

Mtra. María Elena Contreras Garfias
 Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
 PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

Datos del Alumno

Nombre :	
Matrícula :	Licenciatura :
Domicilio :	
Teléfono :	Celular :
Correo Electrónico :	CURP :

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto :							
Lugar donde se realizó el Servicio Social :							
Dependencia :							
Entidad Federativa :							
Municipio :				Localidad :			
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

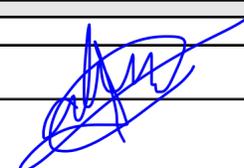
Sector: _____ Tipo: _____

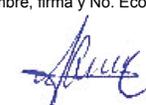
Orientación: _____

FIRMAS


 Asesor Interno
 Nombre, firma y No. Económico


 Alumno
 Nombre, firma


 Asesor Externo
 Nombre, firma y No. Económico


 M. en C. Alma E. Ibarra Cázares 32807
 Vo. Bo. de la Comisión
 Nombre y firma de la persona que autoriza



México, D.F. a 12 de agosto de 2021

DR. Juan Esteban Barranco Florido
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

PRESENTE

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que la alumna Islas Díaz Diana con matrícula 2153054223 quien es egresada de la licenciatura en Química Farmacéutica Biológica en la institución que usted presenta ha concluido su servicio social y su proyecto denominado "Evaluación del efecto neuroprotector de la dapsona asociado al dolor neuropático después de una lesión traumática de la médula espinal en rata modalidad a distancia", que debido a la contingencia sanitaria causada por el virus del SARS-CoV-2, la alumna llevó a cabo vía remota el análisis de datos y resultados del 12 de Febrero de 2021 al 12 de Agosto de 2021, concluyendo satisfactoriamente su servicio social cubriendo las 480 horas reglamentarias.

Agradeciendo su atención a la presente, queda de usted.

ATENTAMENTE

Ríos Castañeda Luis Camilo
Asesor interno
Profesor titular C
No. Económico 16190





México, D.F. a 12 de agosto de 2021

DR. Juan Esteban Barranco Florido
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

PRESENTE

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que la alumna Islas Díaz Diana con matrícula 2153054223 quien es egresada de la licenciatura en Química Farmacéutica Biológica en la institución que usted presenta ha concluido su servicio social con el proyecto denominado Evaluación del efecto neuroprotector de la dapsona asociado al dolor neuropático después de una lesión traumática de la médula espinal en rata modalidad a distancia, que debido a la contingencia sanitaria causada por el virus del SARS-CoV-2, la alumna llevó a cabo vía remota el análisis de datos y resultados del 12 de Febrero de 2021 al 12 de Agosto de 2021, concluyendo satisfactoriamente su servicio social cubriendo las 480 horas reglamentarias.

Agradeciendo su atención a la presente, queda de usted.

ATENTAMENTE

Mata Bermúdez Alfonso

Asesor externo

Cédula profesional 08807411





**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA**
Unidad Xochimilco



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
LICENCIATURA QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

ALUMNA: ISLAS DÍAZ DIANA

MATRÍCULA: 2153054223

PROYECTO: EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA DAPSONA ASOCIADO AL DOLOR NEUROPÁTICO DESPUÉS DE UNA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL EN RATA MODALIDAD A DISTANCIA.

LUGAR DE REALIZACIÓN: INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA. "MANUEL VELASCO SUÁREZ".

PERIODO DE REALIZACIÓN: 12 DE FEBRERO DE 2021 - 12 DE AGOSTO DE 2021.

Vo.Bo.
ASESOR INTERNO
RÍOS CASTAÑEDA LUIS CAMILO

Vo. Bo.
ASESOR EXTERNO
MATA BERMUDEZ ALFONSO

Contenido

I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES.....	3
Médula Espinal.....	3
Lesión de médula espinal.....	7
Fisiopatología de la lesión de médula espinal	7
Lipoperoxidación y especies reactivas de oxígeno	9
Dapsona.....	10
OBJETIVOS	13
GENERAL.....	13
ESPECÍFICOS	13
METODOLOGÍA	13
ACTIVIDADES REALIZADAS	14
Procedimiento quirúrgico: Modelo de lesión traumática de la médula espinal en rata	14
Cuantificación: Ensayo de lipoperoxidación.....	14
Determinación de concentración de GHS.....	15
Tratamiento farmacológico	15
Análisis estadístico.....	15
OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS	16
RESULTADOS	16
Evaluación del efecto preventivo y neuroprotector del tratamiento con dapsona, disminución de la lipoperoxidación, y la recuperación de los niveles de glutatión en ratas con lesión traumática de la médula espinal.	16
CONCLUSIONES	18
RECOMENDACIONES.....	18
BIBLIOGRAFÍA.....	19

I. INTRODUCCIÓN

En el presente proyecto, se aborda la fisiopatología de la lesión traumática de la médula espinal en modelos experimentales debido, a que este padecimiento es de gran importancia por las consecuencias graves y el impacto que tiene en la calidad de vida de los pacientes.

La lesión traumática de médula espinal surge de la consecuencia de caídas, violencia, o accidentes, resultando en la interrupción parcial o completa de la comunicación entre el cerebro y las regiones del cuerpo debajo del nivel de la lesión. Esto, conlleva al sufrimiento de los pacientes, pues el dolor es una de las condiciones que padecen las personas lesionadas.

La lesión en médula espinal es efectora de una variedad de cambios simultáneos en el organismo. Se produce isquemia e inflamación, que logra efectos fisiológicos que repercuten al organismo que ocasionan dolor y surgimiento de radicales libres lo que ocasiona estrés oxidativo en el organismo. (Genovese, T. et al., 2007).

Con ello, surge la necesidad de encontrar alternativas farmacológicas de tratamiento para el daño ocasionado, y también proteger a las células de los efectos ocasionados por el trauma. (Díaz et al., 2016). La dapsona, un fármaco antiinflamatorio, disminuye la actividad de la mieloperoxidasa, la lipoperoxidación, mejora la función neurológica y aumenta la cantidad de tejido libre después de lesión en médula espinal en ratas. (Ríos et al., 2015).

La importancia de este trabajo fue evaluar el efecto neuroprotector de la dapsona, con base en la cuantificación de la lipoperoxidación y la concentración de glutatión reducido.

II. ANTECEDENTES

Médula Espinal

La médula espinal, forma parte del sistema nervioso central (SNC). La cual, deriva del tubo neural en la porción segmentada del embrión, al igual que el cerebro, ésta se encuentra rodeada de líquido cefalorraquídeo y de meninges. En los adultos, la médula espinal se extiende del foramen magnum hasta la L1-L2. Presenta dos abultamientos fusiformes a nivel cervical y lumbar y, en su extremo inferior, se adelgaza formando el cono medular, que termina en una porción fibrosa y estrecha llamada *filum terminale*, el cual, se fija en el sacro y el cóccix.

