



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA DAPSONA  
ADMINISTRADA SOLA O EN COMBINACIÓN CON EL PROBENECID EN UN  
MODELO DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL EN RATAS**

***T E S I S***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA  
LUCERO HAIDÉ VILLAVICENCIO BECERRIL**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**       **Profesor:** Naranjo Rodríguez Elia Brosla

**VOCAL:**               **Profesor:** Camacho Arroyo Ignacio

**SECRETARIO:**       **Profesor:** Díaz Ruiz María de los Ángeles Araceli

**1er. SUPLENTE:**     **Profesor:** González Trujano María Eva

**2° SUPLENTE:**       **Profesor:** Bravo Gómez María Elena

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE  
NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MANUEL VELASCO SUÁREZ**

**ASESOR DEL TEMA:**

**María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

**Lucero Haidé Villavicencio Becerril** \_\_\_\_\_

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN.....	VII
ANTECEDENTES.....	1
1.1. Generalidades del Sistema Nervioso.....	1
1.2. El sistema nervioso central.....	2
1.2.1. Encéfalo.....	2
1.2.2. Médula espinal.....	6
1.2. Epidemiología de la lesión traumática de médula espinal (LTME).....	9
1.4. Fisiopatología de la LTME.....	11
1.5. Mecanismos de daño secundario en la LTME.....	15
1.6. Generalidades del estrés oxidativo.....	18
1.6.1. Estrés oxidativo.....	18
1.6.3. Especies reactivas de oxígeno.....	20
1.6.4. Peroxidación lipídica.....	22
1.7. Defensas antioxidantes.....	23
1.8. El papel antioxidante del glutatión.....	26
1.9. El estrés oxidativo en la LTME.....	28
1.10. Peroxidación de lípidos durante la LTME.....	28
1.11. Estrategias neuroprotectoras después de una LTME.....	30
1.12. Dapsona.....	32
1.13. Probenecid.....	34
JUSTIFICACIÓN.....	36

HIPÓTESIS.....	37
OBJETIVOS.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
RESULTADOS.....	43
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	53
REFERENCIAS.....	54
APÉNDICE I.....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Representación del encéfalo con los lóbulos cerebrales.
- Figura 2. Principales componentes de la neurona.
- Figura 3. Células de la neuroglia.
- Figura 4. Estructura de la médula espinal.
- Figura 5. Columna vertebral.
- Figura 6. Vértebras espinales donde se muestran sus componentes principales.
- Figura 7. Causas de lesiones traumáticas de méula espinal.
- Figura 8. Principales eventos de daño secundario que se desencadenan después de una LTME.
- Figura 9. Mecanismos de daño secundario implicados después de una LTME.
- Figura 10. Representación del equilibrio redox.
- Figura 11. Proceso de la generación de ERO.
- Figura 12. Reacción de Fenton.
- Figura 13. Reacción de Haber-Weiss.
- Figura 14. Proceso de peroxidación lipídica iniciada por el radical  $R^{\cdot}$ .
- Figura 15. Reacción catalizada por la Superóxido dismutasa.
- Figura 16. Reacciones catalizadas por la enzima Catalasa.
- Figura 17. Reacción catalizada por la Glutación peroxidasa (GPx) y la Glutación reductasa (GRed).
- Figura 18. Estructura del glutatión (GSH).
- Figura 19. Metabolismo del glutatión.
- Figura 20. Representación de la degradación oxidativa de los lípidos.
- Figura 21. Estructura química de la Dapsona.
- Figura 22. Estructura química del Probenecid.
- Figura 23. Cuantificación de lipoperoxidación.
- Figura 24. Cuantificación de glutatión reducido.
- Figura 25. Cuantificación de glutatión oxidado.
- Figura 26. Relación glutatión reducido y glutatión oxidado.

## ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Oxígeno singulete
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ATP	Adenosín trifosfato
BHE	Barrera hematoencefálica
$\text{Ca}^{2+}$	Calcio
CAT	Catalasa
DDS	Dapsona
ERBr	Especies reactivas de bromo
ERCl	Especies reactivas de cloro
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GPx	Glutación peroxidasa
GRed	Glutación reductasa
GSH	Glutación
GSSG	Glutación oxidado
$\text{H}_2\text{O}$	Agua
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrógeno
IL	Interleucina
$\text{K}^+$	Potasio
LCR	Líquido cefaloraquídeo
LOX	Lipooxigenasa
LP	Peroxidación lipídica
LTME	Lesión traumática de médula espinal
Lts	Leucotrienos
MDA	Malonaldehído
$\text{Mg}^{2+}$	Magnesio
$\text{Na}^+$	Sodio

NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato
NMDA	N-Metil-D-aspartato
O <sub>2</sub>	Oxígeno
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anión superóxido
O <sub>3</sub>	Ozono
OH <sup>-</sup>	Ión hidroxilo
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxilo
PGs	Prostaglandinas
Prob	Probenecid
RL	Radicales libres
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SOD	Superóxido dismutasa
TFN	Factor de necrosis tumoral
TXA <sub>2</sub>	Tromboxanos A <sub>2</sub>
UV	Ultravioleta
XO	Xantina oxidasa



## RESUMEN

En la actualidad no se cuenta con estrategias terapéuticas efectivas para restablecer la función neurológica después de una lesión traumática de médula espinal (LTME), debido a la complejidad para regular los mecanismos de daño secundario, así como a la baja capacidad de regeneración espontánea que se observa en el sistema nervioso central (SNC) maduro. Después de una LTME el daño se incrementa por la acción de mecanismos autodestructivos, entre los cuales la apoptosis, la excitotoxicidad, la inflamación y el estrés oxidativo juegan un papel muy importante. En el presente trabajo se evaluó el efecto antioxidante de la dapsona administrada sola y en combinación con el probenecid en un modelo de LTME en ratas. Se ha reportado de manera reciente el efecto neuroprotector de la dapsona actuando como antiinflamatorio, antiapoptótico, antiexcitotóxico y antioxidante en modelos experimentales de infarto cerebral y LTME en ratas. Por otra parte el probenecid es un fármaco que se emplea como uricosúrico, sin embargo, en un estudio previo se demostró su capacidad para favorecer el bloqueo de la salida de ácidos orgánicos en el espacio extracelular cerebral. Para evaluar el efecto antioxidante de estas terapias farmacológicas, se realizó un estudio experimental aleatorizado en ratas a las que se les practicó una LTME por contusión moderada, posteriormente se evaluó la peroxidación de lípidos así como los niveles de glutatión reducido y oxidado presentes en el epicentro de la lesión en cada uno de los grupos experimentales y estos fueron comparados con los encontrados en el grupo control (sin tratamiento), por otra parte, los grupos lesionados que recibieron tratamiento fueron comparados con el grupo lesionado que no recibió tratamiento. Los resultados demostraron que la dapsona es un buen candidato para ser empleado como fármaco neuroprotector en la lesión traumática de médula espinal al disminuir significativamente la cantidad de lipoperoxidación. La administración de probenecid no tuvo efecto significativo sobre la lipoperoxidación. La combinación de dapsona-probenecid no mostró ser una buena terapia para la lesión traumática de médula espinal. El glutatión no tuvo una importante participación en la médula espinal, y no fue la defensa antioxidante de elección en la lesión traumática de médula espinal.

## ANTECEDENTES

### *1.1. Generalidades del Sistema Nervioso*

El sistema nervioso es uno de los más complejos sistemas y aparatos del organismo. Consiste en una red intrincada y altamente organizada de miles de millones de neuronas y de células gliales. Entre las estructuras que forman el sistema nervioso se hallan el encéfalo, los nervios craneales y sus ramas, la médula espinal, los nervios espinales y sus ramas, los ganglios nerviosos, los plexos entéricos y los receptores sensitivos (1).

El sistema nervioso lleva a cabo un complejo conjunto de tareas que pueden ser agrupadas en tres funciones básicas:

- **Función sensitiva:** Los receptores sensitivos detectan estímulos internos y los externos. Las neuronas denominadas sensitivas o aferentes transportan esta información hacia el encéfalo y hacia la médula espinal a través de nervios craneales y espinales
- **Función integradora:** El sistema nervioso procesa la información sensitiva analizando y conservando parte de ésta y tomando decisiones para efectuar las respuestas apropiadas.
- **Función motora:** Una vez que la información sensorial ha sido procesada (integrada), el sistema nervioso puede generar una respuesta motora adecuada. Las neuronas que cumplen esta función se denominan neuronas motoras o eferentes. Las neuronas motoras llevan información desde el cerebro hacia la médula espinal o a los efectores (músculos y glándulas) (1).

Las dos subdivisiones principales del sistema nervioso son el sistema nervioso central (SNC), formado por el encéfalo y la médula espinal y el sistema nervioso periférico (SNP), compuesto por los pares craneales que salen del encéfalo y los nervios raquídeos, procedentes de la médula espinal (2).

## 1.2. El sistema nervioso central

### 1.2.1. Encéfalo

El encéfalo está formado por un enorme número de neuronas de asociación y neuroglia acompañante que se organizan en regiones y subdivisiones. Estas neuronas reciben información sensitiva, dirigen la actividad de las neuronas motoras y llevan a cabo funciones encefálicas tan elevadas como el aprendizaje y la memoria (2).

Funciones de los lóbulos cerebrales (Figura1):

**Frontal:** Control motor de los músculos esqueléticos; procesos intelectuales superiores (concentración, planificación, toma de decisiones); comunicación verbal.

**Parietal:** Comunicación somatestésica (sensaciones cutáneas y musculares), comprensión de lenguaje y formación de palabras para expresar pensamientos y emociones; interpretación de formas y texturas.

**Temporal:** Interpretación de sensaciones auditivas; almacenamiento (memoria) de experiencias auditivas y visuales.

**Occipital:** Integración de los movimientos para enfocar la mirada; correlación entre imágenes visuales y experiencias visuales previas y otros estímulos sensitivos; percepción consciente de la visión.

**Ínsula:** Memoria; integración sensitiva (principalmente dolor) y visceral.

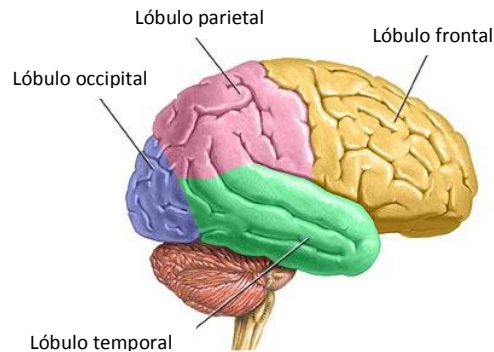


Figura 1. Representación del encéfalo con los lóbulos cerebrales (2).

Las neuronas son las unidades anatómicas y funcionales básicas del sistema nervioso. Están especializadas en la respuesta a los estímulos físicos y químicos, en la conducción de impulsos electroquímicos y en la liberación de reguladores químicos. Gracias a estas actividades, las neuronas hacen posible la percepción de estímulos sensitivos, el aprendizaje, la memoria y el control de los músculos y las glándulas (2).

La neurona está constituida principalmente por (Figura 2):

-Cuerpo celular o soma. A partir de este nacen múltiples propagaciones ramificadas que constituyen las principales áreas receptoras de las neuronas. Además brinda gran parte de la nutrición que se requiere para conservar la vida de la neurona.

-Dendritas. Son ramificaciones del soma y son las partes receptoras principales de la neurona.

-Axón. Es la parte de la neurona llamada fibra nerviosa. Estos transmiten las señales nerviosas a otras células (4).

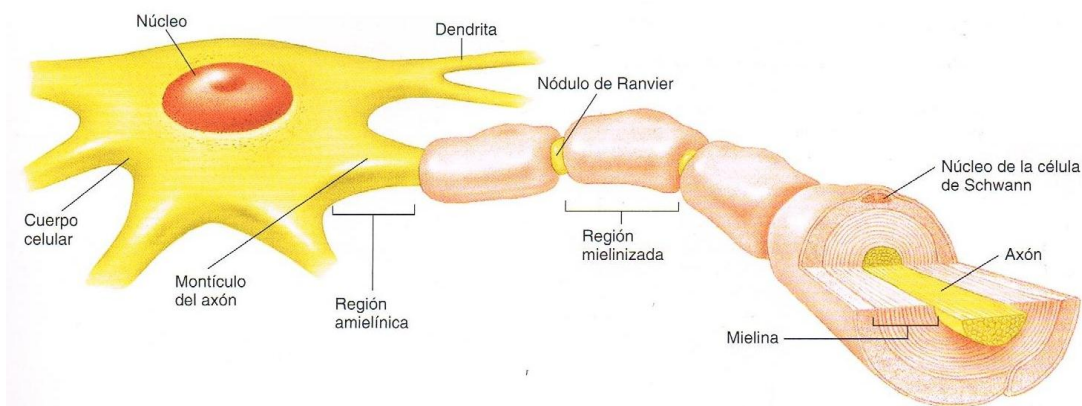


Figura 2. Principales componentes de la neurona (2).

## Clasificación de las neuronas

Las neuronas pueden clasificarse según su función o estructura. La clasificación funcional se basa, en la dirección en la que conducen los impulsos.

Las **neuronas sensitivas** o aferentes conducen impulsos desde los receptores sensitivos periféricos hasta el SNC.

Las **neuronas motoras** o eferentes, conducen los impulsos desde el SNC hacia los órganos efectores (músculos y glándulas).

Las **neuronas de asociación** o interneuronas, se encuentran en su totalidad en el interior del SNC, donde ejercen funciones asociativas o de integración del sistema nervioso (2).

La clasificación estructural de las neuronas depende del número de prolongaciones que emite el cuerpo celular.

Las **neuronas unipolares** tienen una única prolongación corta que se divide en forma de T para formar un par de prolongaciones más largas.

Las **neuronas bipolares** tienen dos prolongaciones en cada uno de sus extremos.

Las **neuronas multipolares** que son las más frecuentes, tienen varias dendritas y un solo axón que nace del cuerpo celular (2).

En el SNC los grupos de cuerpos neuronales (con sus dendritas y porciones proximales de sus axones) constituyen la sustancia gris, mientras que los grupos de los axones, en su mayor parte mielinizados, conforman la sustancia blanca.

El impulso nervioso consiste en una onda de despolarización y repolarización que se autopropaga a lo largo de la membrana plasmática de una neurona; también llamado potencial de acción nervioso. Cada neurona constituye una entidad separada y distinta. Las terminaciones axonales de cada neurona al tener contacto con las dendritas y los cuerpos celulares de otras neuronas forman una sinapsis, la cual tiene la función de transmitir el impulso nervioso de una neurona a otra formando vías nerviosas cortas o largas. Las sinapsis pueden ser químicas si la comunicación está mediada por neurotransmisores o eléctricas si esta mediada por iones y las membranas están acopladas eléctricamente.

Las células de sostén y aislamiento, sostienen a las neuronas en su sitio e impiden que se extiendan las señales entre las células y sus estructuras intracelulares que de manera colectiva se llaman neuroglia o células gliales en el SNC (4).

Las células de la neuroglia en el SNC se dividen en (Figura 3):

**Oligodendrocitos:** Son células de tamaño intermedio, se encuentran en íntima relación con los axones y los somas neuronales. Desempeñan un papel importante en la formación y mantenimiento de la vaina de mielina de las fibras nerviosas del SNC.

**Astroglia:** Son las células más grandes del tejido glial, tienen forma de estrella, están involucradas en el metabolismo neuronal y nutrición de las neuronas, colaboran en la neurotransmisión y se encargan de la regulación de diversos sustratos y precursores para la síntesis de citocinas. También, participan junto con la microglia en actividades fagocíticas, eliminando restos de tejido nervioso en degeneración.

**Microglia:** Son las células más pequeñas de la glía y su función es responder como células inflamatorias cuando existe un estímulo traumático o infeccioso sintetizando citocinas (3).

**Células ependimarias:** Revisten a los ventrículos (cavidades) del encéfalo y el canal central de la médula espinal (2).

