



INSTITUTO NACIONAL DE  
NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA  
MANUEL VELASCO SUÁREZ

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

Ciencias Biológicas y de la Salud 04960, Mex

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGICA

Informe Final de Servicio Social

**EFFECTO DE LA AMANTADINA SOBRE LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO Y SU  
RELACIÓN CON LA HIPERALGESIA UN MODELO DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE  
MÉDULA ESPINAL EN RATA**

Tutor interno:

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Firma

Tutor externo:

Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz

Firma

Alumna:

Eusebio Garcia Ariadna (2193067946)

2024

# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	3
2.	MARCO TEÓRICO.....	4
2.1	LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL (LTME).....	4
2.2	AMANTADINA.....	4
2.3	TIPOS DE DOLOR.....	4
2.4	HIPERALGESIA Y ALODINIA .....	5
2.5	ÓXIDO NÍTRICO (ON).....	5
3.	JUSTIFICACIÓN.....	6
4.	OBJETIVOS.....	6
4.1	OBJETIVO GENERAL .....	6
4.2	OBJETIVO ESPECÍFICO .....	6
5.	MATERIAL Y MÉTODO.....	6
5.1	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	6
5.2	REACTIVOS Y FÁRMACOS.....	7
5.3	PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO PARA LTME.....	7
5.4	PRUEBAS CONDUCTUALES.....	7
5.4.1	INDUCCIÓN DE HIPERALGESIA.....	7
5.4.2	INDUCCIÓN DE ALODINIA.....	8
5.5	DETERMINACIÓN DE NITRATOS Y NITRITOS (NOx).....	8
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	11
7.	CONCLUSIONES.....	13
8.	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	14

# 1. INTRODUCCIÓN

La lesión medular es un proceso en el cual se ve afectada la médula espinal, dando como resultado una alteración en las funciones motoras, sensitivas y autónomas. Conlleva dolor, afección del sistema urinario, intestinal, entre otras, que permanecerán a lo largo de la vida del paciente (Rodríguez et al., 2020). De acuerdo a la OMS, las principales causas de lesiones medulares son los accidentes de tránsito, las caídas y la violencia. Cabe mencionar que entre el 20% y 30 % de las personas que presentan una lesión medular tienen síntomas depresivos.

Por otra parte, la hiperalgesia es el aumento de dolor con respecto a un estímulo doloroso. El receptor NMDA es quien genera estas respuestas aumentadas, debido a su activación puede ocasionar anomalías en el sistema sensorial y ocasionar la excitación neuronal en la cual se puede presentar manifestar anormales de dolor, como referencia a la hiperalgesia. (Collins et al., 2010). Mientras que la alodinia es la respuesta con respecto a estímulos no dolorosos, es decir, el resultado a la sensibilidad al dolor que es producida por estímulos constantes no dolorosos. (Yam,2018)

Es importante saber que el óxido nítrico es producido por una activación de los receptores NMDA con el óxido nítrico-sintetasa, se ha demostrado mediante una inyección intratecal de donantes de óxido nítrico la inducción a una respuesta hiperalgesia, por el contrario, los inhibidores de la síntesis del óxido nítrico previenen esta respuesta, por lo tanto, el óxido nítrico modula la sensibilidad termoalgésica (Neira et al., 2004).

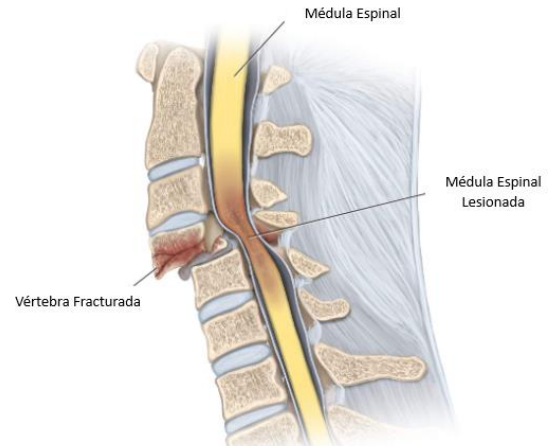
Se ha demostrado que uno de los principales mecanismos implicados en el desarrollo de estos trastornos es la sobre activación de los receptores dependientes del glutamato, especialmente aquellos del receptor NMDA (Antonio et al., 2018). La amantadina es un antagonista glutamatérgico del NMDA, actúa en el receptor NMDA impidiendo la transmisión sináptica excitatoria que conduce a los procesos de alodinia e hiperalgesia, conductas propias del dolor neuropático (Nesterowicz, M., et al, 2023). Podría representar esta una opción terapéutica eficaz que permitiría regular los procesos fisiológicos y contribuir a la disminución de los síntomas depresivos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles de óxido nítrico sobre el efecto de la amantadina en un modelo de lesión traumática de médula espinal en rata con relación a la hiperalgesia, en el cual se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar de 200 a 250 g de peso a las que se les realizó una LTME a nivel de la 12<sup>a</sup> vértebra torácica, con una intensidad de lesión leve. Para desarrollar hipersensibilidad fueron evaluadas con los filamentos de von Frey. Para la obtención de los resultados de óxido nítrico se realizó el ensayo de Griess en la cual se determinaron nitritos/nitratos.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL (LTME)