Los cortes transversales de la médula espinal tienen la forma de mariposa, donde se encuentra la materia gris central, y dos regiones distintas, los cuernos dorsales y ventrales.

Cabe destacar que, sólo en la médula espinal torácica y lumbar, es visible un tercer cuerno, el cuerno (intermedio)lateral, donde se encuentran neuronas que pertenecen al sistema nervioso autónomo (SNA). El cuerno lateral torácico, contiene específicamente neuronas simpáticas preganglionares. En todos los segmentos, la conexión central de la materia gris (comisura gris anterior y materia gris intermedia, respectivamente), rodea el canal central, que está revestido por células ependimarias y contiene líquido cefalorraquídeo. (Weidner et al., 2017)

La médula espinal humana se subdivide en un total de 31 segmentos:

- Vértebras cervicales (8): Cuello
- Vértebras dorsales (12): Unidas a la caja torácica
- Vértebras lumbares (5): Situadas en la parte inferior de la espalda
- Vértebras sacras (5): Situadas en la cadera
- Vértebras coccígeas (4 fusionadas): Cóccix

De cada segmento, se origina un par de raíces dorsales y ventrales, que se componen de dorsal y ventral y salen juntas de la médula espinal en la correspondiente depresión anterolateral y posterolateral, respectivamente. (Weidner et al., 2017). Este punto de salida, (fila radicularia) es una continuidad a lo largo de la médula espinal. Las raíces dorsales contienen, los ganglios de la raíz dorsal (espinal), que se encuentran dentro de los agujeros intervertebrales, compuestos por neuronas pseudounipolares, que dan lugar a un único axón con una bifurcación en un proceso central y otro periférico. (Weidner et al., 2017)

La médula espinal tiene dos regiones, una de ellas compuesta por la sustancia (materia) gris y otra, por la sustancia (materia) blanca. La materia gris de la médula espinal aparece en el corte transversal como una región en forma de H o mariposa. Cada mitad simétrica, consta de un cuerno dorsal, que incluye una cabeza cuello y base, una región intermedia y un cuerno ventral. (Darby et al., 2014)

Un pequeño cuerno lateral adicional situado entre los cuernos dorsal y ventral está presente en los segmentos de la cuerda T1 a L2 o L3.

En general, el cuerno dorsal es un receptáculo para la entrada sensorial aferente, y el cuerno ventral está implicado en funciones motoras, incluyendo el alojamiento de los cuerpos celulares de las neuronas motoras.

Microscópicamente, la materia gris es una región densa de cuerpos celulares de las neuronas, procesos celulares y sus sinapsis, células y capilares. (Darby et al., 2014)

Por otro lado, la materia blanca, se encuentra en la periferia de la materia gris, contiene axones mielinizados y no mielinizados, células gliales y capilares, consta de tres regiones: un funículo dorsal (columna) entre los cuernos dorsales, un funículo lateral (columna) entre cada

cuerno dorsal y el cuerno ventral, y un funículo ventral (columna) entre los cuernos ventrales. Los tractos, o fascículos, están presentes dentro de cada una de estas regiones. Pueden ser tractos ascendentes, que transmiten información sensorial a los centros superiores, o tractos descendentes, que se originan en centros superiores y envían señales descendentes a la médula. (Darby et al., 2014)

[Meninges de la médula espinal.](#)

Las meninges, protegen y dan soporte al encéfalo y la médula espinal del exterior hacia adentro, estas son la duramadre, la aracnoides y la piamadre, la importancia de esta (piamadre) es proporcionar estabilidad a la medula en el canal vertebral gracias a los ligamentos dentados, forma parte de las leptomeninges con la aracnoides y se adhiere a la superficie de la médula espinal. Es una membrana altamente vascularizada, se extiende debajo del cono medular como el *filum terminale*, dentro de la cisterna lumbar que conecta con el cóccix, la aracnoides es una capa delicada que se encuentra adherida a la duramadre por presión de líquido cefalorraquídeo (LCR) y las células del borde dural, también forma parte de las leptomeninges con la piamadre, su función es recubrir la duramadre, ambas se extienden cerca S2 (aunque la médula espinal termina en el nivel L1 o L2), creando una cisterna lumbar grande, finalmente, la duramadre es la capa externa que no es flexible, se extiende a S2, la parte inferior de la médula espinal es el saco dural, rodea la médula espinal continúa con la capa meníngea de la duramadre en la bóveda craneal. (Gould, 2014)

La médula espinal también está dividida en segmentos, donde se lleva a cabo la conexión entre los nervios raquídeos hacia regiones específicas del cuerpo. (De Jesús, 2014)

- Nervios raquídeos cervicales: C1-C8, controlan señales que van a la cabeza, cuello, hombros, brazos manos y diafragma.
- Nervios raquídeos dorsales T1-T12, señales que van a los músculos torácicos, los bajos de la espalda y partes bajas del abdomen.
- Nervios raquídeos lumbares L1-L5, controlan las señales que van a la parte baja del abdomen, espalda, glúteos, algunas partes de órganos genitales y zonas de las piernas.
- Nervios raquídeos sacros S1-S5, controlan señales que van a los muslos, parte inferior de las piernas, mayoría de órganos genitales y alrededor del ano.
- Nervio coccígeo: Transmite información sensitiva de la piel de la región inferior de la espalda.

[Neuronas](#)

Son las subunidades estructurales y funcionales básicas del sistema nervioso; están especializadas para responder a estímulos físicos y químicos, conducir impulsos electroquímicos, y liberar reguladores químicos. Por medio de estas actividades, las neuronas permiten la percepción de estímulos sensoriales, el aprendizaje, la memoria, y el control de músculos y glándulas, se integran por un cuerpo celular, dendritas y un axón.

Las motoneuronas llevan a cabo las señales a los órganos efectores, las neuronas sensoriales reciben señales de los receptores además de función integradora y las interneuronas conectan con las motoneuronas.

Microglía

Las células gliales se clasifican, según su morfología, función y localización, en: 1) microglía, las únicas células gliales de origen inmunitario, que llegan al cerebro a través de la sangre durante el desarrollo temprano; 2) astrocitos, y 3) células de Schwann y oligodendrocitos, que forman capas de mielina alrededor de los axones en el sistema nervioso periférico y central, respectivamente. (Vivancos et al., 2013), a diferencia de las neuronas, la microglía tiene un origen mesodérmico.