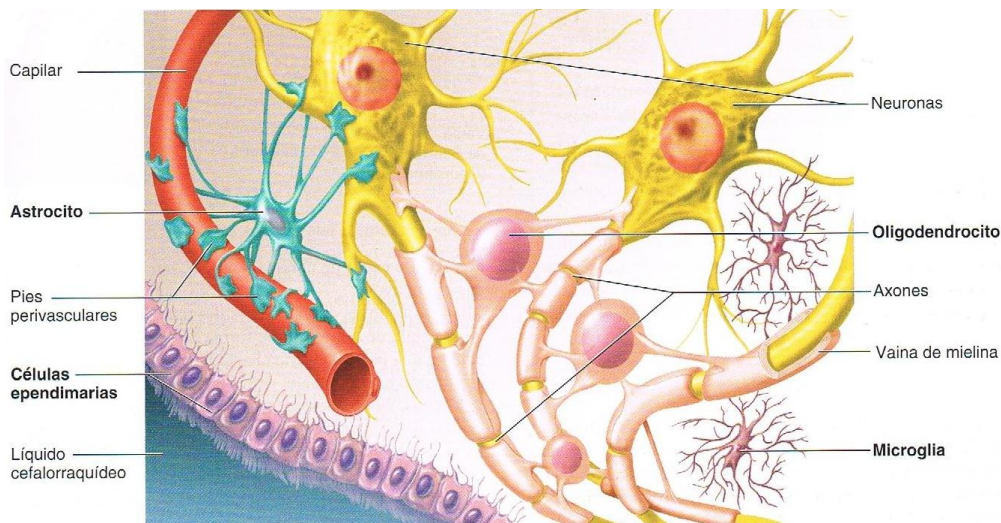


Figura 3. Células de la neuroglia (2)

### 1.2.2. Médula espinal

La médula espinal se extiende desde el agujero occipital del cráneo hasta la primera vértebra lumbar (2). Está envuelta y protegida por unas capas de tejido conectivo, llamadas meninges, y por el líquido cefalorraquídeo (LCR) que hay entre éstas. La médula espinal tiene una región central de tejido que contiene células nerviosas y está rodeada por conductos largos de fibras nerviosas compuestas de axones. Los conductos se extienden hacia arriba y hacia abajo, transmitiendo señales hacia y desde el cerebro. El interior de la médula está compuesto de neuronas, sus células de apoyo llamadas glía y vasos sanguíneos. Las neuronas y dendritas se encuentran en una región en forma de H llamada sustancia gris. Esta sustancia de la médula espinal contiene neuronas motoras que controlan el movimiento y las interneuronas de menor tamaño que manejan la comunicación al interior. Rodeado de la sustancia gris se encuentra la sustancia blanca. La mayoría de los axones están envueltos en una sustancia aisladora llamada mielina, la cual permite que las señales eléctricas se muevan libre y rápidamente ocupando la mayor parte de la sustancia blanca. La mielina tiene una apariencia blanquecina, por lo cual se le llama a esta sección sustancia blanca (Figura 4) (5).

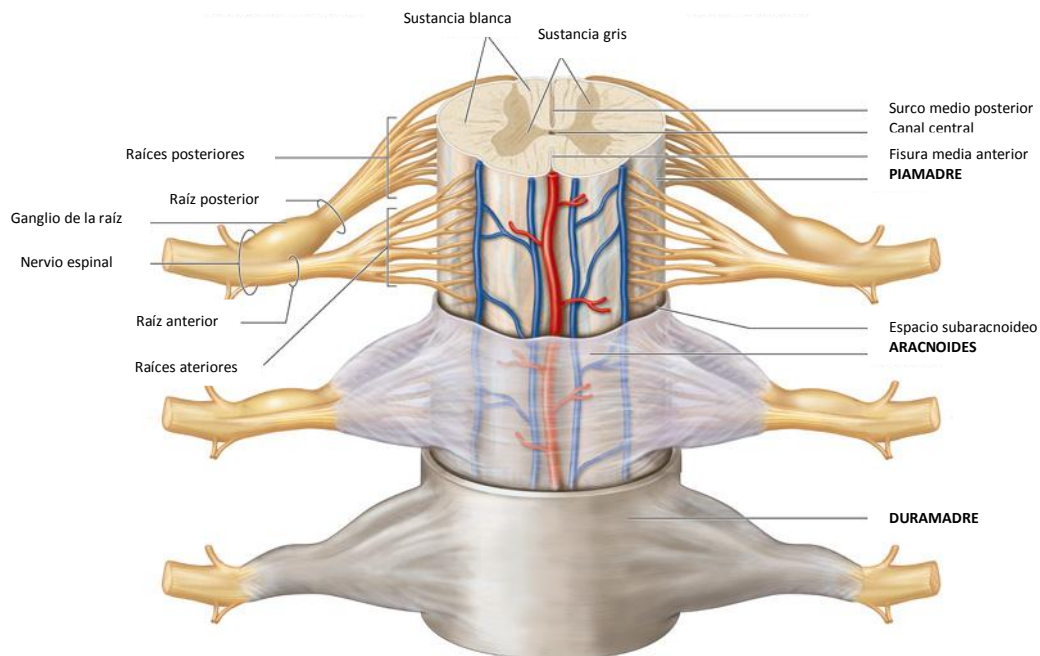


Figura 4. Estructura de la médula espinal (6).

## Columna vertebral

La columna vertebral forma el eje central del cuerpo, está compuesta de 33 vértebras: 7 cervicales, 12 torácicas, 5 lumbares, 5 sacras y 4 coccígeas; unidas por ligamentos y cartílagos. Está constituida por numerosas unidades funcionales móviles entre sí; las vértebras, los discos intervertebrales, los tendones y los músculos (6). Los huesos están alineados uno encima del otro y se extienden a lo largo del foramen creado por la unión de esas vértebras. Las vértebras están organizadas en secciones y son identificadas y enumeradas de arriba hacia abajo de acuerdo con su ubicación a lo largo de la espina dorsal. Las funciones de la columna vertebral son: proporcionar soporte estructural al tronco, rodear y proteger la médula espinal, proporcionar puntos de unión para los músculos de la espalda y para las costillas así como articular los movimientos del tronco (Figura 5) (7).

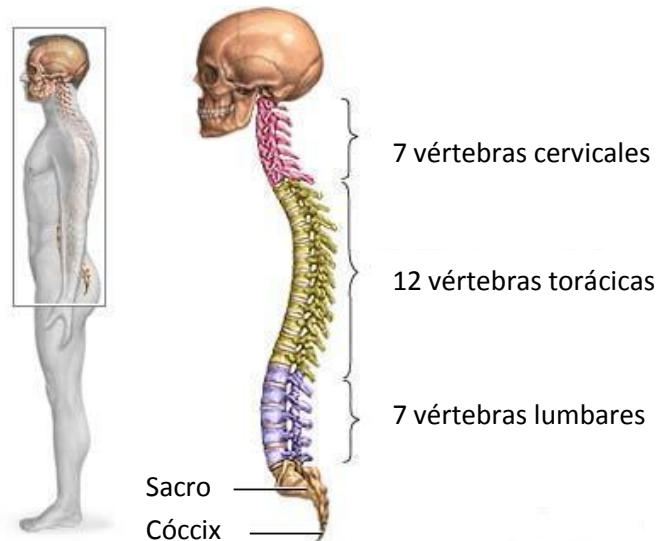


Figura 5. Columna vertebral. Se observa el posicionamiento de las vértebras, en función de sus diferentes niveles: Vértebra cervical (1-7) situada en el cuello. Vértebra torácica (1-12) parte superior de la espalda (unida a la caja torácica). Vértebra lumbar (1-5) parte inferior de la espalda. Vértebra sacra (1-5) área de la cadera. Vértebra coccígea (1-4 fusionadas) en el cóccix (6).

Las vértebras difieren en tamaño y forma, pero, en general, su estructura es parecida. Vistas desde arriba, constan de un cuerpo del cual salen 2 prolongaciones cortas y gruesas llamadas pedículos dirigidos hacia atrás, uno de cada lado, hasta unirse con las láminas que se unen posteriormente y forman el



arco vertebral o neural. Este arco cierra el agujero espinal o vertebral. Cada vértebra tiene 7 apófisis: 4 articulares, 2 para hacer la conexión con el hueso de arriba y 2 para hacerla con la de abajo; 2 transversas; 1 de cada lado donde se unen la lámina, el péndulo y 1 apófisis espinosa (Figura 6) (6).

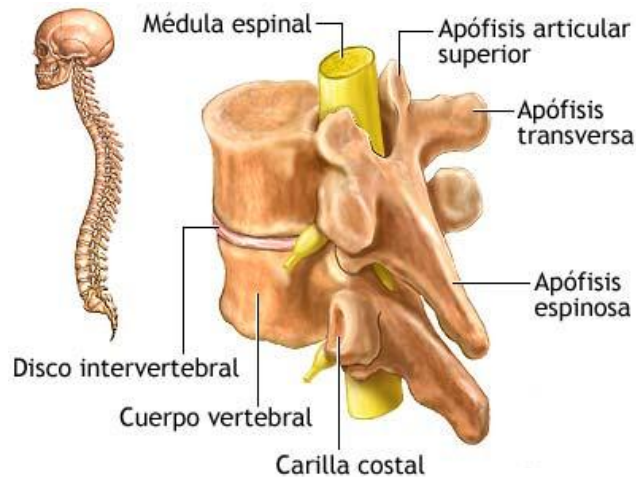


Figura 6. Vértebras espinales donde se muestran sus componentes principales (6).

## Meninges

Las meninges son tres capas de tejido conectivo que revisten a la médula espinal y el encéfalo (figura 5). Las meninges espinales rodean a la médula y se continúan con las meninges craneales, las cuales envuelven al encéfalo. La más superficial de las tres meninges espinales es la **duramadre**, compuesta por tejido conectivo denso irregular. La meninge media es una membrana avascular denominada **aracnoides** por la disposición similar a la de una tela de araña, que presentan las fibras colágenas y algunas fibras elásticas. Entre la duramadre y la aracnoides se halla el espacio subdural que contiene líquido intersticial. La más interna de las meninges es la **piamadre**, una fina y transparente capa de tejido conectivo que se adhiere a la superficie de la médula espinal y al encéfalo, está compuesta por manojos intercalados de fibras colágenas y algunas finas fibras elásticas. En la piamadre hay gran cantidad de vasos sanguíneos que abastecen de oxígeno y de nutrientes a la médula espinal. Entre la aracnoides y la piamadre se haya el espacio subaracnoideo, que contiene el líquido cefalorraquídeo (1).

## *1.2. Epidemiología de la lesión traumática de médula espinal (LTME)*

En la actualidad las enfermedades discapacitantes han cobrado mayor importancia (8). Dentro de ellas se encuentra la LTME que es un padecimiento de consecuencias devastadoras y discapacitantes ocasionado por el daño irreversible que se genera sobre la función neurológica y es considerado un problema de salud pública (9).

De acuerdo a la intensidad con la que se produce el daño, la LTME ocasiona alteraciones estructurales y funcionales que oscilan desde el bloqueo transitorio de la conducción de los impulsos nerviosos, hasta la pérdida total de las funciones motora y sensitiva por debajo del sitio dañado, en la paraplejia se afecta a miembros inferiores y en la tetraplejia se afecta a miembros inferiores y superiores (10).

Este problema afecta biosicosocialmente al individuo, quien regularmente se encuentra en etapa productiva y en muchas ocasiones resulta una carga no solamente para él mismo sino también, para la familia y la sociedad (8).

Las características epidemiológicas de los pacientes con LTME son muy similares, la mayoría de las lesiones ocurren entre las edades de 16 y 30 años (12), existe un segundo pico de edad en pacientes de edad avanzada que se lesionan a consecuencia de las caídas, esto lleva a un segundo rango de 55 a 74 años considerándose una causa alta de los ingresos hospitalarios (11). La mayor incidencia se presenta en la población masculina en una relación 4 a 1 con respecto a las mujeres (13).

Las causas de la LTME (figura 7), se deben principalmente a accidentes automovilísticos (50.4%), seguida de caídas de altura (23.8%), violencia (11.2%), accidentes deportivos (9%) y otros (5.6%) (15); sin embargo, éstas causas varían de país a país y dependen de factores sociales y económicos (11).

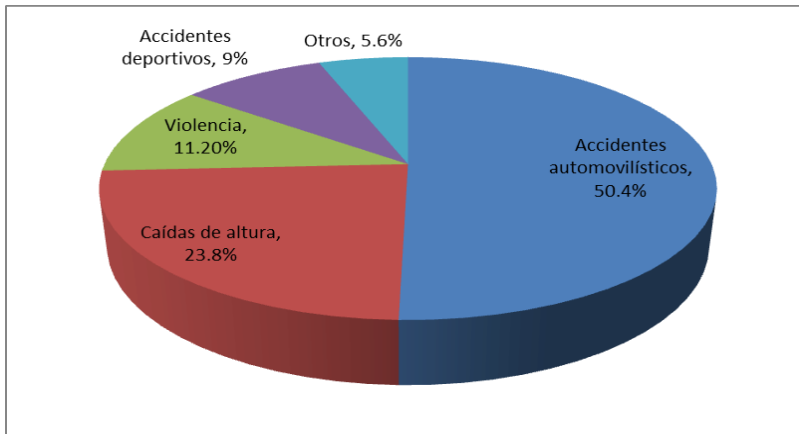


Figura 7. Causas de lesiones traumáticas de méula espinal.

En México se reportó en 1998 que la relación hombre mujer es de 6 a 1. Presentando el pico máximo de edad a los 30.1 para ambos sexos. En este mismo estudio se reportó que la incidencia de la lesión medular es de 18.1 x millón de habitantes por año (14).

Por todo lo anterior, la LTME representa un gasto económico elevado que comprende el ocasionado por el tratamiento inicial y el del manejo para reintegrar socialmente a los pacientes, incluyendo las terapias de rehabilitación, los aparatos ortopédicos, las sillas de ruedas y las adaptaciones especiales requeridas (12).

#### *1.4. Fisiopatología de la LTME*

En la actualidad el estudio sobre la fisiopatología de las lesiones medulares se ha extendido y adquiere gran importancia ya que el SNC presenta cambios irreversibles que obstaculizan la regeneración nerviosa (16).

Existen diversos problemas en una LTME, debido al daño mecánico primario, así como a los mecanismos secundarios de lesión. El daño inicial se ubica en el epicentro que induce un proceso de isquemia e inflamación que provoca una muerte neuronal primaria (17). Posteriormente, la lesión se extiende produciendo una serie de procesos autodestructivos que contribuyen al daño secundario después de una LTME, incluyendo alteraciones en la perfusión microvascular, la muerte celular necrótica y apoptótica así como la generación de radicales libres y la peroxidación de lípidos (18).

Debido a todos estos procesos, en la médula espinal dañada ocurre una secuencia temporal de cambios anatomopatológicos luego de una LTME (Figura 8), se divide en fases: aguda, subaguda y crónica (17).

##### Fase aguda

En esta fase el trauma de la médula espinal destruye la barrera hematoencefálica y los vasos sanguíneos locales, ocasionando una alteración en la microvasculatura de la sustancia gris, induciendo hemorragias petequiales. Se presenta edema debido a las células sanguíneas y las proteínas del suero que invaden el área lesionada. La destrucción de los capilares causa isquemia, así como anoxia e hipoglucemia. La necrosis así como la degeneración de la mielina de los axones dañados sigue de 8 a 24 h y trascurridas las 48 h los fagocitos sanguíneos se acumulan localmente para eliminar la mielina degenerada y otros residuos celulares. (16)

La hidrólisis de fosfolípidos causa liberación y oxidación de ácidos grasos polinsaturados así como la producción de radicales libres (19). El origen de las especies reactivas de oxígeno después de una lesión en la médula espinal se

debe a la actividad de los macrófagos sanguíneos que atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) destruida (16). Los radicales libres de oxígeno acaban con las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos la cual permite la formación de lipoperóxidos y destruyen las membranas celulares de células no dañadas (20).

#### Fase subaguda

En esta fase sobreviene la reactividad de las células gliales como consecuencia de la necrosis, la hemorragia e isquemia local posteriores al trauma medular. El tejido neural (neuronas y glía) cercano al área lesionada presenta actividad eléctrica y funcional deprimidas. Se formarán zonas de penumbra isquémicas en las que se tendrá lugar la muerte neuronal secundaria la cual es la responsable de la pérdida de la función neuronal (21).

Posteriormente se forma la “cicatriz glial”, que consiste en una acumulación de astrocitos fibrosos hipertróficos en la superficie de la lesión, denominados astrocitos reactivos. La glía reactiva representa el intento del sistema nervioso por aislarse de las influencias incontroladas del resto del organismo, reconstituyendo una nueva glía limitante o cicatriz glial y constituye el mayor obstáculo para la restitución de las conexiones lesionadas (16).

Las neuronas que han perdido su inervación original son inervadas por neuronas cercanas no dañadas, lo que en general no conduce a la recuperación de la función primitiva. Esta barrera implica un obstáculo para el restablecimiento de nuevas conexiones (21).

La activación microglial es un proceso graduado que depende de la severidad de la lesión, empieza en la zona central de la medula espinal y se extiende a la sustancia gris y blanca adyacente (22).

Además en esta fase ocurre infiltración de células inflamatorias que invaden e inducen neurofagia (23) (24) y astrofagia (25) que fagocitan el tejido muerto.

## Fase crónica

Durante la fase crónica, el proceso degenerativo de la médula espinal continúa y se extiende a lo largo del sitio de lesión primaria. La destrucción neuronal se extiende en tiempo y espacio. Se conforman zonas de penumbra isquémica en las que tendrá lugar la muerte neuronal secundaria donde se formarán las cavidades y los quistes, formados por glía reactiva (17).

