

Onda F, potencial sensorial y respuesta nociceptiva en un modelo de neuropatía diabética inducida por estreptozotocina en ratas

F-wave, sensory potential and nociceptive response in a rat model of streptozotocin-induced diabetic neuropathy

Glenda Romero-Hernández^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-0172-5041>

Héctor Pérez-Saad^{2*} <https://orcid.org/0000-0003-1133-4308>

Maday Fernández-Mayola² <https://orcid.org/0000-0002-0818-1972>

Daniela Risco-Acevedo² <https://orcid.org/0000-0001-6784-2446>

Diana Garcia-del-Barco² <https://orcid.org/0000-0003-3654-490x>

¹Universidad de La Habana. Facultad de Biología, Cuba.

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.

* Autor para la correspondencia: glendaromerohernandez@gmail.com

RESUMEN

Introducción: La onda F, los potenciales sensoriales y la respuesta nociceptiva al estímulo doloroso son pruebas neurofisiológicas utilizadas para abordar la condición neuropática en modelos experimentales realizados en animales de laboratorio.

Objetivo: Evidenciar la efectividad de un nuevo esquema de dosificación en un modelo de neuropatía diabética inducida por estreptozotocina en ratas.

Métodos: Se administró estreptozotocina a ratas adultas *Wistar* en dosis de 30 mg/kg por día, en días alternos (lunes, miércoles y viernes) durante una semana. Los niveles glicémicos y el peso corporal se midieron antes del tratamiento con estreptozotocina y semanalmente durante todo el período experimental (6 semanas). La onda F se registró en los músculos del pie con estimulación en el tobillo. Se registró el potencial sensorial de los nervios caudales. El tiempo de reacción a un estímulo nociceptivo térmico se examinó en la prueba de la placa caliente.

Resultados: En los animales tratados con estreptozotocina los niveles sostenidos de hiperglucemia y la reducción progresiva del peso corporal revelaron la condición neuropática diabética, también la conformación de la onda F y sus parámetros (amplitud, índice integral y persistencia) se redujeron seriamente, así como la conducción velocidad en potencial sensorial ($p < 0,05$), el tiempo de reacción se incrementó significativamente ($p < 0,05$).

Conclusiones: Las pruebas neurofisiológicas fueron efectivas para demostrar que el esquema de dosificación utilizado es capaz de desarrollar neuropatía periférica en un período de seis semanas. Los cambios en la onda F fueron particularmente relevantes y sugieren que, en paralelo con la transmisión sensorial periférica, evidenciada por el potencial sensorial y el tiempo de reacción, existe un compromiso neuropático de las porciones central y/o proximal de las fibras motoras.

Palabras clave: neuropatía periférica; estreptozotocina; onda F; potencial sensorial; placa caliente.

ABSTRACT

Introduction: F-wave, sensory potentials and nociceptive response to painful stimulus are neurophysiological tests used to address the neuropathic condition in experimental models performed in laboratory animals.

Objective: To demonstrate the effectiveness of a new dosing schedule in a rat model of streptozotocin-induced diabetic neuropathy.

Methods: Streptozotocin was administered to adult Wistar rats at doses of 30 mg/kg per day on alternate days (Monday, Wednesday and Friday) for one week. Glycemic levels and body weight were measured before streptozotocin treatment and weekly throughout the experimental period (6 weeks). The F wave was recorded in the foot muscles with ankle stimulation. The sensory potential of the caudal nerves was recorded. The reaction time to a thermal nociceptive stimulus was examined in the hot plate test.

Results: In animals treated with streptozotocin sustained levels of hyperglycemia and progressive reduction of body weight revealed diabetic neuropathic condition, also F-wave conformation and its parameters (amplitude, integral index and persistence) were severely reduced, as well as velocity conduction for sensory potential ($p < 0.05$), reaction time increased significantly ($p < 0.05$).

Conclusions: Neurophysiological tests were effective in demonstrating that the dosing schedule used is capable of developing peripheral neuropathy over a six-week period. The changes in the F wave were particularly relevant and suggest that, in parallel with peripheral sensory transmission, evidenced by sensory potential and reaction time, there is neuropathic involvement of the central and/or proximal portions of the motor fibers.