Astrocitos

Se encuentran la mayoría en las células del sistema Nervioso central, funcionan como barrera hematoencefálica, amortiguador iónico, cicatriz glial, soporte estructural, pila de neurotransmisores, soporte metabólico, reserva de glucógeno y modificador sináptico, los astrocitos fibrosos se encuentran en la sustancia blanca, el protoplásmico en la sustancia gris y radial juega un papel importante en la guía de la migración neuronal durante el desarrollo.

Oligodendrocitos

Los oligodendrocitos son las células que mielinizan a los axones envolviéndolos mediante una vaina multiestratificada de mielina. La mielina está presente en todo el SN y está particularmente concentrada en áreas donde hay principalmente axones (en el SNC, se conoce como la materia blanca. (Gómez, 2014). Éstos, se encuentran en la materia gris denominados oligodendrocitos perinuerales, los oligodendrocitos son más pequeños que los astrocitos y tienen más cortos y menos ramas, no contienen neurofilamentos, en la materia blanca, se encuentran en filas a lo largo de fibras mielinadas y se conocen como oligodendrocitos interfasciculares. (Ikezu et al., 2018)

Células de Schwann

Son células aplanadas con un núcleo alargado orientado longitudinalmente a lo largo de la fibra nerviosa. La superficie de todos los axones en nervios periféricos es recubierta por estas células no mielinizantes o mielinizantes. (Ikezu et al., 2018)

Se encuentran en dinámica comunicación con los axones neuronales ya que tiene influencia en la regulación del desarrollo, mantenimiento y función de los nervios periferales, además de la regeneración periferal. Los nervios, posterior a una lesión son capaces de sostener la remielinación en los axones del sistema nervioso central. (Lavdas, 2014)

Lesión de médula espinal

La médula espinal contiene neuronas que controlan y coordinan diversas funciones fisiológicas, sufrir una lesión en la misma puede traer graves consecuencias a diversos sistemas. La mayoría de las lesiones son causadas con algún golpe en la columna vertebral, algunas de estas lesiones pueden sanar, sin embargo, otras en la mayoría de los casos resultan en lesiones permanentes, causando una parálisis. Las lesiones de la médula espinal se clasifican por la columna vertebral según el nivel en donde ocurren, y este nivel dicta el probable impedimento o impedimentos que ocurrirá por la lesión; por ejemplo, una lesión en la región sacra de la columna comúnmente puede afectar la función del intestino y la vejiga.

La lesión, afecta funciones motoras y autonómicas lo cual conduce a severas complicaciones secundarias, que repercute en la calidad de vida de los pacientes. Se ha demostrado que el dolor estaba asociado con las percepciones de los pacientes sobre su funcionalidad cognitiva, física y emocional después de la lesión de médula espinal. (Hatch et al., 2018.)

Fisiopatología de la lesión de médula espinal

Una lesión traumática en la médula espinal se puede observar en dos momentos, el primero, el trauma mecánico, resulta de la destrucción del parénquima neural y no se puede remediar, ya que es un daño disruptivo a los axones, vasos sanguíneos y a las células gliales. A partir de entonces, se activan sucesivamente procesos que causan daños secundarios, lo que conduce a una propagación de la lesión dentro del tejido neural inicialmente salvado por el traumatismo. (Weidner et al., 2017)

El dolor crónico ha estado asociado con la depresión, fatiga crónica y disminución de la calidad de vida. El problema principalmente yace en el dolor después de la lesión pues es multifactorial y complejo. Los daños primarios corresponden a la disrupción mecánica, de axones, y otras membranas pertenecientes a las células gliales, además de perjudicar los vasos sanguíneos y causando microhemorragias en la sustancia gris.

En modelos animales, la lesión traumática usualmente es ocasionada por contusión directa o compresión de la médula espinal. (Weidner et al., 2017) Los cambios que ocurren en la segunda fase (como fase aguda) de la lesión es causada por la permeabilización celular, señalización pro-apoptótica y daño isquémico debido a la destrucción del soporte microvascular de la médula espinal en minutos después del daño, en las hemorragias severas reportadas influyen células inflamatorias como citocinas y péptidos vasoactivos, aumentando el nivel de las citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral y la IL-1B. (Ahuja et al ., 2017), la llegada de células inflamatorias (macrófagos, neutrófilos y linfocitos) a la médula espinal permanecen en la médula más allá de la fase subaguda.

Aunado a la respuesta inflamatoria en las fases aguda y subaguda descritas, se combina la ruptura de la barrera hematoencefálica, la inflamación lleva a una gran compresión mecánica en la médula y se extiende a segmentos de la columna vertebral empeorando la lesión. (Ahuja et al., 2017) La isquemia y necrosis conducen a la acumulación de glutamato extracelular el cual inicia el proceso de excitotoxicidad, siguiendo en este periodo, la reperfusión alrededor del tejido está asociado con el incremento perjudicial de radicales libres.

Como se ha mencionado, el trauma ocasionado induce citotoxicidad y edemas iónicos y vasogénicos. El compartimiento intracelular abarca aproximadamente el 70% del líquido del SNC, lo cual es rico en K^+ y pobre en Ca^{2+} y Na^+ comparado con el compartimiento extracelular e intersticial. Durante la isquemia, el agotamiento del ATP comprometerá el mantenimiento del gradiente produciendo demasiado Na^+ , seguido del flujo pasivo de Cl^- por los canales de cloro y de moléculas de agua a través de canales de agua. Durante la isquemia, el agotamiento del ATP comprometerá el mantenimiento del gradiente y se producirá una masivo de Na^+ , acompañado de un flujo pasivo de Cl^- a través de los canales de cloruro y de moléculas de agua a través de los canales de agua de las acuaporinas. Esta afluencia de solutos y agua en el compartimiento intracelular provoca la hinchazón de la célula y la pérdida de la integridad del citoesqueleto que conduce a la muerte celular. Además, la estimulación del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) durante la excitotoxicidad favorece la entrada de Na^+ , Cl^- y agua en las neuronas y la glía.

La fase aguda temprana de la lesión de médula espinal tiene lugar aproximadamente entre 2 y 48 horas después de la lesión, la cree que la muerte celular aguda causada por necrosis es incontrolable, ya que se llega a un daño secundario fulminante durante el periodo de producción de radicales libres, desregulación iónica, excitotoxicidad mediada por glutamato neurotoxicidad asociada a la inmunidad, provocando una lesión axonal adicional, la muerte celular y la propagación de la lesión en el tejido circundante. (Weidner et al., 2017)

La excitotoxicidad se relaciona con el incremento de las concentraciones de glutamato debido a la activación de los receptores de glutamato causando muerte celular, indicando que sus concentraciones son tóxicas y suficientes para inducir la muerte de las células. El glutamato es un neurotransmisor que se encuentra en el SNC que se une a los receptores ionotrópicos como NMDA, receptor AMPA, receptores de kainato, así como los receptores metabotrópicos. La excitotoxicidad no solo daña la sustancia gris sino también causa daño secundario en la sustancia blanca. El glutamato se libera por la ruptura mecánica directa de las células y, en menor medida, de las células apoptóticas y necróticas.