El trauma causa muerte, tanto de neuronas como de células gliales, destrucción de vasos sanguíneos y lesión de tractos axonales, debido a que las neuronas muertas no son remplazadas (21).

Los axones pierden mielina y la desmielinización se incrementa después de dos semanas (26), debido al efecto de las células inflamatorias que entran en una segunda fase de migración. Algunas fibras presentan degeneración walleriana y pérdida de diámetro axonal (27), causando un déficit neurológico permanente.

## EVENTOS DE DAÑO DESPUÉS DE UNA LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL

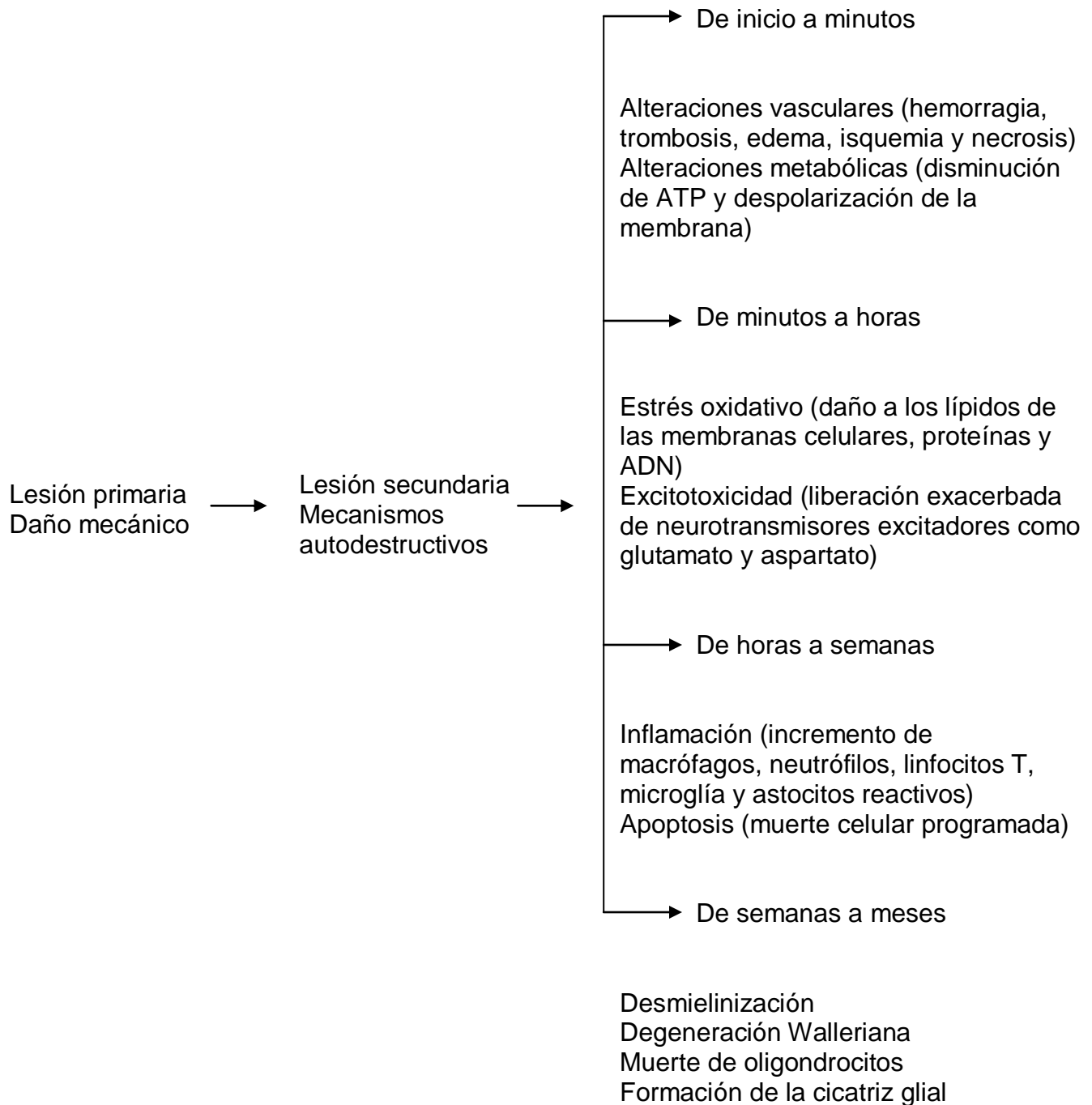


Figura 8. Se muestran los principales eventos de daño secundario que se desencadenan después de una lesión traumática de la médula espinal (modificada 28).

## 1.5. Mecanismos de daño secundario en la LTME

### **Desequilibrio electrolítico**

Después de una LTME se produce una desregulación iónica, que incrementa la concentración de los iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) y el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelulares y disminuye la concentración de los iones de potasio ( $\text{K}^+$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ); esto lleva a una despolarización de la membrana neuronal y al acarreo de moléculas de agua asociadas con los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  lo que produce edema (29)(30).

La despolarización iónica de las neuronas sobrevivientes genera que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje se abran, e ingresen grandes cantidades del ión a la célula; activando diferentes enzimas como: proteasas, endonucleasas y lipasas (31). Las proteasas y fosfolipasas destruyen los componentes celulares, entre ellos la mielina, con lo cual se favorece el proceso de desmielinización y con ello la falla en la conducción del impulso nervioso (32).

### **Anomalías vasculares**

Las alteraciones vasculares y la isquemia son un aspecto importante en la lesión secundaria. La alteración mecánica de la microvasculatura causa hemorragia petequiral y trombosis intravascular, que en combinación con vasoespasmo en los vasos intactos y edema en el sitio de la lesión puede conducir a la hipoperfusión profunda local e isquemia (33).

Las fosfolipasas actúan sobre el ácido araquidónico; el cual a través de la activación de prostaglandinsintasa se metaboliza en sustancias vasoactivas como prostaglandinas (PGs), tromboxanos  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) y leucotrienos (Lts); las cuales tienen un efecto vasoconstrictor que incrementa la isquemia en la sustancia gris por falta de oxígeno y glucosa. Los cambios en el flujo sanguíneo y la hipoperfusión postraumática afectan principalmente a la sustancia gris e inducen muerte neuronal primaria (34). Después del periodo de isquemia, la médula espinal es sometida a un periodo de reperfusión donde existe un aumento significativo de oxígeno, en el cual los radicales libres generados conducen a un daño secundario (35).



### **Excitotoxicidad**

La liberación de glutamato y la acumulación de este se produce rápidamente después de la LTME en respuesta a la isquemia y la despolarización de la membrana. El glutamato es el neurotransmisor excitador más prevalente en el SNC y juega un papel predominante en la transmisión sináptica del cerebro, que actúa sobre los receptores ionotrópicos y metabotrópicos del tipo N-Metil-D-aspartato (NMDA) y ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA)/kainato a través de los cuales pasan  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  (36).

Después de una LTME las neuronas que mueren vierten su contenido de glutamato al espacio extracelular en grandes cantidades generando un estado excitotóxico (37), que lleva a una excesiva estimulación de los receptores NMDA y AMPA que trae como consecuencia un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, (38) que puede desencadenar una multitud de procesos dependientes de calcio, alterando así el metabolismo celular. Estos procesos incluyen la activación de enzimas líticas, tales como la calpaína, fosfolipasa  $A_2$ , y lipooxigenasa, la generación de radicales libres y la desregulación de la fosforilación oxidativa que conduce a la muerte apoptótica de las células (18).

### **Radicales libres y peroxidación lipídica**

La hidrólisis de los fosfolípidos causa la liberación de los ácidos grasos polinsaturados así como la producción de especies reactivas de oxígeno. En la médula espinal lesionada, la muerte eritrocitaria provee una fuente de hierro que cataliza la formación de éstos radicales libres (16) que pueden causar la oxidación progresiva de los ácidos grasos en las membranas celulares (peroxidación lipídica), este proceso se propaga a través de la superficie de la célula (36).

Este estrés oxidativo puede llegar a desactivar enzimas clave en la cadena respiratoria mitocondrial, alterar el ADN y las proteínas asociadas al ADN, que pueden llegar a inducir el colapso metabólico y la posterior muerte necrótica y apoptótica de la célula (18).

## Respuesta inflamatoria

La inflamación es una defensa universal y una respuesta reparadora a la lesión tisular (40); esta respuesta implica componentes celulares, tales como neutrófilos, macrófagos y células T, y los componentes no celulares, citocinas, prostaglandinas y complemento. Después de una LTME, el sitio de la lesión es rápidamente infiltrado por la transmisión sanguínea de neutrófilos, que secretan enzimas líticas y citocinas que pueden llegar a dañar los tejidos locales (41). La liberación de mediadores proinflamatorios como las interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6), el factor de necrosis tumoral (TFN  $\alpha$ ) y proteínas inflamatorias de los macrófagos (MIP)-1 $\alpha$  y  $\beta$  también pueden contribuir al daño tisular (Figura 9) (42)(43).



Figura 9. Representación del daño secundario después de una LTME. El traumatismo inicia con una serie de procesos interrelacionados que contribuyen a la muerte necrótica y apoptótica de las células dentro de la médula espinal (modificada 18).

## 1.6. Generalidades del estrés oxidativo

### 1.6.1. Estrés oxidativo

En los seres vivos existe un equilibrio interno entre la producción de radicales libres y la acción de los antioxidantes. La pérdida del balance entre condiciones oxidantes y defensas antioxidantes puede deberse a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, a una disminución en los sistemas antioxidantes, o a una combinación de estos factores. A tal condición se le denomina estrés oxidativo (Figura 10) (44).

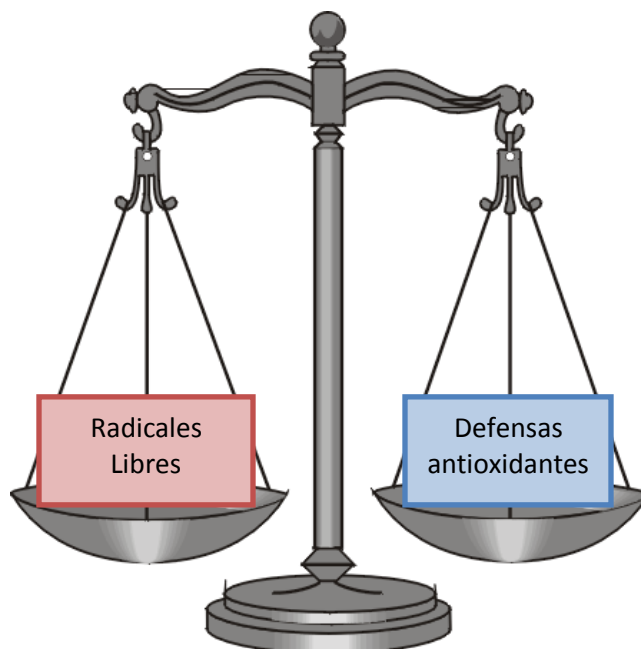


Figura 10. Representación del equilibrio redox (44).

Este estado se caracteriza por un aumento en los niveles de radicales libres y especies reactivas, que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidantes causando daño y muerte celular. El daño oxidativo tiene como diana todo tipo de moléculas biológicas, incluyendo lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ADN; lo que conduce a fenómenos de peroxidación lipídica, oxidación y fragmentación de proteínas e hidratos de carbono, mutagénesis, carcinogénesis y lesión de las membranas celulares (45).

En la actualidad el estrés oxidativo es considerado un factor clave en diversas enfermedades crónicas y desórdenes neurodegenerativos (46).

### **1.6.2. Radicales libres y especies reactivas**

Los radicales libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado (aquél que ocupa una órbita atómica o molecular por sí mismo), pueden existir de forma independiente y debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, son generalmente muy reactivos. Esta reactividad es la base de su toxicidad y de su corta vida media (45).

La generación de RL no se relaciona siempre con su toxicidad debido a que la función que desarrollan presenta dos caras opuestas, por un lado actúan como mediadores y reguladores a concentraciones fisiológicas, mientras que a concentraciones elevadas pueden actuar como potentes oxidantes citotóxicos (47).

En los sistemas vivos se generan muchos tipos de radicales libres, siendo los más conocidos los radicales de oxígeno. Se utiliza el término Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) para referirse a las especies derivadas del oxígeno. En la naturaleza también se pueden encontrar las Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN), del Cloro (ERCl) y del Bromo (ERBr) (48).

Nuestro organismo está expuesto a una gran variedad de ERO y ERN que pueden generarse a partir de fuentes endógenas, relacionadas con el metabolismo de oxígeno y con las diversas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunológico, o de fuentes exógenas, como el tabaco, la contaminación del aire, la radiación ultravioleta (UV), el ozono y ciertos medicamentos (49).

Aunque la exposición a las ERO procedentes de fuentes exógenas es muy elevada, la exposición a fuentes endógenas es mucho más importante y extensa, debido a que es un proceso que se da en forma continua en las células de nuestro organismo a lo largo de la vida (50).

### 1.6.3. Especies reactivas de oxígeno

El oxígeno ( $O_2$ ) es indispensable para los organismos aerobios, sin embargo, a altas concentraciones o bajo ciertas condiciones llega a ser tóxico. La toxicidad del  $O_2$  se explica debido a la formación de las ERO.

Estas especies derivadas del  $O_2$  son altamente reactivas, la mayor parte del  $O_2$  que consumen los organismos aerobios se reduce a  $H_2O$  por el complejo de la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial. Esta reducción parcial del oxígeno molecular conduce a la generación de ERO (51).

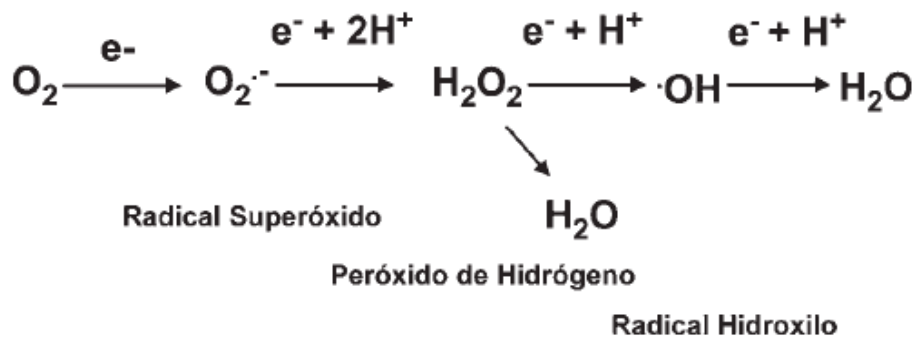


Figura 11. El  $O_2$  posee dos electrones desapareados; la adición de un electrón al oxígeno produce superóxido; de dos electrones produce peróxido de hidrógeno y de tres electrones produce el radical hidroxilo, altamente reactivo (73).

#### Oxígeno singulete

El oxígeno singulete ( $^1O_2$ ) se forma cuando uno de los electrones desapareados del oxígeno absorbe energía e invierte su rotación. Cuando esto sucede, se aparea con el otro electrón libre. El  $^1O_2$  es muy reactivo y es capaz de reaccionar con muchos compuestos celulares como membranas plasmáticas, ADN, proteínas, y lípidos (52).

#### Anión superóxido

El anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) se forma cuando el  $O_2$  capta un electrón. Esto ocurre en todos los organismos que respiran, ya que una pequeña parte de los electrones que pasan por la cadena respiratoria salen de ésta y son captados por el  $O_2$ . El

$O_2^{\cdot-}$  también puede ser producido por enzimas como la NADPH oxidasa, xantina oxidasa (XO), lipooxigenasa (LOX) y la  $P_{450}$  oxidasa. El  $O_2^{\cdot-}$  es poco reactivo, reacciona con las quinonas, los fenoles, hierro libre o unido a algunas proteínas y también con otros radicales (51).

### Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se forma por la actividad enzimática de la superóxido dismutasa. Aunque no es un radical libre, tiene una gran lipofilicidad que le permite atravesar las membranas celulares y reaccionar con el anión superóxido en presencia de metales de transición, para generar el radical hidroxilo. Por esta razón se le considera un oxidante importante en las células de los organismos aerobios (53).

### Radical hidroxilo

El radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) es altamente reactivo causando más daño que cualquier otra ERO, pero es muy inestable, por lo que su tiempo de vida es muy corto e interactúa con las moléculas más cercanas a él. La formación del  $OH^{\cdot}$  se puede lograr fácilmente por la reacción de Haber-Weiss (Figura 13) entre el  $O_2^{\cdot-}$  y el  $H_2O_2$  catalizada por un metal de transición o a través de la reacción de Fenton (Figura 12) cuando el  $H_2O_2$  acepta un electrón desapareado de un metal de transición como el  $Fe^{2+}$  o el  $Cu^{2+}$ , entonces se fragmenta y forma el  $OH^{\cdot}$  y el ión  $OH^-$  (51).

