. Role of mitochondria in diabetic peripheral neuropathy: Influencing the NAD(+)-dependent SIRT1-PGC-1 α -TFAM pathway. *International review of neurobiology*. 2019;145:177-209.

232. Khmour MR. Treatment of diabetic peripheral neuropathy: a review. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2020;72(7):863-72.
233. Yamamoto H, Shimoshige Y, Yamaji T, Murai N, Aoki T, Matsuoka N. Pharmacological characterization of standard analgesics on mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuropharmacology*. 2009;57(4):403-8.
234. Attal N, Cruccu G, Baron R, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, et al. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *European journal of neurology*. 2010;17(9):1113-e88.
235. Pop-Busui R, Boulton AJ, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, et al. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes care*. 2017;40(1):136-54.
236. Barragán-Iglesias P, Oidor-Chan VH, Loeza-Alcocer E, Pineda-Farias JB, Velazquez-Lagunas I, Salinas-Abarca AB, et al. Evaluation of the neonatal streptozotocin model of diabetes in rats: Evidence for a model of neuropathic pain. *Pharmacological reports : PR*. 2018;70(2):294-303.
237. Murai N, Sekizawa T, Gotoh T, Watabiki T, Takahashi M, Kakimoto S, et al. Spontaneous and evoked pain-associated behaviors in a rat model of neuropathic pain respond differently to drugs with different mechanisms of action. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2016;141:10-7.
238. Tinoco-Samos A, Córdova-Pérez N, Arenas-Télez JM, Vargas-Girón A, Zárate A, Hernández-Valencia M. Clinical improvement of diabetic neuropathy with carbamazepine or diclofenac treatment. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2013;51(5):496-501.

13. ANEXO

Los resultados del presente proyecto fueron publicados en:

Castañeda-Corral G, Velázquez-Salazar NB, Martínez-Martínez A, Taboada-Serrano JN, Nuñez-Aragón PN, González-Palomares L, Acosta-González RI, Petricevich V, Acevedo-Fernández JJ, Montes S, Jiménez-Andrade JM. 2 Characterization of mechanical allodynia and skin innervation in a mouse model of type-2 diabetes induced by cafeteria-style diet and low-doses of streptozotocin. *Frontiers in pharmacology*. 2021 Feb 3; 11: 628438.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 15 de abril de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Caracterización y validación de un modelo murino de neuropatía diabética**”, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Norma Beatriz Velázquez Salazar. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dra. Gabriela Castañeda Corral



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GABRIELA CASTAÑEDA CORRAL | Fecha:2021-04-15 19:19:12 | Firmante

eGCQ9ymT01SC/J5I9Ujy0vrC6P9Lj1NwAfe0IW21QBCvEh0VV8kNi0RGAmgQkh5YSW8ZNMtBtx1tcOd9ZoW451uJ+Yqt9bX++pvXdMsk8gi2G8b5tDE/6Cmg7LMRcYtbhNEYoU0C9ZvxGRsxRqkF0PfsnQs9GPtoRxvqdJKtu64zKAph69jsSIPc24vHCd0KaAeFSiiAXdVIXR/btoosuhx0D8bbGgaJ3ZgakEcsK9PEPhBQx6dEsERY2bJjyFDiOraj3Zq9+ZEGhWzBig+1mMAx9EXaPOdX4Kx+PgCOpOBneeDhg47ptHksl4+aHvtlb2mFt5y2/rxYzljubsfw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



4pvged

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/HFaijlqG8bvjXcFJmZFg1YVRvimXmiHj>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 15 de abril de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Caracterización y validación de un modelo murino de neuropatía diabética**”, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Norma Beatriz Velázquez Salazar. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dr. Juan José Acevedo Fernández



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2021-04-15 21:20:08 | Firmante

HosN59nS02m+hSSq30MdPe1DQDWWhRrSnCv+/8CB3yMLGn5kRxy4c3jfctyCFG7t6EmDiC4m98H9IUJLUuRVANbtXLXDxy4IUWBc48y8sDbbdRbdjqCb3ae6KFjbPzkVYKuw+S6CC17M0ZbVT4J9fCkZ7EkZrYg0BaVm/jv03uPlpHsdRN3eLJTivhcD3bdoiVhh0tS8VZkx2N3hwBUAgiTCmx0SoPuJOyCwClJyl8MXQPRYCOpuUeEr0cp1RRbV9oezeoYTvYCN/aY+UyPOFese0CJmnENXSEZ/TYyqyOs1+WGQ6zD/gcw6ze39HUM8gJvNpDlyMdRYSpFM1RTB1vg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[RWDiOu](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/HOUqaYHLeUkE7nFNl4ZVh2CRWsZxhmFv>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 15 de abril de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Caracterización y validación de un modelo murino de neuropatía diabética**”, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Norma Beatriz Velázquez Salazar. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Juan Miguel Jiménez Andrade



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN MIGUEL JIMÉNEZ ANDRADE | Fecha:2021-04-15 19:41:23 | Firmante

K6iSW2lWwRGQcRvxM296DWFKUOjZSAtMHaAMO/WpujaqeeUDNGASSfGe7cbxGm+Ts/p7t1zgeRF0W0cKa5QPuSWKhqPdaOenQMQA8UDuucanUylaztwHL/sXaG0AiXXrsmjALvDyflL5jpmu/KafL1bFESlJRM5lcjSkVqaQ0hix8NUOafhiHUhr60LkC4UUubcF+Sxl0Y41IN8zRcmnykTVGZNXrJID0IKUMDzJF3ZclPp4doW81cykryGZvrnsMpSq3cWuCS6ca2oEyyqc3F0vne8HM23xUQ6MJFPsOrigfEadFpN1G7tEnW2DNFhn19OiU3cYHeyg57Ov1LBEBKA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[9ZWubU](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/0QFjYXb2KVtUNAWgMjYrMaWpf1ir0Nz>