El daño que se genera en la sustancia blanca es debido a la falla en los gradientes de Na^+ y K^+ a través de las membranas axonales después de la lesión medular causarán una inversión del transporte de glutamato dependiente del Na^+ y, en consecuencia, un importante flujo de

glutamato, por otro lado, en la sustancia gris, no hay equilibrio homeostático, lleva a incremento en los niveles de Ca^{2+} y la liberación local de glutamato en la sinapsis, y con ello, los axones pueden descargar cantidades tóxicas de glutamato celular cuando los niveles de calcio son elevados.

El mecanismo de excitotoxicidad de la sustancia gris se encuentra asociada con los receptores ionotrópicos de glutamato, particularmente receptores de NMDA, su activación por el glutamato promueve una muerte celular retardada (entre 1 y 7 días después de la lesión) de la neurona y la glía. La aplicación del agonista del receptor (MK-801) para bloquear la activación del receptor NMDA poco después de la LME mejoró la recuperación motora y redujo la formación de edema. Del mismo modo, la administración de un agonista de los receptores de aminoácidos excitatorios no NMDA (NBQX) dio lugar a un menor tamaño de la lesión y a un mejor estado neurológico caudal al lugar de la lesión.

Además, una activación excesiva de los receptores de glutamato metabotrópicos del grupo I regulará al alza la expresión de los receptores NMDA y, por tanto, también aumentará indirectamente la afluencia de calcio. La afluencia de Ca^{2+} a través de los receptores de glutamato ionotrópicos, como el receptor NMDA, conducirá a la muerte celular a través de la activación de varias cascadas de daño secundario, incluyendo la degradación proteolítica de los componentes del citoesqueleto (como la espectrina, la proteína asociada a los microtúbulos 2 (MAP2) y los neurofilamentos), la peroxidación lipídica, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el fallo respiratorio mitocondrial. (Weidner et al ., 2017)

Lipoperoxidación y especies reactivas de oxígeno

Además de la generación de radicales libres mitocondriales, la acidosis observada después de la LME promueve la liberación de las reservas de hierro intracelular fuertemente secuestradas de la ferritina y la transferrina. La oxidación espontánea del Fe^{2+} en Fe^{3+} también generará radicales superóxidos. Además, la reacción del Fe^{3+} con el peróxido de hidrógeno generará radicales hidroxilos altamente reactivos a través de la llamada reacción de Fenton. Los ROS (especies reactivas de oxígeno) y RNS (especies reactivas de nitrógeno) tóxicos generados en condiciones patológicas reaccionan sobre numerosos objetivos. La peroxidación de los lípidos procede de acuerdo con tres pasos distintos, primero, en el que las especies de oxígeno altamente reactivas reaccionan con los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana y toman un electrón de los carbonos alílicos para generar un lípido reactivo. Este lípido reactivo, interactuará con un radical superóxido para formar un radical peroxilo lipídico. Este último reaccionará en el ácido graso vecino, y causará de nuevo la producción de un lípido reactivo. La propagación de esta reacción continuará hasta que el lípido reactivo se apague con otro o hasta que no haya más lípidos insaturados disponibles.

Este último paso, la terminación, genera dos productos tóxicos de peroxidación, a saber, el 4-hidroxinonenal (HNE) y el 2-propenal. La carbonilación de los aminoácidos es también un importante daño asociado a los radicales libres, responsable del aumento de la oxidación de las proteínas observado tras una lesión traumática de la médula espinal. Del mismo modo, el RNS puede nitrar los residuos de tirosina para dar lugar a 3 nitrotirosinas (3-NT), que es un marcador específico del daño proteico. (Weidner et al., 2017).

Los procesos de oxidación de proteínas y de peroxidación de lípidos desempeñan un papel importante en la cascada de daño secundario que sigue a la lesión de médula espinal. Por ejemplo, la peroxidación lipídica exacerbará el desequilibrio iónico al desestabilizar varias membranas, por ejemplo, la membrana citoplasmática o el retículo endoplásmico. Además, la peroxidación lipídica contribuye a la inhibición de la Na⁺/K⁺ ATPasa, lo que empeora la acumulación intracelular de Na⁺. El estrés oxidativo también puede atacar a las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial, alterar el ADN, etc. y provocar un colapso metabólico con la consiguiente muerte celular necrótica o apoptótica. (Weidner et al., 2017)

La generación excesiva de estas moléculas y el daño oxidativo en los componentes celulares de denomina estrés oxidante, que incluye, el daño macromolecular que se considera en términos de mecanismos oxidativos ligados a los radicales libres y la interrupción de los circuitos redox de tiol, lo que conduce a una señalización celular aberrante y un control redox disfuncional.

Dapsona

Desde 1937 se reportó que las sulfonas inhibían el crecimiento de varias bacterias patógenas, tales como *Streptococci*, *Staphylococci*, *Gonococci*, *Pneumococci*, *Mycobacteria lepra*, el bacilo de la tuberculosis.

Fórmula: C₁₂H₁₂N₂O₂S

Nombre químico: 4,4'-diaminofenilsulfona.

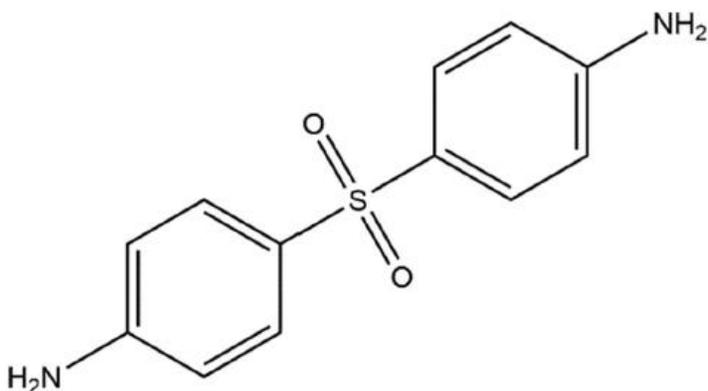


Fig. 1. Molecular structure of DAP.

Utilizado como droga bacteriostática, útil para el tratamiento de la lepra, tuberculosis, malaria, sarcoma Kaposi, dermatitis y AIDS-neumonía. De acuerdo con el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS), la dapsona es clasificada como compuesto de clase IV, el cual tiene baja solubilidad en agua, lo que resulta en un bajo índice terapéutico. (Li et al., 2019)

Farmacocinética

Por vía oral es absorbida en el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad mayor al 86%. Las sulfonas di sustituidas, como la sulfoxona, son pobremente absorbidas después de su administración oral y grandes cantidades excretada en heces. En voluntarios sanos, después de 100mg de administración oral la concentración máxima en suero fue entre 1.10 y 2.33 mg/L alcanzado 0.5 a 4 horas.