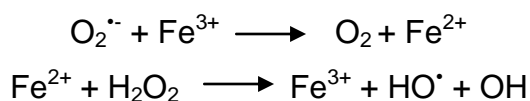


Figura 12. Reacción de Fenton (59).

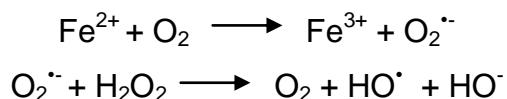


Figura 13. Reacción de Haber-Weiss (59).

### 1.6.4. Peroxidación lipídica

Una de las principales blancos de los procesos de oxidación inducidos por los radicales libres son los ácidos grasos poliinsaturados presentes, mayoritariamente, en las membranas celulares. El daño a los lípidos consta de tres etapas, iniciación, propagación y terminación (54). La reacción de oxidación se inicia cuando el ácido graso blanco pierde un átomo de hidrógeno convirtiéndose así en un radical lipídico. Este nuevo radical se reorganiza molecularmente para incrementar su estabilidad y reacciona rápidamente con el oxígeno, creando un radical peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ ). Este radical peroxilo dará lugar a un hidroperóxido lipídico y un nuevo radical lipídico por sustracción de un átomo de hidrógeno de un segundo ácido graso y, así sucesivamente en lo que constituye la etapa de propagación. Esta cadena de reacción se conoce como peroxidación lipídica (LP) y se va prolongando por el paso continuo de un electrón desapareado de una molécula a otra. La reacción en cadena finalizará cuando se cumpla alguna de las siguientes condiciones: se consuma una de las moléculas reactivas, es decir, los ácidos grasos o el oxígeno; se forme un radical relativamente poco reactivo; o dos radicales al reaccionar formen un par no radical. Entre los productos formados durante la peroxidación lipídica incluyen el 4-hidroxi-2-alquenal y el malonaldehído (MDA); este último presenta una elevada capacidad de reaccionar con las bases de ADN, por lo que puede causar lesiones mutagénicas que pueden estar implicadas en la patogenia de varias enfermedades (55).

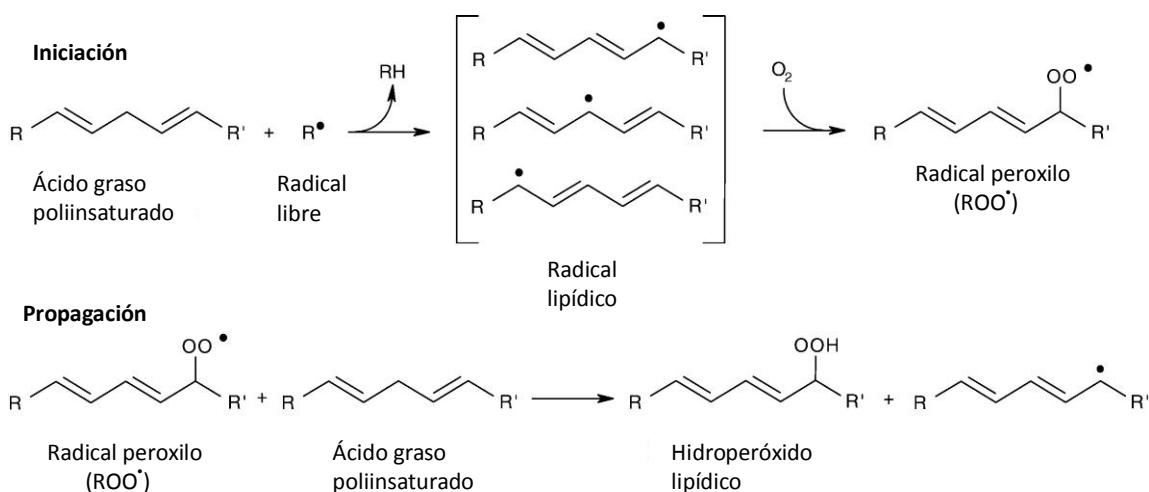


Figura 14. Proceso de peroxidación lipídica iniciada por el radical  $\text{R}^\bullet$  (56).

### 1.7. Defensas antioxidantes

Un antioxidante es aquella molécula capaz de prevenir y/o evitar la oxidación de otra molécula, ya sea por la interacción y estabilización de especies reactivas o por la transformación de éstas en configuraciones más estables y de reactividad reducida. Su función homeostática es de gran importancia, ya que mantienen a las especies reactivas por debajo de los umbrales citotóxicos (57).

Los mecanismos antioxidantes son muy diversos y en cada organismo, célula o tejido predominan algunos sobre otros. Hay compuestos antioxidantes con varias funciones (51). Estos sistemas de detoxificación presentes en la célula pueden ser de tipo enzimático y no enzimático (58).

#### Sistemas enzimáticos

Los antioxidantes enzimáticos constituyen la primera línea de defensa antioxidante y previenen el daño oxidativo interaccionando directamente con las ERO. Reaccionan con las diversas especies reactivas, actúan como catalizadores, solo se necesita que estén presentes en pequeñas cantidades para que ejerzan su protección y son reciclados eficientemente después de su actuación (56). La enzimas que forman este sistema antioxidante enzimático se detallan a continuación (59)(60).

- Superóxido dismutasa (SOD): es una metaloenzima presente en todos los organismos aerobios que cataliza la conversión del radical superóxido en peróxido de hidrógeno (Figura 15), que posteriormente será convertido en agua por la catalasa.

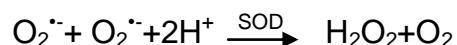


Figura 15. Reacción catalizada por la Superóxido dismutasa (SOD) (62).

- Catalasa (CAT): es una enzima ampliamente distribuida en bacterias aerobias, plantas y animales, localizada en los peroxisomas y que



reacciona con el peróxido de hidrógeno para formar agua y oxígeno molecular; con donadores de hidrógeno como metanos, etanol y fenoles presentan actividad peroxidasa (Figura 16).

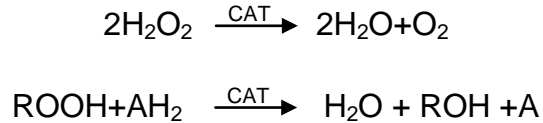


Figura 16. Reacciones catalizadas por la enzima Catalasa (CAT) (62).

- Glutación peroxidasa (GPx): es una enzima dependiente de selenio que cataliza la reducción de hidroperóxidos (ROOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), utilizando el glutación (GSH) como donador de electrones. El glutación oxidado que se genera (GSSG) puede ser reducido a GSH por la acción de una glutación-reductasa (GRed) dependiente de NADPH (Figura 17).

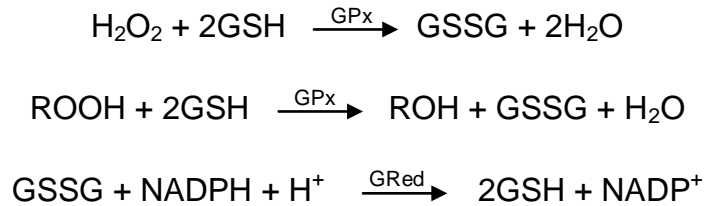


Figura 17. Reacción catalizada por la Glutación peroxidasa (GPx) y la Glutación reductasa (GRed) (68).

### Sistemas no enzimáticos

El sistema antioxidante no enzimático constituye la segunda línea de defensa y está constituido por antioxidantes de bajo peso molecular, que forman un numeroso conjunto de compuestos capaces de prevenir el daño oxidativo por la interacción directa o indirecta con las ERO (50).

El mecanismo de acción indirecto implica principalmente la quelación de metales de transición para evitar su participación en reacciones tipo Fenton o Haber-Weiss. Entre los compuestos que actúan por esta vía se encuentran proteínas como la ceruloplasmina, la transferrina, la lactoferrina y la albúmina (61) (62).

Las moléculas que actúan de forma directa sobre las especies reactivas lo hacen por medio de la transferencia de electrones o por medio del secuestro de radicales, evitando así que ataquen las moléculas diana. Además, suelen poseer también capacidad de quelación de metales (actividad indirecta). Por su pequeño tamaño, pueden atravesar las membranas celulares y localizarse cerca de las posibles dianas biológicas; además, la propia célula puede regenerarlas y regular sus concentraciones. Estas moléculas, aunque normalmente actúan como antioxidantes, desarrollan otras funciones biológicas en la célula. Entre estas moléculas destacan:

- El tripéptido glutatión (GSH) en su forma reducida, es el antioxidante que se encuentra en mayor concentración dentro de la célula. Actúa como cofactor de la GPx para detoxificar  $H_2O_2$  y es capaz de interactuar directamente con ERO como  $\cdot OH$ ,  $ROO\cdot$ ,  $RO\cdot$ ,  $HClO$  y  $O_2^{\cdot -}$ . También actúa como agente quelante, y en diversos procesos metabólicos como la comunicación celular o la degradación de proteínas (63).
- La bilirrubina y el ácido úrico se han propuesto como antioxidantes al unirse a metales e impedir reacciones tipo Fenton. El ácido úrico también es eficiente protegiendo contra el ozono ( $O_3$ ), el  $NO\cdot$  y especies reactivas de nitrógeno (ERN) (64).
- La histidina y otros compuestos de la misma familia eliminan ERO por secuestro directo de radicales  $\cdot OH$ ,  $ROO\cdot$ ,  $RO\cdot$ , uniéndose al  $H_2O_2$ , eliminando  $O_2^{\cdot -}$  o uniendo metales de transición (50).
- La hormona melatonina, que atrapa una gran variedad de ERO además de estimular la síntesis de importantes enzimas antioxidantes (SOD, GPx y GRed) (65).

### 1.8. El papel antioxidante del glutatión

El glutatión (GSH),  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina, es un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina (66) es el tiol de bajo peso molecular más abundante tanto en células vegetales como animales, su concentración intracelular oscila entre 0.5-10 mM.

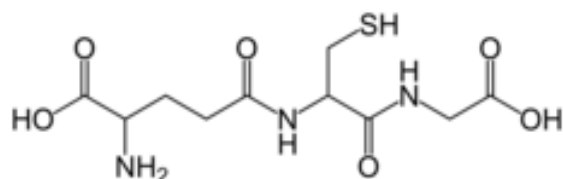


Figura 18. Estructura del glutatión (GSH) (66).

Esta molécula juega un rol importante en diferentes procesos celulares (Figura 19), incluyendo la síntesis del precursor desoxirribonucleótido del ADN, el procesamiento metabólico de ciertos compuestos endógenos como los estrógenos, prostaglandinas y leucotrienos, así como la inactivación de fármacos (67).

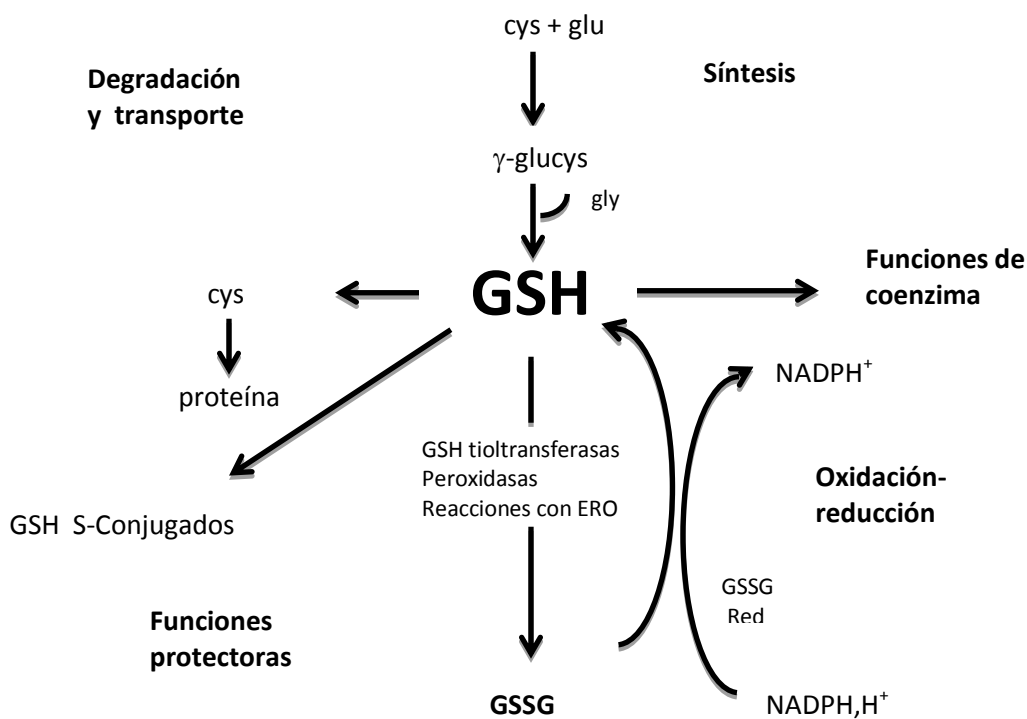


Figura 19. Metabolismo del glutatión (modificada 66).

El GSH y el metabolismo asociado al GSH proveen la mayor línea de defensa para la protección celular ante diferentes tipos de estrés, incluido el oxidante (68). El GSH elimina radicales libres, reduce peróxidos y se puede conjugar con compuestos electrófilos (69). El GSH es particularmente efectivo contra el radical hidroxilo, el cual es altamente tóxico y no se conoce una protección enzimática contra él (70).

El GSH desempeña un papel múltiple en la protección contra las especies reactivas de oxígeno, electrófilos y xenobióticos. Puede reaccionar de forma no enzimática con el carbono central de radicales orgánicos así como también es donador de electrones en la reducción enzimática del  $H_2O_2$  y peróxidos orgánicos, reacción catalizada por la glutatión peroxidasa (69). El glutatión también es utilizado por la enzima glutatión transferasa para detoxificar electrófilos (71).

En el organismo el GSH puede existir de dos formas, como monómero reducido (GSH) y como dímero oxidado (glutatión disulfuro o GSSG). La forma reducida es la forma predominante en las células, incluso en condiciones de estrés. Sin embargo la reacción entre GSH/GSSG es vital para el equilibrio redox de la célula (69).

La detoxificación de las especies reactivas de oxígeno tanto por vía enzimática (glutatión peroxidasa) como no enzimática dan como resultado la producción de GSSG, que carece de función en la célula por lo que en ocasiones es desechado, lo que provoca una disminución en el glutatión total, sin embargo, la forma más común de reducir el GSSG es la vía glutatión reductasa, la que genera el GSH en una reacción dependiente de NADPH (72).

### *1.9. El estrés oxidativo en la LTME*

El SNC juega un papel de gran importancia para el mantenimiento de la homeostásis y funciones de los animales, sin embargo, sus características bioquímicas y citológicas lo convierten en un tejido vulnerable a la acción de numerosos agentes citológicos. Después de una LTME se genera estrés oxidativo, debido a que la médula espinal se somete a un periodo de reperfusión durante el cual hay un aumento significativo de oxígeno lo que genera especies reactivas derivadas del oxígeno molecular (73).

Este estrés oxidativo también puede desactivar enzimas clave de la cadena respiratoria mitocondrial, alterar el ADN y proteínas asociadas al ADN por lo cual se induce un colapso metabólico y la subsiguiente necrosis o apoptosis de la célula (74).

### *1.10. Peroxidación de lípidos durante la LTME*

La peroxidación lipídica ha sido implicada entre los mecanismos de numerosos trastornos, tales como enfermedades cardiovasculares, cáncer, y enfermedades neurodegenerativas, ya que alteran las características químicas y la organización física de las membranas celulares que inducen la pérdida funcional (75).

El proceso de peroxidación de lípidos, es muy importante en la fisiopatología de la LTME, porque el SNC es susceptible al daño producido por radicales libres, debido a que las membranas celulares del SN son ricas en colesterol y ácidos grasos poli-insaturados, especialmente las vainas de mielina cuya composición lipídica es aproximadamente del 80%, siendo así blanco de radicales libres (76).

Los radicales libres pueden causar una oxidación progresiva de ácidos grasos en las membranas celulares (peroxidación lipídica), por lo que el proceso de oxidación genera más radicales libres que pueden propagarse a través de la

superficie de la célula (77). Las ERO acaban con las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, lo cual permite la formación de lipoperóxidos que destruyen las membranas celulares de células no dañadas (figura 20) (16).

Los productos de estas reacciones oxidativas, tales como malonaldehído, aumentan rápidamente después de una lesión en modelos de LTME en animales (78).