Keywords: peripheral neuropathy; streptozotocin; F-wave; sensory potential; hot plate

Recibido: 10/01/2022

Aceptado: 31/01/2022

Introducción

Los estudios de conducción nerviosa son esenciales en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de neuropatía diabética periférica en humanos, así como en estudios experimentales en animales de laboratorio. Particularmente, la onda F se reporta como uno de los parámetros neurofisiológicos más sensibles en pacientes diabéticos, ya que también se ve afectada en neuropatías subclínicas. Por otro lado, los estudios de conducción nerviosa que utilizan potenciales sensoriales (SP) también son importantes y están bien correlacionados con la pérdida de sensación (síntomas sensoriales neuropáticos negativos) como entumecimiento, o fenómenos aumentados (síntomas sensoriales neuropáticos positivos) como “pinchazos” y variedades de dolor.⁽¹⁾

El modelo de diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) en animales de laboratorio se usa ampliamente para obtener nuevos conocimientos sobre la fisiopatología de la diabetes, así como para descubrir nuevos agentes terapéuticos para tratarla. Sin embargo, una alta tasa de mortalidad es uno de los principales inconvenientes de este modelo.⁽²⁾ Para superar esta desventaja, se han informado varios protocolos de administración de STZ, ya sea administrando el compuesto solo o en combinación con otros procedimientos.^(3,4,5) Sin embargo, si el objetivo de la investigación es un nuevo agente terapéutico potencial, es necesario encontrar el método más simple para reducir varios factores que pueden comprometer la interpretación. Sobre la base de experimentos preliminares, nuestro objetivo era desarrollar la diabetes y la neuropatía diabética en ratas mediante la administración de STZ con la utilización de un esquema de dosificación diferente a los descritos anteriormente. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue demostrar la efectividad de un nuevo esquema de dosificación de STZ en la inducción del modelo de neuropatía diabética en ratas.

Métodos

Se adquirieron ratas *Wistar* macho del Centro Nacional de Reproducción Animal (CENPALAB, Cuba) y se adaptaron a las condiciones ambientales del laboratorio: ciclo 12/12 luz-oscuridad; 65 % de humedad relativa; temperatura ambiente de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, con libre acceso a agua y alimentos. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Investigación Animal de nuestra institución, de acuerdo con las normas internacionales.

Diabetes inducida por STZ

Las ratas se dividieron aleatoriamente en dos grupos: grupo de control (n=6) y grupo STZ (n=12), que recibieron vehículo y STZ (*Sigma-Aldrich*, Reino Unido), respectivamente. STZ se mantuvo a -20°C y disuelta en una solución tampón de citrato fosfato a pH=4,5 inmediatamente antes de su uso, se administró en dosis de 30 mg/kg/día i.p. cada dos días, durante una semana. La preparación de la solución y las inyecciones de STZ, se respetaron los procedimientos de protección recomendados por el proveedor de STZ. Para reducir el estrés rápido, los niveles de glucosa posprandial se midieron 72 h después de la última inyección de STZ y luego semanalmente durante todo el experimento. Se extrajo sangre de la punta de la cola y se determinó la glucemia mediante un glucómetro convencional (SUMA, Cuba). Los pesos de las ratas se registraron antes de la inyección de STZ -tiempo 0 (T0) y luego una vez por semana durante 6 semanas. La poliuria, la polifagia y la polidipsia se estimaron cualitativamente a través de la observación esporádica de la frecuencia de los cambios de jaula y la necesidad de más alimento y suministro de agua (datos no mostrados).

Electrofisiología

La electrofisiología se realizó con un aparato *Neuronic-5* (*Neuronic S.A*, Cuba). En primer lugar, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina e hidrato de cloral en dosis de 60 y 260 mg/kg i.p. respectivamente. La temperatura corporal de las ratas se

mantuvo a 36 °C se utilizó una manta termorregulada. Los animales se colocaron en una cámara de *Faraday* para registrar las ondas F de los músculos del pie durante la estimulación eléctrica en el tobillo 6: se aplicó una descarga de 32 estímulos con una frecuencia de 10 Hz. SP se obtuvo de la cola de rata, donde los electrodos de registro (RE) y los electrodos de estimulación (SE) estaban separados por 10 cm y estaban a 13 cm y 3 cm (respectivamente) de la base de la cola.^(7,4,8)