La vida media de eliminación de 12 a 30 horas. 24 has después de la ingresa oral de 100mg de dapsona, la concentración en plasma fue de 0.4 a 1.2mg/ L. La concentración terapéutica en suero es de 0.5 a 5 mg/L para lepra. Los niveles de suero se estabilizaron después de 8 a 10 días de terapia. En niños, la farmacocinética es similar a los adultos, una dosis de 2 mg/ kg diario o 4 mg/kg semanal en una concentración máxima equivalente a la de los adultos que alcanzaron al recibir 100mg de tabletas diario.

Distribución

Es aproximadamente el 70% vinculado a proteínas su metabolito mono acetilado es casi vinculado a proteína. Distribuida en todo el cuerpo hígado, riñones, piel y eritrocitos, ya que atraviesa la barrera hematoencefálica, placenta y se ha encontrado en leche materna.

Después de su absorción por el tracto gastrointestinal, la dapsona es transportada a través de la circulación hacía el hígado. Donde es metabolizado por acetilación o N-hidroxilación, en esta última vía, se produce la hidroxilamina, metabolito potencialmente toxico producido por las enzimas del citocromo P-450 mientras que en la vía de acetilación por la N-acetiltransferasa se producen metabolitos no tóxicos mono acetil dapsona y diacetil dapsona.

Excreción

A cerca del 85% de la dapsona es excretada por orina, como glucurónicos, cerca del 10% es excretada en la bilis. Después de una dosis individual que daña, cerca del 50% es excretada durante las primeras 24 horas. Su excreción puede ser disminuida por administración de probenecid e incrementado por rifamipin.

Actividad terapéutica

Antibiótico que actúa como las sulfonamidas, inhibiendo la síntesis del ácido dihidrofólico a través de la competencia con para-aminobenzoato para el sitio activo de dihidropteroato sintetasa. Por lo tanto, la dapsona inhibe el crecimiento de los microorganismos dependientes de la síntesis endógena del ácido fólico.

La eliminación de las bacterias, en infecciones inducidas experimentalmente en ratones apareció estar asociados con efectos secundarios, las sulfonas fueron consideradas como tóxicas en el tratamiento de infecciones en el ser humano.

Los efectos secundarios fueron el resultado de las excesivas dosis de dapsona administradas en esos tiempos, comparadas con la de hoy en día. En los años cuarenta los estudios sobre Dapsona y algunas sulfonas continuaron y demostraron su uso eficaz en el tratamiento de la lepra, así como de otras enfermedades infecciosas. En 1950 se asumió que la dermatitis herpetiforme era una enfermedad infecciosa, y hallaron que el efecto de las sulfonas sobre este mal resultaba positivo.

Actividad antiinflamatoria

La dapsona es efectiva en las dermatosis con acumulación de neutrófilos, a través de muchos mecanismos potenciales. La dapsona interfiere en la migración quimiotáctica de los neutrófilos y en la adherencia mediada por la integrina (CD11b/CD18) de los neutrófilos humanos *in vitro*.

La dapsona interfiere en la activación o la función de la proteína G (tipo Gi) que inicia la cascada de transducción de señales común a los estímulos quimiotácticos. Esta inhibición suprime el neutrófilo la contratación y la producción local de sustancias tóxicas respiratorias y productos de secreción.

Los oxidantes no sólo son importantes para la eliminación de las bacterias, sino que también participan en el daño de los tejidos de los transeúntes en muchos procesos de enfermedad. El ácido hipocloroso, el oxidante más importante, es producido por la enzima mieloperoxidasa (MPO) que contiene hemo en los neutrófilos y por la peroxidasa eosinófilo. Los estudios *in vitro* han demostrado que la dapsona inhibe la yodación y la citotoxicidad mediadas por la MPO de los neutrófilos en concentraciones comparables a los niveles séricos obtenidos por dosis terapéuticas.

La dapsona parece unirse a la MPO, convirtiéndola irreversiblemente en un compuesto inactivo (compuesto II), con la modificación química del sitio activo enzimático. Se comprobó que la eosinofilperoxidasa es aún más sensible a la inhibición por la dapsona que la MPO. Así pues, la dapsona parece proteger a las células de las lesiones mediadas por los neutrófilos y los eosinófilos al inhibir directamente la generación de radicales tóxicos derivados del oxígeno. Así pues, la dapsona parece proteger a las células de las lesiones mediadas por los neutrófilos y los eosinófilos al inhibir directamente la generación de radicales tóxicos derivados del oxígeno, mediante múltiples mecanismos, la dapsona reduce la liberación de prostaglandinas y leucotrienos y bloquea sus efectos inflamatorios. El suero de un paciente que toma dapsona, se inhibía la adherencia de los neutrófilos, mientras que el suero del mismo paciente cuando no se recibe dapsona no tuvo ningún efecto inhibitorio. (Zhu et al ., 2001)

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto neuroprotector y antioxidante de la administración de antagonistas del receptor NMDA como la dapsona en un modelo de lesión traumática de la médula espinal en rata.

ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la administración de dapsona como tratamiento preventivo y neuroprotector de la alodinia táctil, hiperalgesia mecánica que se presentan como consecuencia de una lesión traumática de la medula espinal, utilizando el paradigma de ensayo up-Down.
2. Desarrollar el análisis de resultados reportando la acción antioxidante y cantidad de glutatión reducido con base en los datos experimentales obtenidos.
3. Evaluar el efecto antioxidante de la dapsona a través de la cantidad de productos finales de la lipoperoxidación presente en el tejido dañado, después de una lesión traumática de la médula espinal en rata.
4. Analizar el efecto de la dapsona sobre el estado redox en el tejido dañado, midiendo las concentraciones de glutatión reducido después de una lesión traumática de la médula espinal en rata.

METODOLOGÍA

Con base en la literatura y, los datos obtenidos de la parte experimental que, se realizó antes de la contingencia sanitaria causada por el virus del SARS-CoV-2 en la Ciudad de México, se determinó la cuantificación del ensayo de lipoperoxidación a partir de la evaluación del efecto antioxidante, así como el ensayo de glutatión reducido.

De acuerdo con el análisis de las pruebas bioquímicas se evaluó el efecto neuroprotector de la dapsona posterior a la lesión traumática de médula espinal en modelos animales. Finalmente, se llevó a cabo el análisis estadístico de los resultados y datos experimentales obtenidos y finalmente llegar a las conclusiones.