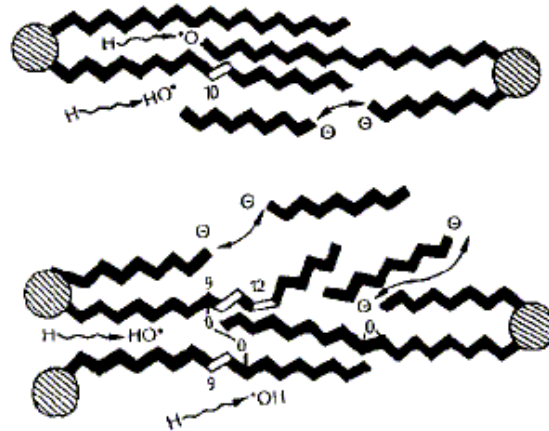


Figura 20. Representación de la degradación oxidativa de los lípidos que se produce cuando las especies reactivas de oxígeno reaccionan con ácidos grasos poliinsaturados, dando como resultado interrupciones de la integridad de la membrana celular (79).

### 1.11. Estrategias neuroprotectoras después de una LTME

Actualmente, no se cuenta con estrategias terapéuticas efectivas para restablecer la función neurológica normal, debido a la complejidad para regular los mecanismos de daño secundario, así como a la baja capacidad de regeneración espontánea que se observa en el SNC maduro (9).

Las estrategias de neuroprotección son aquellas enfocadas en detener y/o evitar los mecanismos fisiopatológicos que se desencadenan después de una LTME. Los fármacos son los que principalmente se emplean para detener el proceso de autodestrucción del SNC (Tabla 1).

Tabla I. Se muestran diferentes tratamientos enfocados a proteger a las células neuronales posterior a una LTME.

<b>Agente</b>	<b>Efecto</b>
Corticosteroides (metilprednisolona)	Antiinflamatorio, reduce la formación de edema, antioxidante, inhibición de la fosfolipasa A <sup>2</sup> . Tratamiento no benéfico.
21-aminoesteroide (lazaroides) U-74006F mesilato de tirilazad	Antioxidante (inhibe la peroxidación). Mantiene los niveles de vitamina E. Previene la disminución del flujo sanguíneo.
Antagonistas de receptores opioides (naloxona)	En pacientes no tiene efectos benéficos. En modelos animales favorece la recuperación funcional y disminuye la producción de superóxido en la microglia.
Gangliósidos [monosialotetrahexosilgangliósido (gangliósido GM-1)]	Incrementa la velocidad de crecimiento neurítico. Estimula la regeneración axonal. Atenúa la liberación de aminoácidos excitadores.
Regulación de los canales de calcio (Ca <sup>2+</sup> ) (nimodipina)	Bloquea los canales de calcio (Ca <sup>2+</sup> ), reduce la isquemia postraumática. Tratamiento no benéfico.

Antagonistas de receptores NMDA y no-NMDA [(Dizocilpina (MK-801) NBQX, riluzol]	Inhibe la excitotoxicidad originada después de una lesión traumática de médula espinal (LTME).
Moduladores de la respuesta inflamatoria e inmunosupresores [Naloxona, iloprost, mesilato de gabexate, ciclosporina-A, tacrolimus (FK-506)]	Disminuye la respuesta inflamatoria. Inhibe la activación de leucocitos. Disminuye la lipoperoxidación. Se incrementa la velocidad de regeneración.
Antioxidantes (mexilatin, OPC-14117, estobadin de pirudoindol)	Disminuye la lipoperoxidación. Preserva a las motoneuronas. Previene la oxidación de grupos SH.
Inhibidores de la sintasa del óxido nítrico (SON) [N(G)-monometil-L-arginina (LNMMA) NG-nitro-L-arginina metilester (L-NAME), aminoguanidina, 7-nitroindasol]	Acelera la recuperación motora
Clembuterol	Agonista de receptores $\beta$ 2-adrenérgicos. Estimula la síntesis de diversos factores tróficos.
Clometiazol	Incrementa la actividad de los receptores GABAérgicos, mejor recuperación motora.
Sulfato de magnesio	Disminuye la lipoxidación. Mejora la transmisión eléctrica somatosensorial.
4-aminopiridina	Inhibe los canales de potasio ( $K^+$ ). Favorece la recuperación neurológica.

(Modificado 9)



## 1.12. Dapsona

La Dapsona (4-4'-diaminodifenilsulfona) su estructura química es la más simple de las sulfonas, una sulfona que se une a dos átomos de carbono.

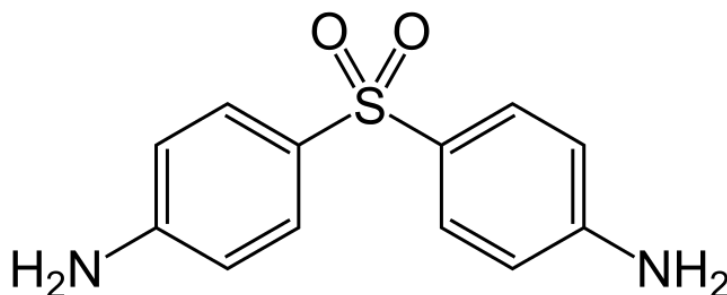


Figura 21. Estructura química de la dapsona (81).

### FARMACOCINÉTICA

**Absorción:** Se absorbe en el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad del 86% (80). La farmacocinética es similar en adultos y en niños (81).

**Distribución:** La dapsona se une al 75% de las proteínas, su metabolito monoacetilado se une completamente a las proteínas. Se distribuye en todo el organismo incluyendo la piel, el hígado, los riñones y los eritrocitos. La dapsona cruza la barrera hematoencefálica y la placenta, asimismo, se ha encontrado en la leche materna (82).

**Metabolismo:** Después de su absorción en el tracto gastrointestinal, la dapsona es transportada a través de la circulación portal al hígado donde es metabolizado vía acetilación o N-hidroxilación. La hidroxilación da como producto una hidroxilamina, un metabolito tóxico producido por el citocromo P-450, mientras que la acetilación por la N-acetiltransferasa produce dos metabolitos no tóxicos que son la monoacetildapsona y la diacetildapsona (81).

**Excreción:** Cerca del 85% de la dapsona se excreta a través de la orina, principalmente como glucoronidos, y alrededor del 10% se elimina por medio de la bilis (83). El 50% de la dapsona se elimina 24 h después de ser administrada (84), sin embargo, la excreción urinaria de la dapsona puede disminuir mediante la

administración conjunta de probenecid (85) y aumentar con la administración de rifamicina (86).

## FARMACODINAMIA

**Acción antiinflamatoria:** La dapsona interfiere con la quimiotaxis y la migración de los neutrófilos (87) y con la adhesión de estos al endotelio vascular al inhibir a la integrina  $\beta 2$  (CD 11b7CD18) (88), interfiere también con la activación y la función de la proteína G (tipo Gi), que inician la cascada de segundos mensajeros para el estímulo quimiotáctico, esta inhibición suprime a su vez el reclutamiento de neutrófilos, la producción de especies reactivas de oxígeno y la secreción de sustancias tóxicas (89).

**Acción antioxidante:** Se sabe que las especies reactivas de oxígenos son bactericidas, pero también dañan el tejido adyacente incrementando los procesos de destrucción (90). El ácido hipocloroso es un potente oxidante que es producido por la enzima mieloperoxidasa (MPO) una hemo-proteína localizada en los neutrófilos. El ácido hipocloroso también se sintetiza por la enzima peroxidasa de eosinófilos. Se ha comprobado que la dapsona administrada en dosis terapéuticas, tiene la capacidad de inhibir a la MPO (12), ya que se une de manera irreversible a la MPO, modificando la estructura química del sitio activo (91). La peroxidasa de los eosinófilos es igualmente sensible a la inhibición por dapsona que la MPO (92), por estas razones la dapsona protege a las células del daño generado por los neutrófilos y los eosinófilos, directamente por la inhibición de la generación de sustancias tóxicas y especies reactivas de oxígeno (93).

Por otra parte se ha demostrado que la dapsona tiene efecto neuroprotector contra los efectos de agonistas de los receptores para glutamato (94), neurotransmisor implicado en el daño secundario generado después de una LTME (95). El tratamiento con dapsona disminuye la cantidad de tejido dañado en el epicentro de la lesión y promueve la recuperación funcional en animales con LTME por contusión (96).

### 1.13. Probenecid

El probenecid o ácido p-(di-n-propilsulfamoil) benzoico se desarrolló inicialmente con el objetivo de reducir la excreción renal de los antibióticos, específicamente penicilina y así aumentar sus niveles en suero (97).

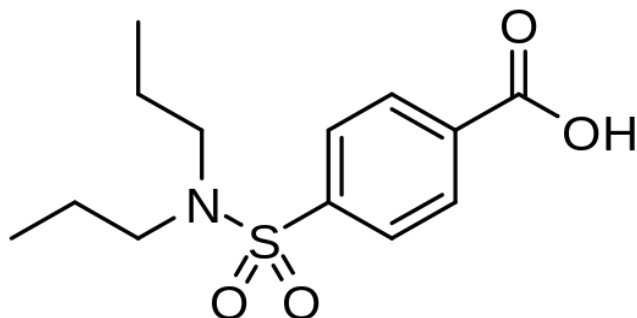


Figura 22. Estructura química del probenecid (97).

### FARMACOCINÉTICA

El probenecid es un fármaco insoluble en agua, que cuando se administra por vía oral, se absorbe casi completamente en el torrente sanguíneo a través del tracto intestinal donde se une fácilmente a proteínas plasmáticas, principalmente a albúmina (98). Cuando se administra por vía intravenosa, debe ser administrado a través de goteo continuo, ya que una sola inyección causa irritación en la piel (99). El probenecid tiene un rango terapéutico muy amplio que va desde 250 mg hasta 3 g por día (100). Cuando se administra como complemento con antibióticos, la dosis terapéutica es de 1-2g por día y se administra antes de los antibióticos.

El probenecid tiene una vida media en suero de aproximadamente 4-6 h y es metabolizado por el hígado a través de la oxidación de sus cadenas de alquilo secundarias y la conjugación de glucorónido (101).

Los metabolitos del probenecid tienen una menor afinidad a proteínas, son menos solubles en lípidos, y son rápidamente excretados por el riñón (102). La concentración sérica del probenecid es altamente dependiente de la dosis, con una dosis terapéutica estándar está entre 35.3 y 69.6mg/mL.

Se ha considerado que tiene un perfil de toxicidad mínima o nula (103).

## FARMACODINAMIA

**Acción uricosúrica:** Actúa disminuyendo la reabsorción de ácido úrico en el túbulo renal. Con lo cual aumenta la eliminación de ácido úrico, disminuyendo el depósito de uratos y promoviendo la reabsorción de los ya formados (104).

Estudios anteriores han demostrado la capacidad del probenecid para actuar conjuntamente con ácido quinurénico y tener un efecto neuroprotector, bloqueando la salida de ácidos orgánicos del espacio extracelular neuronal disminuyendo la neurotoxicidad inducida con la administración de ácido quinolínico. Este bloqueo impide la acción tóxica del ácido quinolínico al inhibir su unión al receptor de NMDA, antagonizando así la acción tóxica del ácido quinolínico en estriado de rata, además de tener una mejoría funcional e inhibir el agotamiento de GABA (105, 106).

La excreción urinaria de la dapsona puede disminuir mediante la administración conjunta de probenecid (85), por lo cual las concentraciones terapéuticas de la dapsona podrían mantenerse por un periodo de tiempo mayor y ejercer un efecto neuroprotector más eficaz. Estudios anteriores han reportado que la dapsona administrada en concentraciones altas puede generar metahemoglobinemia, por lo cual se busca administrar una menor cantidad de dapsona y así evitar las reacciones adversas de esta.

El probenecid puede tener un nuevo futuro como una herramienta de investigación, y tal vez como agente clínico en neurología y cardiología (97).

## JUSTIFICACIÓN

La LTME es un padecimiento de consecuencias devastadoras y discapacitantes ocasionado por el daño irreversible que se genera sobre la función neurológica y es considerado un problema de salud pública.

Actualmente no se cuenta con una estrategia terapéutica efectiva para restablecer la función neurológica; debido a la complejidad para detener la cascada de eventos fisiopatológicos que se presentan después de una LTME.

Como ya se mencionó anteriormente la LTME provoca muerte neuronal que ha sido asociada con un incremento en la producción de ERO, además, la actividad de sistemas antioxidantes como el glutatión es particularmente importante como mecanismo de defensa endógeno contra el daño inducido por los radicales libres.

Se ha reportado de manera reciente el efecto neuroprotector de la dapsona en modelos experimentales de infarto cerebral y LTME en ratas. Por otra parte el probenecid es un fármaco que se emplea para aumentar la eliminación de ácido úrico (uricosúrico), sin embargo, en un estudio previo se demostró su capacidad para bloquear la salida de ácidos orgánicos al espacio extracelular cerebral, por lo que la administración conjunta de éstos fármacos podrían tener un efecto neuroprotector en un modelo de LTME en ratas y disminuir el estrés oxidativo generado por el daño.

Con base en esta información se propone evaluar el efecto antioxidante de la dapsona administrada sola o en combinación con el probenecid en un modelo de LTME en ratas con la finalidad de buscar terapias neuroprotectoras eficaces.

## HIPÓTESIS

Si la dapsona regula el estrés oxidativo entonces se observará una disminución en la lipoperoxidación y un incremento en la cantidad de glutatión reducido en un modelo de LTME en ratas.

Si la dapsona administrada en combinación con el probenecid regula el estrés oxidativo entonces se observará una disminución en la lipoperoxidación y un incremento en la cantidad de glutatión reducido en un modelo de LTME en ratas.

## OBJETIVOS

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto antioxidante de la dapsona administrada sola y en combinación con probenecid en un modelo de LTME en ratas.

### **Objetivos particulares**

Evaluar el efecto de la dapsona administrada sola y en combinación con el probenecid sobre la lipoperoxidación presente en el sitio de daño después de una LTME en la rata.

Evaluar el efecto de la dapsona administrada sola y en combinación con el probenecid sobre la cantidad de glutatión reducido y de glutatión oxidado en el tejido nervioso dañado de la medula espinal de la rata.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo del siguiente trabajo se emplearon un total de 95 ratas adultas, de la cepa Wistar, hembras con un peso aproximado de 200-250g. Los animales fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Durante el desarrollo del proyecto a todos los animales se mantuvieron a temperatura ambiente, se les proporcionó libre acceso a agua y alimento, antes y después de la LTME.

### **Diseño experimental**

El estudio experimental se dividió en dos partes:

#### Parte 1. Cuantificación de la lipoperoxidación en el sitio de la lesión

Las ratas se organizaron en cinco grupos (n=8-13), cada uno con las siguientes características:

Grupo 1 Ratas con laminectomía, sin LTME y sin tratamiento.

Grupo 2 Ratas con laminectomía, con LTME y sin tratamiento.

Grupo 3 Ratas con laminectomía, con LTME y tratamiento de dapsona (DDS).

Grupo 4 Ratas con laminectomía, con LTME y tratamiento de probenecid (Prob).

Grupo 5 Ratas con laminectomía, con LTME y tratamiento de DDS-Prob.

#### Parte 2. Cuantificación de glutatión

Las ratas se organizaron en cinco grupos (n=8-10), cada uno con las siguientes características:

Grupo 1 Ratas con laminectomía, sin LTME y sin tratamiento.

Grupo 2 Ratas con laminectomía, con LTME y sin tratamiento.

Grupo 3 Ratas con laminectomía, con LTME y tratamiento de DDS.

Grupo 4 Ratas con laminectomía, con LTME y tratamiento de Prob.

Grupo 5 Ratas con laminectomía, con LTME y tratamiento de DDS-Prob.

## **Administración de los tratamientos**

Los tratamientos se administraron como dosis única 3 h después de la LTME a dosis de 25 mg/Kg y 100 mg/Kg de peso corporal para dapsona y probenecid respectivamente. En el caso de la terapia combinada se administraron las mismas dosis.

## **TECNICAS**

### **Procedimiento quirúrgico y lesión de la médula espinal**

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico Sedalpharma a una dosis de 29 mg/kg de peso vía intraperitoneal. Bajo condiciones de asepsia y antisepsia se realizó una incisión en la región media de las vértebras torácicas, seguido de una laminectomía en la vértebra T9 para exponer la médula espinal con la duramadre íntegra. En caso de los animales a los que se les realizó LTME, fueron colocados en el equipo N.Y. Spinal Cord Impactor, el cual fue estandarizado en la Universidad de Nueva York (107), para realizar una lesión traumática de la médula espinal por contusión. El impactador fue soltado a una altura de 25 mm con una velocidad de impacto de 0.687 m/s provocando así una lesión moderada. El equipo cuenta con un software que tiene la capacidad de analizar la lesión siguiendo diversos parámetros como: grado de compresión del tejido medular, velocidad, tiempo y altura con que impacta el cilindro metálico al tejido nervioso. La lesión se verificó mediante la formación de un hematoma en el sitio de la lesión (epicentro), así como la inmovilidad de las patas posteriores de los animales. Posteriormente los animales fueron suturados y mantenidos en calor en cajas de acrílico hasta su recuperación.