Prueba de la placa caliente

La placa caliente se utilizó para evaluar la reacción del animal a un estímulo térmico nociceptivo. Los animales se colocaron dentro de un vaso de precipitados de vidrio de 20 cm de diámetro y 25 cm de alto, que se colocó sobre una plataforma metálica sumergida en agua mantenida a 53 °C con un termostato (*Julavo*, Alemania). El tiempo transcurrido entre el contacto inicial de la rata con el fondo del vaso de precipitados y el lamido de una de las patas se consideró como RT⁽⁹⁾ y se midió con un cronómetro digital. El tiempo máximo de exposición fue de 3 min.⁽¹⁰⁾ Para el análisis estadístico se asignó un valor de 180 seg a los animales que no reaccionaron durante el tiempo de exposición.

Análisis estadístico

Graphpad Prism 6 se utilizó para el análisis estadístico. Se estimó un índice integral (amplitud/latencia de inicio × duración) para la onda F.⁽⁸⁾ También se evaluó la persistencia de la onda F dentro de una descarga de 32 estímulos, donde cualquier potencial superior a 0,30 mV y que aparece dentro del rango de latencia de la onda F se consideró como tal. Para el análisis de SP, la velocidad de conducción nerviosa se calculó la división a distancia entre RE y SE (en cm) y la latencia del potencial (en seg).

Resultados

Los animales inyectados con STZ exhibieron una elevación persistente de los niveles glicémicos, con valores entre 10 y 27 mmol/L durante todo el experimento, significativamente incrementados ($p < 0,05$) en comparación con el grupo control (Fig 1).

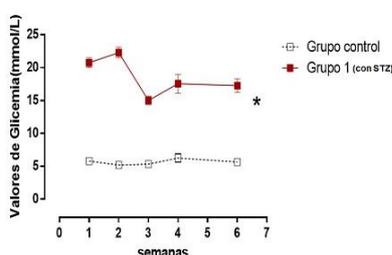


Fig 1-Valores de glicemia en el grupo tratado con STZ y el grupo de control. El asterisco indica diferencia estadística significativa ($p < 0,05$), según ANOVA de dos vías seguido de análisis de regresión.

El grupo STZ también exhibió una disminución progresiva del peso corporal a lo largo del período experimental, en contraste con el grupo control, en el que se manifestó una ganancia de peso corporal estable (Fig 2).

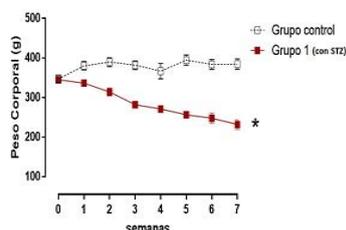


Fig 2- Valores de peso corporal en el grupo tratado con STZ y el grupo de control. El asterisco indica diferencia estadística significativa ($p < 0,05$), según ANOVA de dos vías seguido de análisis de regresión.

Los resultados electrofisiológicos muestran que la amplitud, el índice integral y la persistencia de la onda F se vieron afectados progresivamente en los animales tratados con STZ (Fig 3).

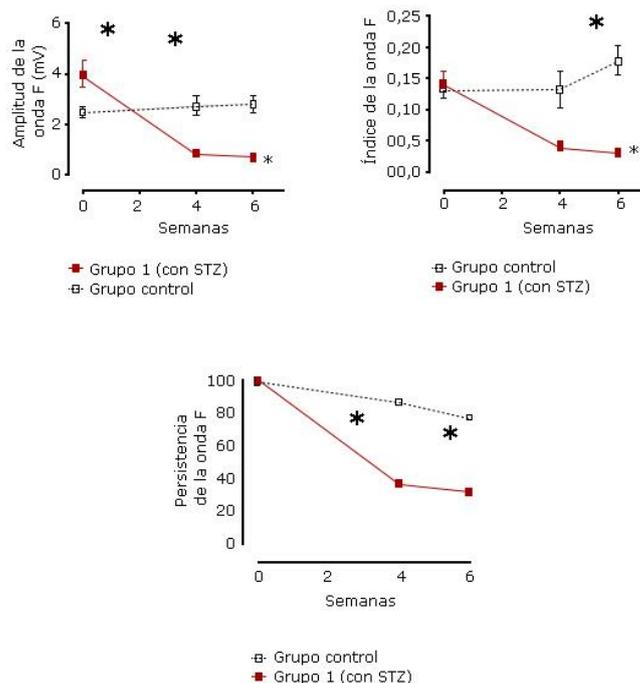


Fig 3 - Amplitud de onda F (A), índice integral (B) y persistencia de onda F (C) en el grupo tratado con STZ (cuadrado rojo) y el grupo de control (cuadrado vacío). Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) según ANOVA seguido de la prueba U de *Mann-Whitney*.