ACTIVIDADES REALIZADAS

Procedimiento quirúrgico: Modelo de lesión traumática de la médula espinal en rata.

Los modelos experimentales que se utilizaron en el estudio se distribuyeron en dos grupos, uno de ellos (Sham) solo se les realizó la laminectomía y al grupo que se le realizó la lesión traumática de médula espinal (LTME). Éstos se sometieron a cirugía por contusión de acuerdo con Basso, (Basso et al., 1996), anestesiados con pentobarbital a 50mg/kg (i.p). Bajo condiciones adecuadas, se realizó una incisión extendida seguida de una laminectomía, a partir de la región torácica media a baja, pasando por la zona caudal T10 y T12 para exponer la médula espinal manteniendo la duramadre.

La contusión se llevó a cabo con un dispositivo impactador de caída libre con peso de la Universidad de Nueva York (NYU), dejando caer un cilindro de 10 g de peso a 6.25mm de altura. (Kim et al., 2012). Posterior se suturó la zona donde se llevó a cabo el procedimiento quirúrgico, los animales se mantuvieron en área de recuperación (Schroer Manufacturing Co., Kansas City, MO, EE. UU.), posterior a ello, se alojaron en jaulas de acrílico transparente individualmente bajo correctas condiciones, acceso *ad libitum* al agua y alimento. Se les administró ciprofloxacino, 1mL s.c cada 12h durante 7 días o bencilpenicilina benzatina 1.200.000 U. I (dosis de 100ml/kg una sola dosis) y paracetamol en el agua de bebida (Tempra jarabe infantil) 10 ml en 2 litros de agua durante 7 días (Díaz et al., 2011).

Cuantificación: Ensayo de lipoperoxidación

Durante el ensayo, se ocuparon muestras de tejido de médula espinal de la doceava vértebra torácica de 2mm rostral y 2mm caudal de la lesión del grupo de las ratas a las que solo se les realizó la laminectomía (grupo Sham). Las presentes muestras se mantuvieron en congelación en nitrógeno líquido almacenadas a -70°C hasta su análisis de acuerdo Triggs y Willmore (Triggs et al., 1984) y modificada por Díaz-Ruíz, (Díaz et al., 1999).

Cada una de las muestras obtenidas se homogeneizaron en 3mL de solución salina (NaCl 0.9%), y se realizaron alícuotas de 1mL del homogeneizado a 4mL de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v/v). Se llevó a agitación con un intervalo de enfriamiento en hielo durante 30 minutos para lograr separación de fases. El cloroformo fue medido por fluorescencia en un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS50B a 370 nm de excitación y 430 nm de emisión, utilizando una solución estándar de quinina (0.1g/mL) ajustando a 150 unidades de fluorescencia. Los resultados se indicaron como unidades de fluorescencia/g de tejido. La significancia estadística de las diferencias de la peroxidación lipídica entre grupos se determinó mediante el análisis de varianza seguido de la prueba de Tukey, utilizando el software SPSS (Díaz et al., 1999).

Determinación de concentración de GHS

Para llevar a cabo la determinación, se cuantificó el glutatión reducido de acuerdo con el método descrito por Hissin y Hilf (Hissin & Hilf, 1976). La preparación de la solución estándar de Glutatión reducido, se hizo diariamente en fosfato de sodio, buffer de EDTA 5mM (pH 8) y se mantuvo en hielo hasta su uso, una segunda solución, fue de o-ftalaldehído (OPA) se preparó diariamente en metanol absoluto de grado reactivo justo antes de su uso.

El tejido medular se homogeneizó en 3.75mL de buffer de EDTA-fosfato (pH 8) más 1mL de HPO_3 (25%), se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos y se separaron los sobrenadantes, se adicionaron 500 μL del sobrenadante a 4.5mL de buffer de fosfato más 100 μL de o-ftalaldehído. Se incubaron las mezclas durante 15 minutos a temperatura ambiente, y las señales de fluorescencia se obtuvieron en un espectrofotómetro de fluorescencia marca Perkin Elmer LS50B a 350 nm de excitación y 420 nm de longitud de onda de emisión. Los resultados se expresaron micro moles de glutatión por gramo de tejido húmedo (Diaz et al., 2009).

Tratamiento farmacológico

La dapsona se preparó en una solución vehículo (etanol al 15%, propilenglicol al 40% y solución salina fisiológica al 0.9%), de acuerdo con la literatura consultada, se utilizaron 3.1, 6.25, 12.5, y 25 mg/Kg intraperitoneal (i.p). (Diaz et al., 2011), la dapsona se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.).

Análisis estadístico

Para llevar a cabo el análisis de los datos obtenidos, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas ya que se ajusta a los datos de tratamiento y tiempo de prueba como factores en la lesión traumática de médula espinal, se utilizó ANOVA de una vía para analizar el área bajo la curva (ABC) en el modelo y el porcentaje de efecto máximo posible (% MPE) se calculó con la siguiente fórmula de Mata -Bermúdez (Mata et al., 2018).

$$\%MEP = \left(\frac{(ABC_{Farmaco} - ABC_{Vehículo})}{(ABC_{Sham} - ABC_{Vehículo})} \right) \times 10$$

Se recurrió al análisis post hoc utilizando la prueba de Dunnett, considerando significancia estadística de las diferencias en la lipoperoxidación y concentración de glutatión reducido, determinando a través de análisis de varianza seguido de la prueba de Tukey (Diaz et al., 1999). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. Todos los datos se expresan como la media \pm SEM de 6 animales por grupo.

Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico para las ciencias sociales (SPSS).

OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS

1. Se evaluó el efecto preventivo y neuroprotector de la dapsona en la alodinia táctil y la hiperalgesia mecánica a consecuencia de la lesión traumática de la médula espinal.
2. Se evaluó el efecto antioxidante de la dapsona a través de la lipoperoxidación presente en el tejido dañado después de una lesión traumática de la médula espinal en rata.
3. Se analizó el efecto de la dapsona sobre el estado redox en el tejido dañado, de acuerdo con las concentraciones obtenidas de glutatión reducido.
4. Por medio de análisis estadístico se examinaron los resultados obtenidos, reportando la acción antioxidante y cantidad de glutatión reducido en las muestras de tejido lesionado de la médula espinal de rata.

RESULTADOS

Evaluación del efecto preventivo y neuroprotector del tratamiento con dapsona, disminución de la lipoperoxidación, y la recuperación de los niveles de glutatión en ratas con lesión traumática de la médula espinal.

En la siguiente imagen, se muestran los datos obtenidos de la administración de dapsona a partir de 3 horas posteriores a la lesión, una vez al día durante 3 días, en la gráfica A están los grupos control denominados Naive y -Sham, se muestran arriba de los 14 g, indicando que no desarrollaron alodinia táctil.