### **Toma de muestra**

Se sacrificaron los animales a las 24 h después de la lesión (tiempo de mayor producción de ERO) por decapitación y se realizó una laminectomía extensa para obtener una muestra homogénea de la médula espinal en la zona del epicentro, con un peso aproximado de 25 mg para la realización de dos análisis: peroxidación de lípidos y la técnica de medición de glutatión oxidado y reducido.



## **Peroxidación de lípidos**

Se realizó por medio de la técnica descrita por Triggs y Wilmore (108) para determinar los productos finales de la lipoperoxidación con capacidad de emitir fluorescencia.

Después de la obtención de la muestra el tejido se homogeneizó en 3 mL de solución salina en un homogeneizador de vidrio-teflón con 10 golpes. Posteriormente se tomó 1 mL del homogeneizado y se agregaron 4 mL de mezcla cloroformo-metanol (2:1) y se agitó en vortex. La mezcla fue colocada en hielo por 30 min en oscuridad. Posteriormente se observaron dos fases, de las cuales se retiró la fase acusa y se analizó la fase orgánica. Se tomó 2 mL de la muestra y se agregaron 200  $\mu$ L de metanol, se analizó en un espectrómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS50B a una longitud de excitación de 370 nm y una longitud de emisión de 430 nm. La fluorescencia fue expresada en unidades de fluorescencia por gramo de tejido (UF/g tejido). Cada muestra de tejido se hizo por duplicado. En el inicio de cada lectura, la sensibilidad del equipo se midió mediante una solución estándar de quinina (1 mg/mL) preparada en el momento.

## **Cuantificación de GSH**

El contenido de GSH y GSSG se determinó como describe Hissin y Hilf (109).

### Procesamiento de la muestra

Una vez obtenida la muestra se homogeneizó en 0.5 mL de  $\text{HPO}_3$  (25%) y 1.875 mL de BF-EDTA (50 mM pH=8.0; EDTA 5 mM). Se colocó 1 mL de homogeneizado en un tubo eppendorf color ambar, para evitar la luz y 1 mL en un tubo eppendorf transparente y se guardó en revco hasta el momento de análisis de proteínas. Se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 15 min a 4°C y se guardó en el revco hasta el momento de su análisis.

### Análisis de contenido de GSH

A partir de una Solución Stock de GSH con una concentración de (1 mg/mL), se preparó una solución de trabajo, tomando 50  $\mu$ L de ésta y aforando a 10 mL para realizar una curva de calibración y se realizaron las siguientes diluciones:

Tabla II. Curva estándar para cuantificación de GSH.

STD	GSH Solución de trabajo (µL)	BUFFER-EDTA (µL)	Concentración (µL/mL)
BLANCO	-	1000	0
Std1	15	985	0.075
Std2	30	970	0.15
Std3	60	940	0.30
Std4	120	880	0.60
Std5	240	760	1.2
Std6	480	520	2.4

Se empleó una placa de 96 pozos para analizar las muestras.

Para montar la placa se realizó lo siguiente:

Se agregaron 60 µL de buffer-EDTA a cada pozo, posteriormente se adicionaron 35 µL de alícuota por duplicado (curva o muestra) y 35 µL de OPA (1 mg/L). Se agitó y leyó 15 min después en un espectro de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 350 nm y una longitud de onda de emisión de 420 nm. Finalmente se retiró la placa y se agregaron 20 µL de NEM 0.04M y de igual forma se dejó incubar por 15 min y leyó en el espectro de fluorescencia con las condiciones antes mencionadas. Se empleó el lector de placas FLX800, marca BioTek.

### **Cuantificación de proteínas por Lowry**

Las muestras se analizaron de acuerdo con el método de Lowry (110).

Se preparó una mezcla inicial con 49 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% en NaOH 0.1N, 0.5 mL de tartrato de Na/K 2% y 0.5 mL de CuSO<sub>4</sub> 1%.

Se empleó la muestra previamente guardada y se realizó una dilución 1:10 (100 µL homogenado y 900 µL de H<sub>2</sub>O). Se tomaron 400 µL de la dilución y se agregaron 2 mL de la mezcla preparada inicialmente, (se realizó por duplicado). Se dejó reposar por 10 minutos y posteriormente se agregaron 200 µL de Folin Fenol (1:1) por tubo. Se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente y se tomó lectura en el espectrómetro a una λ 550 nm.

Se realizó una curva de calibración para la cuantificación de proteínas en la cantidad de tejido obtenidas, empleando un stock de albúmina bovina de 250  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

Tabla III. Curva estándar para cuantificación de proteínas.

TUBO	AGUA	ALBÚMINA (mL)	CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )
A	0.4	-	0
B	0.35	0.05	12.5
C	0.3	0.1	25
D	0.25	0.15	37.5
E	0.2	0.2	50
F	0.1	0.3	75
G	-	0.4	100

### **Análisis estadístico**

Para el análisis de los resultados se utilizó la prueba de Levene y se comprobó que los datos tenían homogeneidad de varianzas, con esta información se empleó un análisis estadístico paramétrico a través de una ANDEVA de una vía seguida de la prueba de Tukey para comparar los valores promedio entre todos los grupos, se consideró como diferencia significativa una  $p < 0.05$ . El análisis se realizó con el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 19.0.

### **Consideraciones éticas**

El presente trabajo se realizó bajo los lineamientos establecidos en el reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud (Titulo Séptimo: De la investigación que incluye la utilización de animales de experimentación), publicada en 1990 (Apéndice I).

## RESULTADOS

### **Evaluación conductual**

Los animales que fueron laminectomizados presentaron movilidad en las patas posteriores después de la cirugía de forma normal, mientras que los animales con LTME evaluados 24 h después del daño presentaron falta de movilidad en las patas posteriores, con estas observaciones se puede demostrar que los procedimientos quirúrgicos fueron realizados de forma adecuada.

### **Cuantificación de la lipoperoxidación**

Los resultados del ensayo de lipoperoxidación se presentan en la figura 24, los cuales fueron medidos en epicentro de la lesión 24 h después del procedimiento quirúrgico, y los datos se expresan en unidades de fluorescencia por gramo de tejido fresco (UF/g) y se muestran como el valor promedio  $\pm$  EE, de 8 a 13 animales por grupo, se consideraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con una  $p < 0.05$ . El grupo control negativo (grupo 1) solo con laminectomía y sin lesión, mostró un valor de LP de  $465.6 \pm 10.19$ , lo que representa los niveles basales de LP en condiciones normales. Por otra parte el grupo control positivo (grupo 2), animales con LTME y con vehículo, mostraron un valor promedio de  $630.3 \pm 60.47$ , lo cual indica un incremento de la LP del 35.4% como consecuencia de daño, que fue estadísticamente significativo al ser comparado con el grupo sin lesión ( $p < 0.05$ ). Mientras que los valores observados en grupo 3 animales con LTME y tratados con dapsona se observó un valor promedio de  $425.5 \pm 42.99$ , lo que es equivalente a una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de LP del 32.5%, comparado con el grupo control positivo. Con respecto al los valores del grupo 4, lesionado y tratado con probenecid se obtuvo un valor de  $543.4 \pm 56.99$ , lo que no representa una disminución significativa de LP con respecto al grupo lesionado que no recibió tratamiento. Finalmente el grupo 5 con lesión y terapia combinada se observaron valores de  $435.4 \pm 39.75$ , lo que se traduce en una reducción estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) de LP del 30.9% en comparación con los animales del grupo control positivo.

Con base a estos resultados se puede observar que existe una disminución significativa de LP cuando se administra la terapia con dapsona sola o en combinación con probenecid.

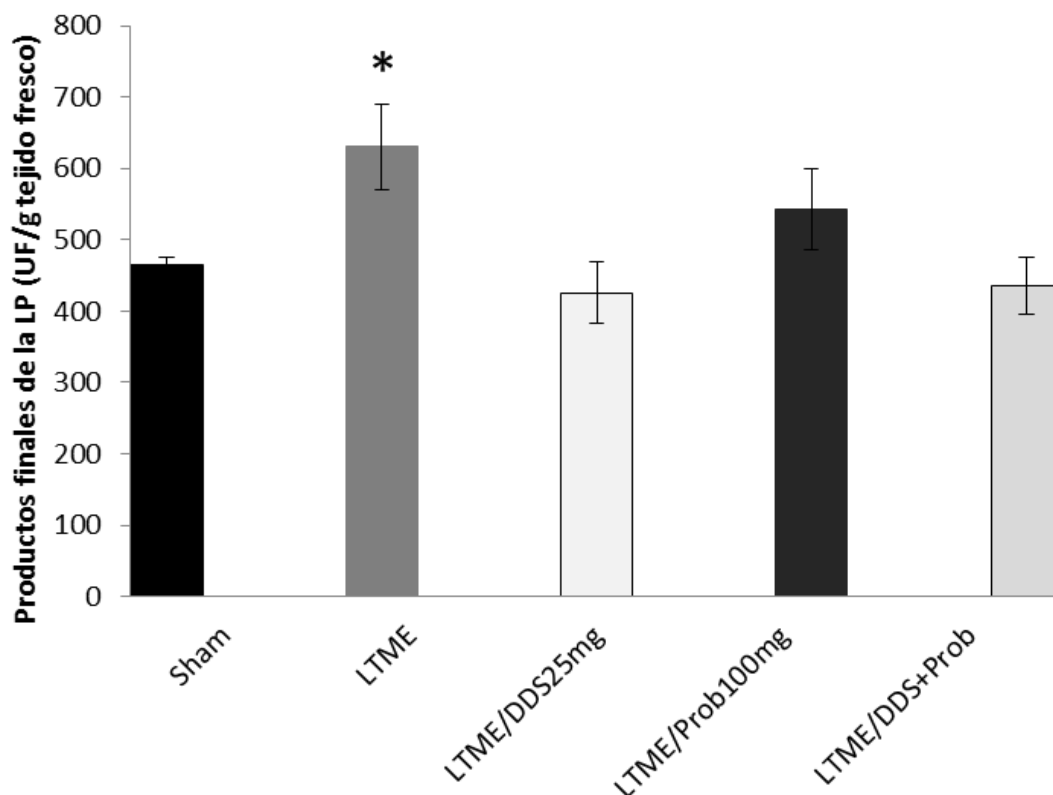


Figura 23. En esta figura se muestran los valores promedio de la lipoperoxidación en unidades de fluorescencia por gramo de tejido fresco (UF/g tejido fresco)  $\pm$  EE 24 h después de la LTME. Grupo 1. Sham: animales con laminectomía sin tratamiento; Grupo 2. LTME: animales con lesión traumática de médula espinal sin tratamiento; Grupo 3. LTME/DDS 25 mg: animales con lesión traumática de médula espinal y tratamiento con Dapsona; Grupo 4. LTME/Prob 100 mg: animales con lesión traumática de médula espinal y tratamiento con Probenecid; Grupo 5. LTME/DDS+Prob: animales con lesión traumática de médula espinal y tratamiento de dapsona y probenecid. Se emplearon de 8 a 13 animales por grupo, ANDEVA seguido de la prueba de Tukey, \* =  $p < 0.05$  diferente de Sham, LTME/DDS25mg y LTME/DDS+Prob.

### **Cuantificación de glutatión**

La cuantificación del glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) medidos en el epicentro de la lesión a los animales 24 h después de una LTME se expresan como nanomoles de GSH y GSSG por miligramo de proteína (nmolGSH/mg) y son presentados como la media  $\pm$  EE, de 8 a 10 animales por grupo, considerando significativa una  $p < 0.05$ . Los resultados del ensayo de glutatión reducido se presentan en la figura 25. En el grupo 1 o control negativo, (con laminectomía y sin lesión), el valor promedio de GSH fue de  $1.31 \pm 0.17$ , lo que representa los niveles basales de GSH en condiciones normales. Mientras que el grupo 2 (control positivo), lesionado y sin tratamiento se observó un valor promedio de GSH de  $1.29 \pm 0.19$ , estos resultados indican que no existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo no lesionado. Mientras que en el grupo 3 (con LTME y tratado con dapsona) se observan valores similares a los de los grupos 1 y 2 obteniéndose un valor promedio  $1.33 \pm 0.22$  sin diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo laminectomizado y al grupo lesionado. Por otra parte el grupo 4, lesionado y tratado con probenecid muestra un incremento del 26.8% con un valor promedio de  $1.64 \pm 0.26$ , que no fue estadísticamente significativo vs LTME y vehículo ( $p < 0.05$ ). Finalmente, el grupo 5 con LTME que recibió la terapia de dapsona más probenecid mostró un valor promedio  $1.84 \pm 0.32$ , lo que representa un incremento del 42.4% a pesar de este incremento, este valor no alcanza significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

Con base en estos resultados, se puede decir que no hubo cambios significativos en algún grupo estudiado.

Los resultados de la cuantificación de GSSG se presentan en la figura 26, como se puede observar los niveles de GSSG tuvieron el mismo comportamiento que los del GSH, ya que en los grupos 1, 2, 3 y 4 los valores promedio fueron similares ( $0.45 \pm 0.05$ ,  $0.44 \pm 0.07$ ,  $0.50 \pm 0.9$  y  $0.55 \pm 0.14$ , respectivamente) lo que indica que no existen cambios por efecto de la lesión ni por la administración de los fármacos por separado. Mientras que en el grupo 5 que recibió la terapia combinada, se observó un valor promedio de  $0.79 \pm 0.15$ ,

teniendo éste último un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de 75.2% de GSSG en comparación con el grupo lesionado que no recibió tratamiento.

Se realizó la relación del glutatión oxidado (GSH) entre el glutatión reducido (GSSG), que se encuentra representado en la figura 27. Se puede observar en todos los grupos de acuerdo a la relación de GSH-GSSG, que existe mayor cantidad de GSH que de GSSG en el tejido estudiado. Teniendo una relación de 2.91, 2.93, 2.66, 2.98 y 2.33 respectivamente en los grupo 1, 2, 3, 4 y 5. En estas relaciones realizadas entre GSH/GSSG no se observa algún efecto diferente entre los grupos.

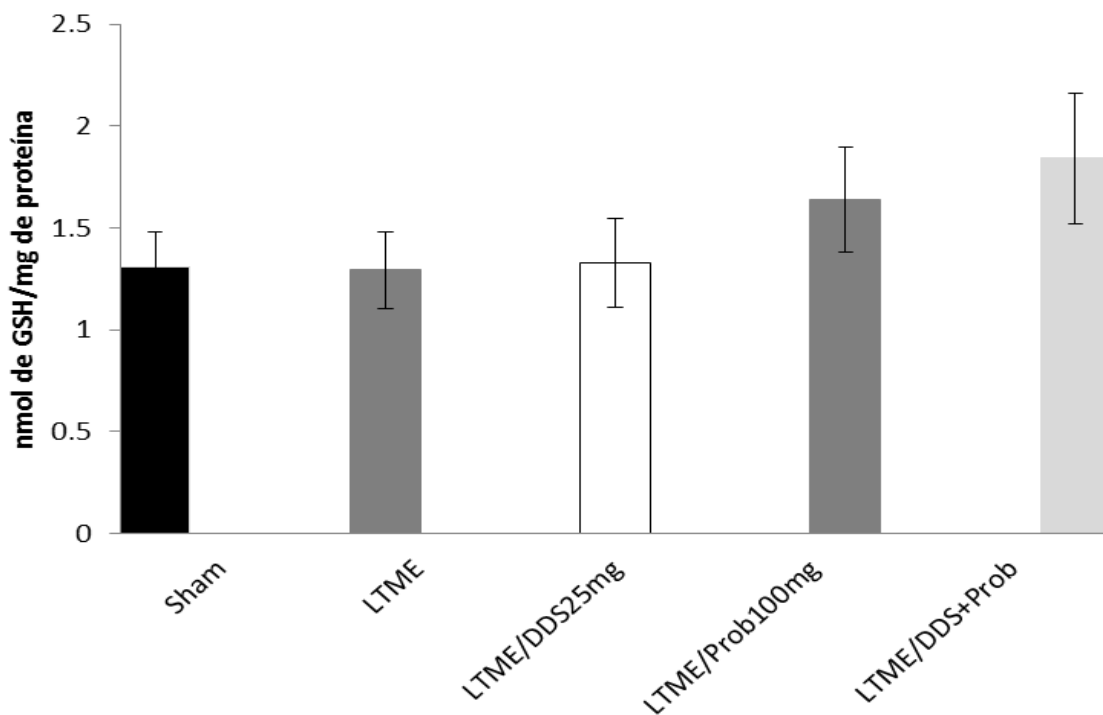


Figura 24. En esta figura se muestran los valores promedio de glutatión reducido en nanomolas de GSH por miligramo de proteína (nmol GSH/mg de proteína)  $\pm$ EE 24 h después del procedimiento quirúrgico. Grupo 1. Sham, Grupo 2. LTME, Grupo 3. LTME/DDS 25 mg, Grupo 4. LTME/Prob 100 mg y Grupo 5. LTME/DDS+Prob. Se emplearon de 8 a 10 animales por grupo, ANDEVA seguido de la prueba de Tukey, \* =  $p < 0.05$ .