En general, estos cambios en la onda F también pueden apreciarse mediante la observación directa de los registros (Fig 4 y 5).

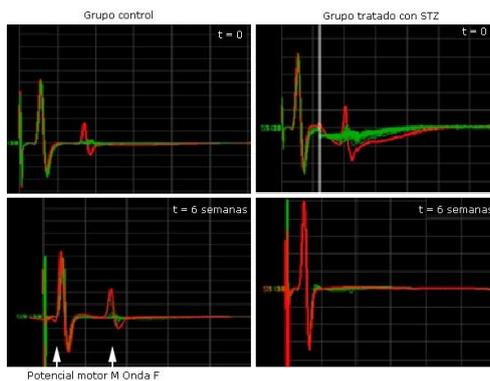


Fig 4 - Grabaciones de ondas F (primer estímulo de una descarga de 32 estímulos) en dos ratas que representan el grupo de control y el grupo tratado con STZ, correspondientemente en el tiempo 0 (T0) (antes de cualquier tratamiento) y en la semana 6 (T6) posoperatorio. M representa el potencial muscular directo.

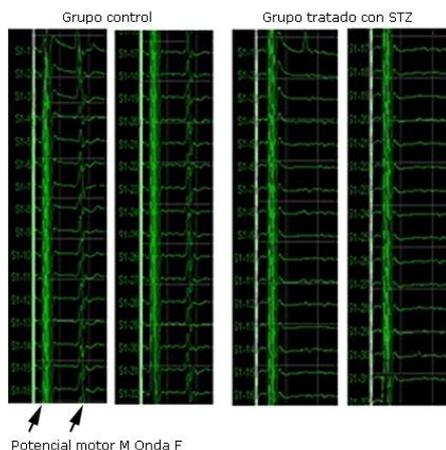


Fig 5 - Grabaciones de ondas F (una descarga de 32 estímulos) en dos ratas que representan el grupo de control y el grupo tratado con STZ, correspondientemente, en la semana 6 (T6) posterior al tratamiento. M representa el potencial muscular motor directo.

Paralelamente, la velocidad de conducción del SP también se vio afectada, con una reducción estadística significativa ($p < 0,05$) (Fig 6).

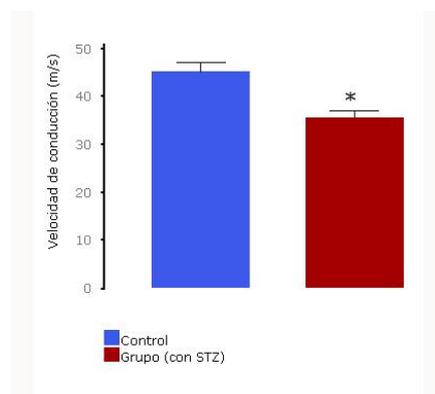


Fig 6 - Velocidad de conducción del potencial sensorial en los nervios caudales 6 semanas después de las inyecciones de STZ. El asterisco indica diferencia estadística significativa ($p < 0,05$), según el *Test U de Mann-Whitney*.

El RT al estímulo térmico nociceptivo agudo en la placa caliente se incrementó estadísticamente en el grupo tratado con STZ ($p < 0,05$), en comparación con el grupo control al final del período experimental (Fig 7).

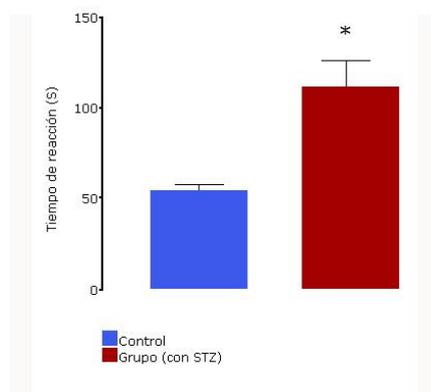


Fig 7- Tiempo de reacción en la prueba de placa caliente 6 semanas después de las inyecciones de STZ. El asterisco indica diferencia estadística significativa ($p < 0,05$), según el Test U de *Mann-Whitney*