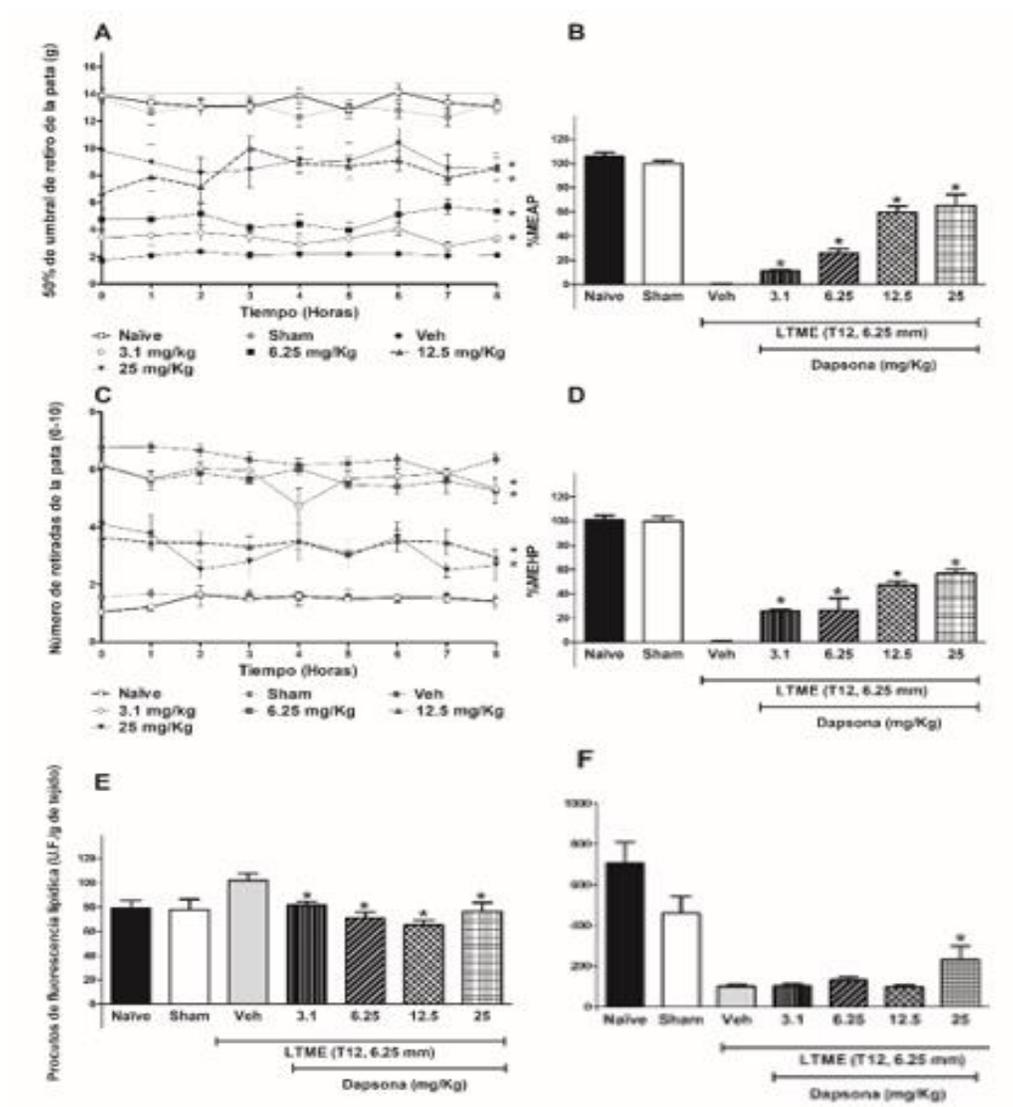
La administración de dapsona a dosis crecientes (3.1-25 mg/Kg, i.p), indica que previno la aparición ($p < 0.05$) de la alodinia táctil de dosis dependiente en las ratas lesionadas. Por otra parte, el efecto mencionado no fue observado en el grupo de ratas lesionadas, pues sólo recibieron el vehículo. Asimismo, en la gráfica B se demuestra que la dosis de dapsona generó un 65.14% que corresponde al porcentaje máximo de efecto antialodinico posible (%MEAP), obteniendo una DE50 de 41.40mmol (IC=3.59 a 29.41). Este porcentaje (%MEAP) se evaluó 15 días después de la lesión traumática de médula espinal.

En la gráfica C, los animales como respuesta, retiraron la pata trasera aproximadamente 2 veces, lo cual indica que no desarrollaron hiperalgesia mecánica. Por otra parte, la administración crónica de dosis crecientes de dapsona (3.1-25 mg/kg, i.p.) evitó el aumento ($p < 0,05$) de manera dosis dependiente el número de veces que el animal retira la pata en respuesta a un estímulo nocivo (5,45, fuerza de 26 g), en contraste, este efecto no fue observado en el grupo de ratas lesionadas a las cuales solo se les administro el vehículo.

La gráfica D indica la dosis de 25mg/Kg de dapsona que alcanzó un porcentaje máximo de efecto antialodinico posible, logrando una DE50 de 21.91 mmol (IC=2.363 a 12.53). Tal

evaluación inducida por la administración de dapsona fue evaluada 15 días después de la lesión traumática en médula espinal.

En la gráfica E se observan los resultados obtenidos de la lipoperoxidación, en donde los grupos control (naive y Sham) representan las ratas normales, a diferencia, se observa que la administración a dosis crecientes de dapsona (3.1-25 mg/kg, i.p.) disminuyen de manera significativa ($p < 0.05$) la lipoperoxidación de acuerdo con el grupo de animales lesionados que solo recibieron el vehículo. Finalmente, en la gráfica F se muestra que la administración de dapsona (25 mg/kg, i.p.) produjo un aumento significativo ($p < 0.05$) en la concentración de GSH por gramo de tejido en comparación con los animales a los cuales solo se les administro el vehículo. Estos datos sugieren que 8 horas después de la administración aguda de dapsona (3.1-25 mg/kg, i.p.) es capaz de disminuir la peroxidación lipídica y la dosis de 25 mg/kg aumenta la concentración de GSH presente en el tejido lesionado.