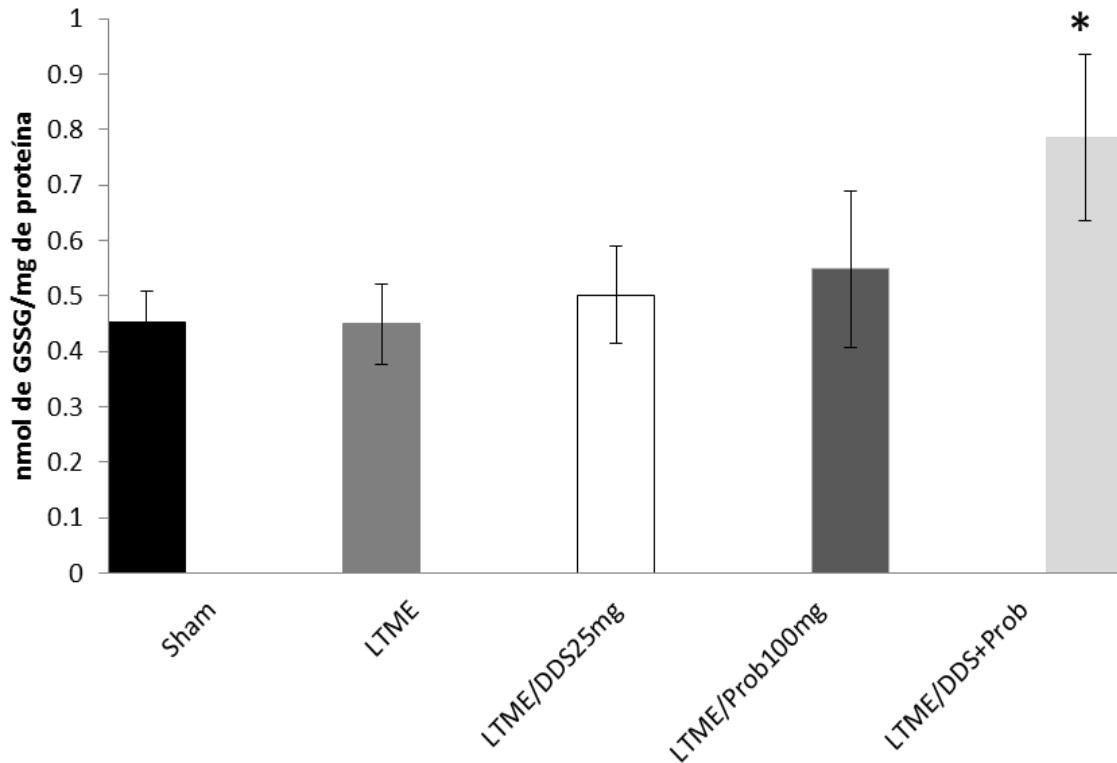


Figura 25. En esta figura se muestran los valores promedio de glutati3n oxidado en nanomolas de GSSG por miligramos de prote3na (nmol GSH/mg de prote3na)  $\pm$ EE 24 h despu3s de la LTME. Grupo 1. Sham, Grupo 2. LTME, Grupo 3. LTME/DDS 25 mg, Grupo 4. LTME/Prob 100 mg y Grupo 5. LTME/DDS+Prob. Se emplearon de 8 a 10 animales por grupo, ANDEVA seguido de la prueba de Tukey, \* =  $p < 0.05$  diferente de Sham, LTME, y LTME/DDS 25 mg.



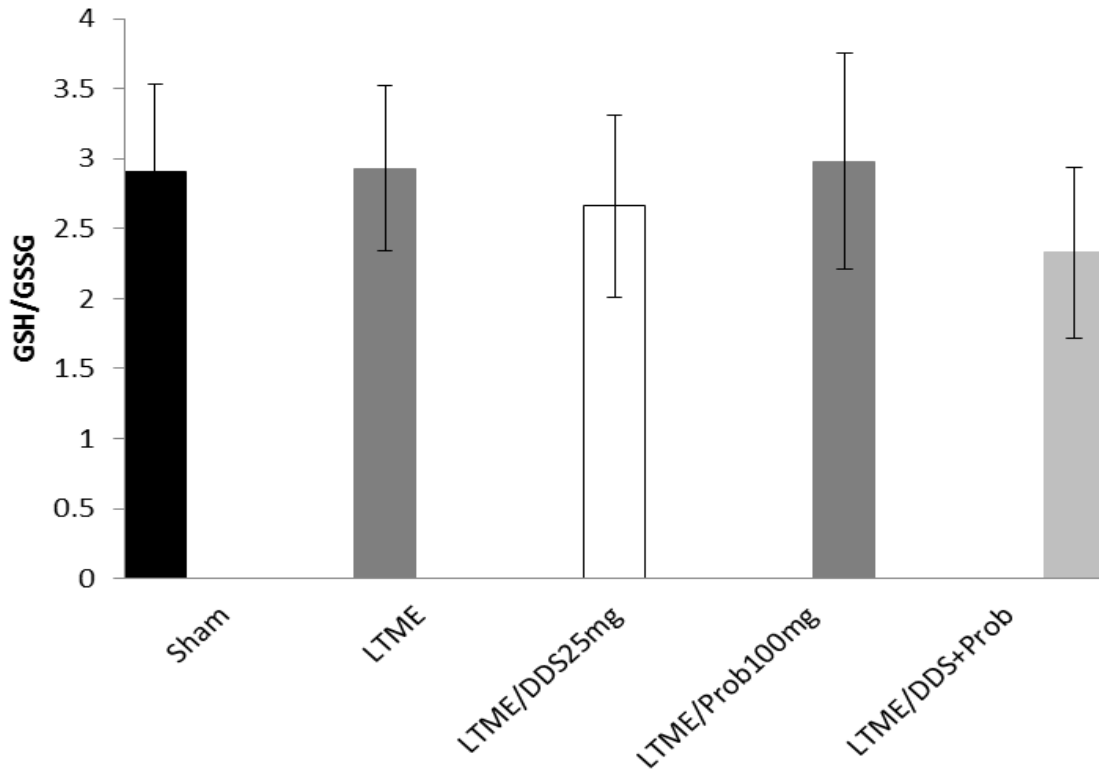


Figura 26. En esta figura se muestran los valores promedio de la relación de GSH/GSSG  $\pm$ EE 24 h después de la LTME. Grupo 1. Sham, Grupo 2. LTME, Grupo 3. LTME/DDS 25 mg, Grupo 4. LTME/Prob 100 mg y Grupo 5. LTME/DDS+Prob. Se emplearon de 8 a 13 animales por grupo, ANDEVA seguido de la prueba de Tukey, \* =  $p < 0.05$ .

## DISCUSIÓN

Una lesión en el sistema nervioso, específicamente la LTME, promueve el desarrollo de diversos mecanismos autodestructivos que provocan un daño tisular irreversible que da como resultado una disfunción neurológica permanente, entre estos mecanismos destaca la producción de ERO, lo cual genera estrés oxidativo (73).

En el presente trabajo se evaluó el efecto de dapsona, probenecid y la combinación de estos fármacos como una terapia neuroprotectora en un modelo de LTME en ratas, empleando como marcadores de estrés oxidativo los niveles de lipoperoxidación, glutatión reducido y glutatión oxidado en el sitio de la lesión.

Los resultados mostraron que después de una LTME se produjo un aumento en los niveles basales de lipoperoxidación en un 35.4% con respecto al grupo que solo fue laminectomizado, lo cual coincide con estudios reportados anteriormente (111), en donde las ratas fueron sometidas a una LTME y se observó un aumento de LP de 33% en relación con un grupo no lesionado, este incremento en la lipoperoxidación es debido al estrés oxidativo generado por el ataque de radicales libres a membranas celulares, ya que en la LTME se generan una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno, debido a la activación de enzimas como la sintasa de óxido nítrico (112), el proceso de reperusión después de la LTME durante el cual se libera  $H_2O_2$  (16), el desacople de la cadena transportadora de electrones que forma  $O_2^{\cdot-}$  (113), así como un incremento en los niveles de malonaldehído, un producto de la lipoperoxidación (78), que se refleja en los resultados encontrados, teniendo así un aumento de lipoperoxidación después de una LTME.

Así mismo, se observó una disminución de la lipoperoxidación (LP) por efecto de la dapsona, este efecto sobre la regulación del daño oxidativo fue observado previamente en un modelo de lesión estriatal (114) producida después de la sobreactivación de receptores NMDA con una administración intraestriatal de ácido quinolínico, un agonista del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), en uno de los grupos estudiados se usó dapsona (12.5 mg/Kg) con una posterior inyección intraestriatal de quinolato en el cuerpo estriado de rata, y se observó su

capacidad para prevenir la LP durante las primeras etapas de la excitotoxicidad asociada con la generación de radicales libres.

Por otra parte, se demostró la capacidad de la dapsona en la disminución de la LP en un modelo de isquemia cerebral y reperfusión en ratas (112), ya que la dapsona fue capaz de disminuir el daño oxidativo a las membranas, así como disminuir el daño a las proteínas por óxido nítrico, esto fue medido por los niveles de nitrotirosina presentes en el sitio del infarto, además en tal trabajo se observó una disminución en la actividad de la mieloperoxidasa que transforma el peróxido de hidrógeno en ácido hipocloroso, lo que también, le confiere propiedades antioxidantes y así una reducción en la oxidación al ser comparado con el grupo lesionado que no fue tratado. Estudios recientes en un modelo de lesión traumática de médula espinal en ratas (115) describen una reducción de la peroxidación lipídica después de una LTME, donde se administró dapsona a las 3 y 5 h después del daño revirtiendo este marcador a niveles basales de LP, en este mismo estudio se observó una mejoría funcional motora así como una mayor conservación de tejido adyacente al sitio de daño con respecto a los animales que no fueron tratados después de la LTME.

El probenecid no mostró tener efecto importante sobre la LP, ya que no se observó una disminución significativa de la ésta. No se han encontrado reportes en los cuales se haya observado un efecto neuroprotector o antioxidante del probenecid, sin embargo, en un estudio previo (105), se encontró que el uso del probenecid administrado de forma conjunta con ácido quinurénico, un antagonista del receptor NMDA bloquea la excreción de éste, desde el flujo extracelular antagonizando la acción tóxica inducida con ácido quinolínico, agonista del receptor de NMDA. Se ha descrito que los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), juegan un papel importante en el daño generado al sistema nervioso posterior a una LTME, ya que al incrementar su actividad permiten la entrada masiva de  $Ca^{+2}$  al interior de las células nerviosas y con ello la activación de enzimas que dañan las estructuras celulares provocando así un daño permanente (16), Aunado a esto la finalidad de la administración de probenecid fue bloquear la salida de la dapsona, y mantener concentraciones terapéuticas en el tejido

nervioso en un mayor lapso de tiempo. Por medio de esta estrategia, se pueden mantener dosis terapéuticas seguras, sin tener efectos adversos que se pueden presentar con el incremento de la dosis. Por otra parte, se observó que la terapia combinada mostró una disminución de la LP semejante a la observada con la dapsona cuando fue administrada en monoterapia, por lo que el efecto antioxidante es atribuido a la dapsona no así al probenecid ya que el probenecid no mostró tener efecto en la disminución de la LP.

Teniendo en cuenta estos hallazgos, la dapsona podría ayudar a disminuir la muerte celular generada por el daño oxidativo a las membranas evitando la pérdida del tejido nerviosos y favoreciendo la recuperación funcional.

Por otra parte, en los resultados de la cantidad de glutatión se esperaba una disminución en el GSH después de una LTME en el grupo no tratado con respecto a los niveles basales del grupo no lesionado, de acuerdo a lo ya reportado previamente en un modelo de LTME (116), en el que se midió la cantidad de GSH y GSSG a las 4 12 y 24 h después del daño, donde se observó una disminución significativa de GSH debido a que la condición de estrés oxidativo presenta mayor demanda de GSH para contrarrestar el daño generado por las ERO después de una LTME, esto no fue así, tal vez porque las ERO pueden contrarrestarse por otras defensas antioxidantes presentes en el tejido, tanto enzimáticas como no enzimáticas que no fueron estudiadas en el presente trabajo y que podrían estar teniendo una mayor eficacia antioxidante durante esta etapa del daño. Se ha reportado (117) que existe un importante grupo de tipo tiol que desempeña un papel neuroprotector importante y que actúa como defensa antioxidante durante la LTME. Se encontró que las metalotioneínas son una familia de proteínas de bajo peso molecular con alto contenido de cisteína y han sido localizadas en neuronas motoras, astrocitos y glía, por esta razón éstas podrían estar teniendo una mayor implicación como defensa antioxidante que el glutatión en el caso particular de la médula espinal. Esto podría explicar que no existe diferencia significativa en los niveles GSH del grupo lesionado con respecto a los niveles basales de GSH del grupo no lesionado.

En el caso de los grupos tratados con probenecid y dapsona- probenecid no se observó tampoco diferencia significativa en los niveles de GSH, pero no se descarta que existe una tendencia a un incremento de GSH, que podría ser por el efecto antioxidante de los tratamientos, lo que podría traducirse en una disminución de estrés oxidativo en el sitio de daño generando así una menor demanda de glutatión.

Con respecto a las concentraciones de GSSG, éstas mostraron la misma tendencia que el GSH, debido a que el equilibrio entre GSH y GSSG ocurre todo el tiempo, sin embargo, en el grupo con la terapia combinada si se obtuvo un incremento significativo, lo que sugiere que existe una tendencia de mejoría y disminución de estrés oxidativo.

La relación entre el glutatión oxidado y glutatión reducido se empleó para conocer el estado redox de las células, se observó que hubo una mayor cantidad de GSH que de GSSG en todos los casos, pero no logra tener alguna tendencia que demuestre el efecto antioxidante de las terapias administradas.

El GSH es utilizado comúnmente como marcador de estrés oxidativo en distintos tejidos, sin embargo en el presente estudio no tuvo implicación importante después de la LTME.

## CONCLUSIONES

Los resultados muestran que la dapsona es un buen candidato para ser empleado como fármaco neuroprotector en la lesión traumática de médula espinal ya que antagoniza el daño oxidativo producido por el trauma, y el tratamiento combinado con probenecid no le confiere ventaja terapéutica por lo que no es una buena estrategia neuroprotectora.

## REFERENCIAS

1. Tortora GJ, Derrickson B (2006) Principios de anatomía y Fisiología. Panamericana, Madrid.
2. Ira FS (2008) Fisiología humana. McGraw-Hill, Madrid.
3. Alcaraz RV (2001) Estructura y función del sistema nervioso: recepción sensorial y estados del organismo. El manual moderno, México.
4. Guyton AC (1987) Fisiología Humana. McGraw-Hill, México.
5. Ham A (1990) Tratado de Histología. Interamericana, México.
6. Lockhart RD, Hamilton GF, Fyfe FW (1995) Anatomía Humana. Interamericana McGraw-Hill, México.
7. Putz, RL , Müller-Gerbl M (1996) The Vertebral Column: A Phylogenetic Failure? A Theory Explaining the Function and Vulnerability of the Human Spine Clinical Anatomy. John Wiley Interscience. Munich Germany.
8. Pérez R, Martín DS, Renán S, Durán OS (2008) Aspectos epidemiológicos de la lesión medular de la población del Centro Nacional de Rehabilitación. Revista Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación 20:74-82 .
9. Díaz RA, Guízar SG, Rios CC (2002) Estrategias neuroprotectoras después de una lesión traumática de medula espinal. Rev Med IMSS 40 (5): 437-455.
- 10 Tator CH, Fehlings MG (1991) Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. J Neurosurg. 75(1):15-26.
11. Burt AA (2004) The epidemiology, natural history and prognosis of spinal cord injury. Current Orthopaedics, 18 (1): 26-32.
12. Ho CH, Wuermsler LA, Priebe MM, Chiodo AE, Scelza WM, Kirshblum SC (2007) Spinal cord injury medicine.1. Epidemiology and classification. Arch Phys Med Rehabil 88(3 Suppl 1): 49-54.
13. Pagliacci MC, Celani MG, Zampolini M, Spizzichino L, Franceschini M, Baratta S, Finali G, Gatta G, Perdon L; Gruppo Italiano Studio Epidemiologico Mielolesioni (2003) An Italian survey of traumatic spinal cord injury. The Gruppo Italiano Studio Epidemiologico Mielolesioni study. Arch Phys Med Rehabil. 84(9): 1266-1275.