Discusión

En este trabajo, los cambios en los patrones electrofisiológicos después de la inyección de STZ son consistentes con los reportados previamente en diferentes modelos experimentales de diabetes,^(2,11) se incluye el tiempo transcurrido entre las inyecciones de STZ y el inicio de la neuropatía diabética, que es de alrededor 6 semanas. En particular, la onda F mostró cambios importantes, demostrados por el análisis estadístico de índice integral, amplitud y persistencia. Este último se redujo en más del 50 % en 32 estimulaciones. Esta sensibilidad especial de la onda F podría explicarse que su conformación involucra no solo las estructuras más periféricas o axonales de las fibras motoras, sino también las raíces neurales proximales cercanas a la médula espinal o incluso los cuerpos celulares centrales.^(7,11) Se conoce que la estimulación eléctrica de cualquier porción de una fibra motora somática genera un impulso ortodrómico que estimula directamente las unidades motoras de los músculos inervados por dichas fibras, pero al mismo tiempo genera un impulso antidrómico que viaja a la médula espinal, donde se despolarizan las dendritas de las fibras correspondientes, desencadenando un nuevo impulso ortodrómico hacia los músculos. Todo este proceso determina la latencia y morfología de la onda F. Así, cualquier disrupción de las fibras motoras en los segmentos medial, proximal o central afecta la conducción antidrómica a la médula espinal y, en consecuencia, modifica la latencia y conformación de la onda F registrada en los músculos.

Varios reportes indican que la onda F es la variable neurofisiológica más sensible en la neuropatía diabética,^(7,11) ya que se ve afectada en los pacientes diabéticos incluso antes de la

aparición de las manifestaciones clínicas típicas de la neuropatía. Del presente experimento se podría interpretar razonablemente que se producen cambios metabólicos importantes a nivel de membrana en las fibras nerviosas motoras, que afectan la repolarización de la membrana, lo que hace imposible desarrollar nuevos potenciales de acción durante los estímulos posteriores administrados a una frecuencia de 10 Hz. Por esta razón, en varios animales tratados con STZ, la onda F parece normal solo en el primer estímulo de la descarga de 32 estímulos. En el resto de estímulos la onda F prácticamente desaparecía o se expresaba con una amplitud de voltaje muy baja, prácticamente indistinguible del ruido de línea base.

A diferencia de las ondas F, los SP son estructural y fisiológicamente más simples, afecta exclusivamente los impulsos ortodróxicos de las fibras sensoriales. Los resultados muestran que los impulsos sensoriales registrados desde los nervios caudales se ven notablemente afectados en los animales tratados con STZ, lo que se expresa en una reducción de la velocidad de conducción. Esto podría representar lo que ocurre en todo el sistema somático-sensorial, compatible con el aumento del tiempo de reacción al estímulo térmico doloroso obtenido en la prueba de la placa caliente. Esta pérdida sensorial está asociada a una condición neuropática severa.^(12,1)

Después de un experimento preliminar donde se exploró un nuevo esquema de administración de STZ, y donde la mortalidad se redujo notablemente a pesar de los niveles de glucosa en sangre permanentemente altos, se adoptó dicho esquema para el presente trabajo. En este nuevo esquema, la dosis total administrada (90 mg/kg) es superior a la reportada previamente para modelos con dosis única.⁽²⁾ En este caso, se consideró que la vida media de STZ en sangre es lo suficientemente corta⁽⁵⁾ como para asumir que no se acumularía en la sangre ni en otros órganos vitales (riñón, hígado, cerebro), y por lo tanto, podría prevenir una potencial toxicidad sobre dichos órganos, para preservar así la vida del animal, a diferencia de otros modelos clásicos.^(2,9,13) Además, este nuevo esquema de administración de STZ garantiza eliminar una suficiente cantidad de células *Beta* para producir una disminución en la secreción de insulina y, en consecuencia, un elevado nivel de glicemia, que se considera la causa principal o directa de los cambios fisiopatológicos subyacentes a la neuropatía.