Efecto preventivo y neuroprotector del tratamiento crónico con dapsona sobre la alodinia táctil, la hiperalgesia mecánica, lipoperoxidación y la recuperación de los niveles de glutatión evaluados en ratas con LTME. Gráfica A) Resultado del curso temporal del 50% del umbral de retiro de la pata sobre el efecto preventivo de la administración crónica (una vez al día durante 3 días) de dapsona (3.1-25 mg/kg, i.p.) sobre la aparición de la alodinia táctil inducida. Gráfica B) Las barras muestran el porcentaje máximo de efecto antialodínico posible (% MEAP). Gráfica C) Curso temporal del número de veces que el animal retira las patas traseras sobre efecto preventivo de la administración crónica (una vez al día durante 3 días) de dapsona (3.1-25 mg / kg, i.p.) sobre la aparición de la hiperalgesia mecánica inducida por la LTME. Gráfica D) Las barras muestran el porcentaje máximo de efecto antihiperalgésico posible (% MEHP) en ratas sin procedimiento quirúrgico (Naïve), ratas a las que solo se les realizó la laminectomía (Sham) y ratas con LTME (vértebra T12, 6.25 mm de intensidad) evaluados 15 días después de la cirugía. ANOVA de medidas repetidas seguido de la prueba de Dunnett. Gráfica E) Resultado de la peroxidación lipídica. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. Los valores se muestran como un porcentaje relativo al control (Veh) tomado como 100% del porcentaje \pm SEM de 6 animales por grupo. * $p \leq 0.05$ respecto al grupo lesionado que solo recibió el vehículo (Vehículo). Gráfica F) Concentración de glutatión reducido (GSH) presente en el tejido lesionado ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. Los valores se muestran como un porcentaje relativo al control (Veh) tomado como 100% del porcentaje \pm SEM de 6 animales por grupo. * $p \leq 0.05$ respecto al grupo lesionado que solo recibió el vehículo

CONCLUSIONES

1. La administración crónica de dosis crecientes de dapsona (3.1-25 mg/kg, i.p.) previene la alodinia táctil de manera dosis-dependiente inducida por la lesión traumática a través de la modulación del estrés oxidativo y la reducción de la excitotoxicidad relacionada a la activación de los receptores de NMDA.
2. La lesión traumática de médula espinal en la doceava vértebra torácica a una intensidad de 6.25 mm y 12.5 mm es capaz de generar alodinia táctil e hiperalgesia mecánica de largo plazo a partir del día 13 hasta el día 30 sin presentar indicios de recuperación asociado a un aumento en la lipoperoxidación y disminución de la concentración de glutatión reducido presente en la médula espinal.

RECOMENDACIONES

1. Diseñar pruebas moleculares para evaluar el efecto de la dapsona en cada etapa de la respuesta inflamatoria según agentes proinflamatorios.
2. Determinar si la neuroprotección suscita la recuperación funcional de la zona lesionada.
3. Proponer cuadro farmacológico que fuese posible aplicarse a pacientes con tal padecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahuja, C., Wilson, J., Nori, S., Kotter, M., Druschel, C., Curt, A., & Fehlings, M. (2017). Traumatic spinal cord injury. . *Nature* .
2. Basso, M., Beattie, M., & Bresnahan, J. (1996). Graded Histological and Locomotor Outcomes after Spinal Cord Contusion Using the NYU Weight-Drop Device versus Transection. *EXPERIMENTAL NEUROLOGY*, 244-256.
3. Darby, S., & Frystak, R. (2014). Neuroanatomy of the Spinal Cord. En G. D. Cramer, *Clinical anatomy of the spine, spinal cord, and ANS*.
4. Díaz, A., Alcaráz, M., Maldonado, V., & Salgado, H. (2009). Differential time-course of the increase of antioxidant thiol-defenses in the acute phase after spinal cord injury in rats. *Neuroscience Letters*.
5. Díaz, A., Ríos, C., Duarte, I., Correa, D., Guizar, G., Grijalva, I., & Ibarra, A. (1999). Cyclosporin-A inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury in rats. *Neuroscience Letters*.
6. Díaz, A., Roldan, E., Ortiz, A., Mondragón, R., Heras, Y., M, M., . . . Ríos, C. (2016). Dapsone improves functional deficit and diminishes brain damage evaluated by 3-Tesla magnetic resonance image after transient cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Brain research*.
7. Díaz, A; Salgado, H; Montes,S; Guizar,G; Gelista,N; Mendez,M;. (2011). Delayed Administration of Dapsone Protects From Tissue Damage and Improves Recovery After Spinal Cord Injury. *Journal of Neuroscience Research*.
8. Genovese, T., Mazzon, E., Esposito, E., Muià, C., Di Paola, R., Di Bella, P., & Bramanti, P. (2007). Role of endogenous glutathione in the secondary damage in experimental spinal cord injury in mice. *Neuroscience Letters*.
9. Gómez, M. (2014). Comunicación entre células gliales y neuronas II. Células gliales que forman mielina. *Revista de medicina e investigación*.
10. Gould, D. (2014). *Neuroanatomía de bolsillo*. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins.
11. Hatch, M., Cushing, T., Carlson, G., & Chang, E. (2018.). Neuropathic pain and SCI: Identification and treatment strategies in the 21st century. *Journal of the Neurological Sciences*.
12. Hissin, P., & Hilf, R. (1976). Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*.
13. Ikezu, T., & Gendelman, H. (2018). Neuroimmune pharmacology.

14. Kim, Y; Cho, H; Ju,A; Kim,J; Wook,Y. (2012). Effect of NMDA NR2B antagonist on neuropathic pain in two spinal cord injury models. *PAIN*.
15. Lavdas, A. (2014). Schwann Cell Morphology. *Elsevier*.
16. Li, W., Ma, Y., Yang, Y., Xu, S., Shi, P., & Songgu, W. (2019). Solubility measurement, correlation and mixing thermodynamics properties of dapsone in twelve mono solvents. *Journal of Molecular liquids*.
17. Mata, A., Izquierdo, T., Monteros, E., & Coen, A. (2018). Antiallodynic effect induced by [6]-gingerol in neuropathic rats is mediated by activation of the serotonergic system and the nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate–adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel pathway. *Wiley*.
18. Ríos, C. O.-S.-C. (2015). Anti-Apoptotic Effects of Dapsone after spinal cord Injury in Rats. *Neurochemistry*, 1243-1251.
19. Triggs, W., & Willmore, J. (1984). In Vivo Lipid Peroxidation in Rat Brain Following intracortical Fe²⁺ + Injection. *Journal of neurochemistry*.
20. Viváncos, G., Pinedo, G., & Guiu, M. (2013). Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *NEUROLOGÍA*.
21. Weidner, N. R., & Tansey, K. (2017). *Neurological aspects of Spinal Cord Injury*. Switzerland: Springer International.
22. Weidner, N; Rupp R; Tansey, K. (2017). *Neurological aspects of Spinal Cord Injury*. Switzerland: Springer International.
23. Zhu, I., & Stiller, M. (2001). Dapsone and sulfones in dermatology: Overview and update: Overview and update. *Academy of Dermatology*.