14. Pardini CM (1998) Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal. Tesis de Doctorado de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.
15. National Spinal Cord Injury Statistical Center (2005) Spinal cord injury: facts and figures at a glance. *J Spinal Cord Med* 28:379-80.
16. Caballero CS, Nieto-Sampedro M (2005) Fisiopatología de la lesión medular. Revisión de literatura. *Artículos de revisión* 36 (1):75-86.
17. Schwab ME, Bartholdi D (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesion spinal cord. *Physiol Rev* 76:319-370.
18. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR (2004) Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. Review Article. *The Spine Journal* 4:451–464.
19. Taoka Y, Okiyama K (1998) Spinal Cord Injury in the rat. *Prog Neurobiol* 56:341-358.
20. Girardi FP, Khan SN, Cammisa FP, Blanck TJ (2000) Advances and strategies for Spinal Cord Regeneration *Orthop Clin North America*, 31:465-472.
21. Nieto-Sampedro M (2001) Reparación del trauma medular. *Bol Soc Esp Neuroci* 12:2-15.
22. Dusart I, Schwab ME (1994) Secondary cell death and inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 6:712-724.
23. Means ED, Anderson DK (1983) Neuronophagia by leukocytes in experimental spinal cord injury. *J. Neuropathol Exp Neurol* 42:707-719.
24. McTigue DM, Tani M, Krivacic K, Chernosky A, Kelner GS, Maciejewski D (1998) Selective chemokine mRNA accumulation in the rat spinal cord after contusion injury. *J. Neurosci Res* 53: 358-376.
25. Moreno-Flores M. T., Bovolenta, P, Nieto-Sampedro M (1992) Polymorphonuclear leukocytes in brain parenchyma alter injury and their interaction with purified astrocytes in culture. *Glia* 7: 146-157.
26. Griffiths IR, Mc Culloch MC (1983) Nerve fibres in spinal cord impact injures. *J Neurol Sci* 58:335-349.
27. Bligh AR, Decresato V (1986) Morphometric analysis of experimental spinal cord injury in the cat: the relation of injury intensity to survival of myelinated axons. *Neuroscience* 19:321-346.



28. Bareyre FM, Schwab ME (2003) Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. Review. *Trends in Neurosciences* 26:(10) 555-563.
- 29 Lemke M, Demediuk P, McIntosh TK, Vink R, Faden A (1987) Alterations tissue Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> and spinal cord edema following impact trauma in rats. *Bioch Cipo Res Com.* 147:1170-1175.
30. Young W, Koreh L (1986) Potassium and calcium changes in injured spinal cords. *Brain Res.* 365: 42-53
31. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD (1998) Basic neurochemistry molecular, cellular and medical aspects. Lippincott Raven; New York.
32. Balentine JD (1988) Spinal cord trauma: In search of the mecaning of granular axoplasm and vesicular myelin. *J Neuropath Exp Neurol* 47(2):77-92.
33. Tator CH, Fehlings MG (1991) Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 75 (1):15–26.
34. Dusart I, Schwab ME (1994) Secondary cell death and inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 6:712-724.
35. Basu S, Hellberg A, Ulus AT, Westman J, Karacagil S (2001) Biomarkers of free radical injury during spinal cord ischemia. *FEBS Lett* 508(1):36–8.
36. Agrawal SK, Fehlings MG (1997) Role of NMDA and non NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord axonal injury. *J Neurosci* 17:1055-1063.
37. Diaz RA, Salgado CH, Montes S, Maldonado V, Tristan L, Alcaraz ZM, Ríos C (2007) Acute alterations of glutamate, glutamine, GABA, and other amino acids after spinal cord contusion in rats. *Neurochem Res.* 32(1):57-63.
- 38 Choit DW (1995) Calcium Still center-stage in hipoxic-ischemic neuronal death. *Trenes Neurosci.* 18:58-60.
39. Hall ED (1994) Free radicals in central nervous system injury. *New Comprehensive Biochemistry* 26:217–238.

40. Schwartz M, Moalem G, Leibowitz AR, Cohen IR (1999) Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci* 22(7):295–299.
41. Popovich PG, Wei P, Stokes BT (1997) Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol* 377(3):443–464.
42. Bartholdi D, Schwab ME (1997) Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci* 9(7): 1422–1438.
43. Klusman I, Schwab ME (1997) Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res* 762(1–2):173–84.
44. Cárdenas RN, Pedraza CJ (2006) Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química* 17:164-173.
45. Mitjavila MT, López D, Sáiz MP (2001) Los radicales libres y su implicación en procesos fisiológicos y patológicos. *NCP Documenta* 258:5-11.
46. Leighton F, Cuevas A, Guasch V, Pérez DD, Strobel P, San Martín A, Urzua U, Díez MS, Foncea R, Castillo O, Mizón C, Espinoza MA, Urquiaga I, Rozowski J, Maiz A, Germaain A (1999) Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans. *Drugs Exp Clin Res* 25 (2-3):133-141.
47. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A (2008) Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eu J Pharmacol* 585 (2-3): 119-124.
48. Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141(2):312-322.
49. Dreosti IE (2000) Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition* 16(7-8):692-694.
50. Kohen R (1999) Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress – new approaches for their evaluation. *Biomed Pharmacother* 53 (4):181-192.
51. Hansberg WT (2002). *Biología de las especies de oxígeno reactivas*. Mensaje Bioquímico XXV1:19-54.

52. Lledías F, Hansberg W (2000) Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods Enzymol* 319:110-119.
53. Nita DA, Nita V, Spulber S, Moldovan M, Popa DP, Zagrean AM, Zagrean (2001) Oxidative damage following ischemia depends on reperfusion - a biochemical study in rat. *J Cell Mol Med* 5:163-170.
54. Halliwell B, Chirico S (1993) Lipid peroxidation: it's mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 57:715S-725S.
55. Spiteller G (2001) Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Exp Gerontol* 36(9):1425-1457.
56. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A (2008) Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eu J Pharmacol* 585 (2-3): 119-124.
57. Halliwell B, Gutteridge J (2007) *Free Radicals in biology and medicine*. Oxford University Press.
58. Krinsky NI (1992) Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 200:248-254.
59. Kohen R, Nyska A (2002) Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30(6): 620-650.
60. Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141(2):312-322.
61. Kehrer JP (2000) The Haber Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149(1):43-50.
62. Vertuani S, Angusti A, Manfredini S (2004) The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des* 10(14):1677-1694.
63. Ghezzi P (2005) Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic Res* 39 (6):573-580.
64. Becker BF (1993) Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med* 14 (6): 615-631.
65. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W (2001) Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 34 (2):237-256.

- 66 Anderson ME (1998) Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions* 111-112(24):1-14.
- 67 Meister A, Anderson ME, 1983. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 711–760.
68. Dickinson DA, Forman HJ (2002) Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci Rev* 973:488-504.
69. Maher P (2005) The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res Rev* 4(2): 288-314.
70. Bains JS, Shaw SA (1997). Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress mediated neuronal death. *Brain Res. Rev.* 25:335–358.
71. Townsend DM, Tew DK, Tapiero H (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57(3-4):145-155.
72. Klatt P, Lamas S (2000) Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 267(16):4928-4944.
73. Cerdá MC, Borrego OS, Sáez TG (2010) Estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. *Monografía XXIX: Acción de las hormonas a nivel cerebral* 283-302.
74. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D (2001) Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and and ischemia/ reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 53(1):135–159.
75. Niki E (2009) Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. Review Article. *Free Radical Biology and Medicine.* 47:(5,1)469-484.
76. Stoffel W. (1990) The myelin membrane of the central nervous system essential macromolecular structure and function. *Angew Chem Int De Engl* 29:958-976.
77. Hall ED. (1994) Free radicals in central nervous system injury. Elsevier Science, 217–238.
78. Kurihara M. (1985) Role of monoamines in experimental spinal cord injury in rats. Relationship between Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and lipid peroxidation. *J Neurosurg* 62(5):743–749.

79. Bains M, Hall ED (2012) Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. *Biochim Biophys Acta Rev* 1822(5):675-684.
80. Pieters FA, Zuidema (1987) The absolute oral bioavailability of dapsone in dogs and humans. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 25: 396-400.
81. Zuidema J, Hilbers-Modderman ES, Merkus FW (1987) Clinical pharmacokinetics of dapsone. *Clin Pharmacokinet*. 11: 299–315.
82. Venkatesan K (1989) Clinical pharmacokinetic considerations in the treatment of patients with leprosy. *Clin Pharmacokinet*, 16: 365–386.
83. Ellard GA (1966) Absorption, metabolism and excretion of di(rho-aminophenyl) sulphone (dapsone) and di(rho-aminophenyl) sulphoxide in man. *Br J Pharmacol*. 26: 212–217.
84. Glazko AJ, Dill WA, Montalbo RG, Holmes EL (1968) A new analytical procedure for dapsone: application to blood-level and urinary-excretion studies in normal men. *Am J Trop Med Hyg*. 17: 465–473.
85. Goodwin CS, Sparell G (1969) Inhibition of dapsone excretion by probenecid. *Lancet*. 2: 884–885.
86. Balakrishnan S, Sheshadri PS (1979) Influence of rifampicin on D.D.S. excretion in urine. *Lepr India*. 51: 54–59.
87. Harvath L, Yancey KB, Katz SI (1986) Selective inhibition of human neutrophil chemotaxis to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine by sulfones. *J Immunol*, 137: 1305–1311.
88. Booth SA, Moody CE, Dahl MV, Herron MJ, Nelson RD (1992) Dapsone suppresses integrin-mediated neutrophil adherence function. *J Invest Dermatol*, 98: 135–140.
89. Debol SM, Herron MJ, Nelson RD (1997) Anti-inflammatory action of dapsone: inhibition of neutrophil adherence is associated with inhibition of chemoattractant-induced signal transduction. *J Leukoc Biol*. 62: 827–836.
90. Weiss SJ (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*. 320: 365–376.

91. Webster GF, Alexander JC, McArthur WP, Leyden JJ (1984) Inhibition of chemiluminescence in human neutrophils by dapsone. *Br J Dermatol.* 110: 657–663.
92. Bozeman PM, Learn DB, Thomas EL (1992) Inhibition of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase by dapsone. *Biochem Pharmacol*, 44: 553–563.
93. Martin WJ, Kachel DL (1985) Reduction of neutrophil-mediated injury to pulmonary endothelial cells by dapsone. *Am Rev Respir Dis*, 131: 544–547.
94. Santamaria A, Ordaz MJ, Rubio OM, Solis HF, Rios C (1997) Neuroprotective effect of dapsone against quinolinate- and kainate-induced striatal neurotoxicities in rats. *Pharmacol. Toxicol.* 81(6):271-275.
95. Li S, Stys PK (2000) Mechanisms of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter. *J. Neurosci.* 20:1190-1198.
96. Díaz RA, Salgado CH, Montes S, Guizar SG, Gelista HN, Méndez AM, Díaz CS, Rios C (2011) Delayed administration of dapsone protects from tissue damage and improves recovery after spinal cord injury. *J Neuro Res.* 89 (3):373-380.
97. Robbins N, Koch SE, Tranter M, Rubinstein J (2012) The history and future of Probenecid. *Cardiovasc Toxicol.* 12(1):1-9.
98. Cunningham RF, Israili ZH, Dayton PG (1981) Clinical pharmacokinetics of probenecid. *Clinical Pharmacokinetics.* 6:135–151.
99. Korf J, Van Praag HM (1970) The intravenous probenecid test: A possible aid in evaluation of the serotonin hypothesis on the pathogenesis of depressions. *Psychopharmacologia.* 18(1):129–132.
100. Hilaire ML, Wozniak JR (2010) Gout: Overview and newer therapeutic developments. *Formulary.* 45: 84–90.
101. Selen A, Amidon GL, Welling PG (1982) Pharmacokinetics of probenecid following oral doses to human volunteers. *Journal of Pharmaceutical Science.* 71(11):1238–1242.
102. Israili ZH, Percel JM, Cunningham RF, Dayton PG, Yu TF, Gutman, AB (1972) Metabolites of probenecid. Chemical, physical, and pharmacological studies. *Journal of Medicinal Chemistry.* 15(7):709–713.

103. Boger WP, Strickland SC (1955) Probenecid (Benemid): Its uses and side effects in 2502 Patients. *American Medical Association Archives of Internal Medicine*. 95:83–92.
104. Roch RF, Guisan B (1999) Renal transport of urate in humans. *News Physiol Science*. 14:80–84.
105. Santamaría A, Ríos C, Solís HF, Ordaz MJ, González RL, Altagracia M, Kravzov J (1996) Systemic DL-kynurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology*. 35(1):23-28.
106. Silva AD, Pérez D V, Villeda HJ, Carrillo MP, González HI, García E, Colín BL, Pedraza CJ, Santamaría A (2011) Protective effect of L-kynurenine and probenecid on 6-hydroxydopamine-induced striatal toxicity in rats: implications of modulating kynurenate as a protective strategy. *Neurotoxicol Teratol*. 33(2):303-312.
107. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC (1996) Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device vs. transection. *Exp Neurol* 139:244–256.
108. Triggs WJ, Willmore LJ. (1984) In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe<sup>21</sup> injection. *J Neurochem* 42:976–980.
109. Hissin PJ, Hilf A (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Anal. Biochem*. 74:214-226.
110. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193(1):265-275.
111. Diaz RA, Rios C, Duarte I, Correa D, Guizar SG, Grijalva I, Ibarra A (1999) Cyclosporin-A inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury in rats. *Neurosc Lett* 266(1):61-64.
112. Diaz RA, Zavala C, Montes S, Ortiz PA, Salgado CH, Orozco SS, Nava RC, Pérez NI, Perez SF, Ríos C (2008) Antioxidant, antiinflammatory and antiapoptotic effects of dapsone in a model of brain ischemia/reperusion in rats. *J Neurosci Res*. 86(15):3410-3419.

113. Kowaltowski JA, Vercesi EA (1999) Mitochondrial Damage Induced by Conditions of Oxidative Stress. *Free Radical Biology & Medicine*. 26 (3-4): 463-471.
114. Rodriguez E, Mendez AM, Villeda HJ, Galvan AS, Barroso MR, Rodriguez F, Rios C, Santamaria A. (1999) Dapsone prevents morphological lesions and lipid peroxidation induced by quinolinic acid in rat corpus striatum. *Tox* 139:111–118.
115. Diaz RA, Salgado CH, Montes S, Guizar SG, Gelista HN, Mendez AM, Diaz CS, Ríos C (2011) Delayed Administration of Dapsone Protects From Tissue Damage and Improves Recovery After Spinal Cord Injury. *J Neurosci Res* 89 (3):373-380.
116. Diaz RA, Alcaraz ZM, Maldonado V, Salgado CH, Mendez AM, Rios C (2009) Differential time-course of the increase of antioxidant thiol-defenses in the acute phase after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett*. 452(1):56-59.
117. Arellano RS, Rios C, Salgado CH, Méndez AM, Del Valle ML, Nava RC, Altagracia MM, Díaz RA (2012) Metallothionein-II improves motor function recovery and increases spared tissue after spinal cord injury in rats. *Neurosci. Lett*. 514(1):102-105.



## APÉNDICE I

### **REGLAMENTO DE LA LEY GENERAL DE SALUD EN MATERIA DE INVESTIGACIÓN PARA LA SALUD**

#### **TITULO SEPTIMO**

De la Investigación que incluya a la utilización de animales de experimentación.

#### **CAPITULO ÚNICO**

**ARTÍCULO 121.-** En las investigaciones experimentales con animales, referidas a la salud humana, se deberán llenar los requisitos que establezcan las normas de las propias instituciones de salud, autorizadas por la Secretaría y satisfacer lo señalado en este Capítulo.

**ARTÍCULO 122.-** Las investigaciones se diseñarán a modo de evitar al máximo el sufrimiento de los animales.

**ARTÍCULO 123.-** Cuando sea necesario sacrificar a un animal de experimentación, se empleará un procedimiento que asegure en lo posible su muerte sin sufrimiento.

**ARTÍCULO 124.-** Los bioterios deberán estar de acuerdo con la especie, conformación corporal, hábitos, preferencias posturales y características locomotoras de los animales, para proporcionarles comodidad, excepto cuando las variables experimentales justifiquen otras situaciones.

**ARTÍCULO 125.-** Los bioterios de producción o mantenimiento crónico serán supervisados por profesionales calificado y competente en la materia y deberán permitir el crecimiento, maduración, reproducción y comportamiento normal de los animales, de conformidad con las normas que la propia institución emita.

**ARTÍCULO 126.-** El titular de la institución de salud en donde se realice investigación a la que se refiere este Capítulo, deberá establecer y vigilar el cumplimiento de las medidas de seguridad para el cuidado y manejo de los animales, así como las medidas de profilaxis y vacunación necesarias para la protección del personal ocupacionalmente expuesto.