Los resultados obtenidos con las pruebas neurofisiológicas, en paralelo con la hiperglucemia persistente y la reducción progresiva del peso corporal, confirmaron la validez del novedoso protocolo de administración de STZ realizado en el presente trabajo, y son la expresión del estado metabólico típico posterior a una reducción severa de la producción de insulina.

Se concluye que el resultado más importante de este trabajo fue confirmar la relevancia de los estudios de conducción nerviosa en este tipo de neuropatía diabética experimental y por tanto, su potencial contribución en la validación de nuevos modelos de esta patología. Los resultados aquí descritos muestran que el esquema de dosificación utilizado es capaz de desarrollar neuropatía periférica en un período de seis semanas, como se ha informado previamente para otros modelos.^(11,4,14) Además, estos resultados también muestran que los cambios en la onda F parecen ser el patrón electrofisiológico más sensible en la neuropatía diabética inducida por STZ, y podría ser la expresión de un compromiso neuropático proximal o central de las fibras motoras como parte de esta condición patológica.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a Nelvys Subirós-Martínez y a la profesora Rosa María Coro-Antich por su contribución en la revisión y corrección de aspectos formales del manuscrito. Los autores también agradecen a Sasha Sánchez y Yaima Rodríguez por su apoyo técnico.

Referencias bibliográficas

1. Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care*. 2003;26:1553-79.
2. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, *et al*. Single dose streptozotocin- induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim*. 2011;45:131-40.
3. Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol* 2015;70:5.47.1-5.47.20. DOI: <https://doi:10.1002/0471141755.ph0547s70>.
4. Jolivalt 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;6:223-55. DOI: <https://doi:10.1002/cpmo.11>
5. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51:216-26.
6. Horn M, Baumann R, Pereira JA, Sidiropoulos PNM, Somandin C, Welzl H, *et al*. Myelin is dependent on the Charcot-Marie-Tooth type 4H disease culprit protein Frabin/FGD4 in Schwann cells. *Brain*. 2012;135:3567-83.
7. Fisher MA. F-waves-physiology and clinical uses. *Sci World J* 2007;7:144-60.
8. Pérez-Saad H, Subiros N, Berlanga J, Aldana L, García del Barco D. Neuroprotective effect of epidermal growth factor in experimental acrylamide neuropathy: an electrophysiological approach. *J Peripher Nerv Syst*. 2017;22:106-11. DOI: <https://doi:10.1111/jns.12214>
9. Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967;126:201-5.
10. Mishra D, Ghosh G, Kumar S, Panda PK. An experimental study of analgesic activity of selective COX-2 inhibitor with conventional NSAIDs. *Asian J Pharm Clin Res* 2010;4:78-81.
11. Fisher MA. F-waves in diabetes mellitus: Answers and questions. *Muscle Nerve* 2014;49:783-5.
12. Cameron NE, Jack AM, Cotter MA. Effect of alpha-lipoic acid on vascular responses and nociception in diabetic rats. *Free Radic Biol Med* 2001;31:125-35.
13. Schlosser MJ, Kapeghian JC, Verlangieri AJ. Effects of streptozotocin in the male guinea pig: a potential animal model for studying diabetes. *Life Sci* 1984;35:649-55.
14. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:537-46.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Glenda Romero-Hernández, Héctor Pérez-Saad.

Curación de datos: Glenda Romero-Hernández, Héctor Pérez-Saad, Maday Fernández-Mayola.

Análisis formal: Glenda Romero-Hernández, Héctor Pérez-Saad.

Adquisición de fondos: Daniela Risco-Acevedo.

Investigación: Glenda Romero-Hernández, Maday Fernández-Mayola.

Metodología: Glenda Romero-Hernández, Héctor Pérez-Saad, Daniela Risco-Acevedo.

Administración del proyecto: Héctor Pérez-Saad, Diana García Del Barco.

Recursos: Héctor Pérez-Saad, Maday Fernández-Mayola, Daniela Risco-Acevedo.

Validación: Glenda Romero-Hernández, Héctor Pérez-Saad, Daniela Risco-Acevedo.

Redacción del borrador original: Glenda Romero-Hernández.

Redacción, revisión y edición: Glenda Romero-Hernández, Héctor Pérez-Saad, Diana García Del Barco.

Financiación

El Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, tuvo a su cargo la financiación del proyecto: Onda F, potencial sensorial y respuesta nociceptiva en un modelo de neuropatía diabética inducida por estreptozotocina en ratas.