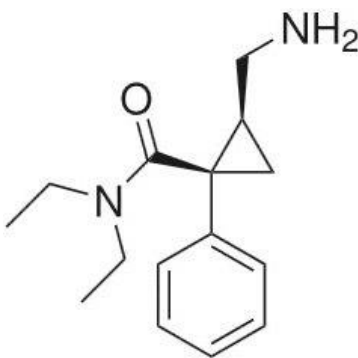
La lesión medular es un proceso en el cual se ve afectada la médula espinal (imagen 1), dando como resultado una alteración en las funciones motoras, sensitivas y autónomas, las cuales se ven reflejadas debajo de la altura donde se esta la lesión. La pérdida funcional y de independencia de la persona, conlleva complicaciones secundarias como dolor, afección del sistema urinario, intestinal, entre otras, que permanecerán a lo largo de su vida (Rodríguez et al., 2020). De acuerdo a la OMS, las principales causas de lesiones medulares son los accidentes de tránsito, las caídas y la violencia. Entre el 20% y 30 % de las personas que tienen una lesión medular presentan síntomas depresivos mayores que el resto de la población en general, así mismo, los tratamientos que se requieren son mucho más costosos en comparación a otras. De acuerdo a una estimación de la OMS en el 2012 se tuvo conocimiento de que cada año entre 250.000 y 500.00 sufren al menos una lesión medular. (OMS,2013).



**Imagen 1.** Ilustración de la columna vertebral, en conjunto con la medula espinal y representación de una fractura de esta.

### 2.2 AMANTADINA

La amantadina es una amina tricíclicos sintética, un fármaco el cual es utilizado en padecimientos como Parkinson, artritis reumatoide, gripe. Esta aumenta la concentración extracelular de la dopamina cuando aumenta su liberación en el cuerpo estriado, puede regular la actividad motora y cognitiva. Además, es un antagonista de baja afinidad del receptor NMDA, actúa en el receptor NMDA impidiendo la transmisión sináptica excitatoria que conduce a los procesos de alodinia e hiperalgesia, conductas propias del dolor neuropático (Nesterowicz, M., et al, 2023). Se ha reportado una acción dopaminérgica de la amantadina, lo que es posible una regulación del sistema serotoninérgico, así mismo una inhibición en la liberación de factores proinflamatorios, estos mecanismos son estudiados en relación con la depresión, lo que hace a la amantadina un fármaco antidepresivo (Wang, 2014)



**Figura 1.** Estructura química de la amantadina

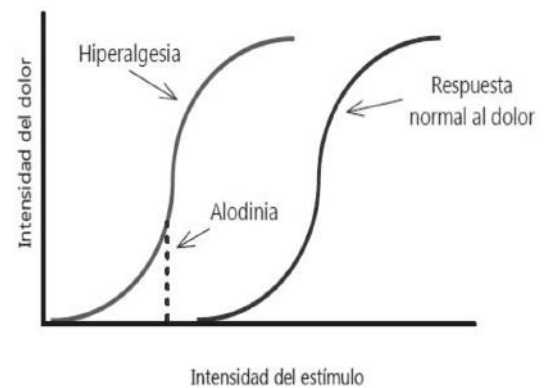
### 2.3 TIPOS DE DOLOR

De acuerdo con la Asociación Internacional para el Estudios de Dolor (IASP) se define como dolor a la experiencia sensorial y emocional desagradable que está asociada a una lesión

real o potencial (Pérez, 2020). El dolor es una alerta para detectar estímulos nocivos o dañinos, es un sistema de protección fisiológico (Woolf,2010). Los tipos de dolor son: 1) Dolor nociceptivo: es representado por la lesión tisular, debido a los estímulos de los receptores, es decir, al dolor fisiológico se presenta como un sistema de protección temprana, 2) Dolor inflamatorio: Es representado por un proceso de infección o inflamatorio en donde se activará el mecanismo inmunológico, así como la presencia del aumento de la sensibilidad sensorial después de un daño irreversible, es un sistema de protección para favorecer a una curación en la parte dañada y, 3) Dolor patológico: Se refiere al dolor generado por una enfermedad o una lesión que afecta al sistema nervioso central y al sistema nervioso periférico (Woolf,2010).

## 2.4 HIPERALGESIA Y ALODINIA

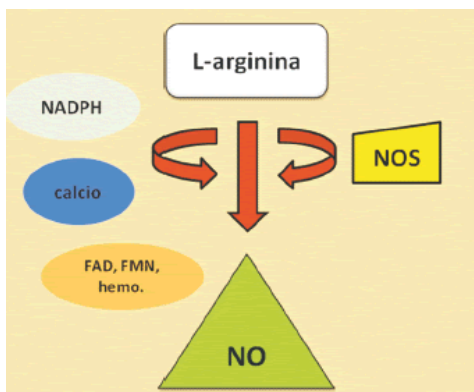
La hiperalgesia se refiere al aumento de dolor con respecto a un estímulo doloroso de forma ascendente. De acuerdo con estudios el receptor NMDA es quien genera estas respuestas aumentadas, debido a su activación puede ocasionar anomalías en el sistema sensorial y ocasionar la excitación neuronal en la cual se puede presentar manifestar anormales de dolor, como referencia a la hiperalgesia. (Collins et al., 2010). Mientras que la alodinia es la respuesta con respecto a estímulos no dolorosos, es decir, el resultado a la sensibilidad al dolor que es producida por estímulos constantes no dolorosos. (Yam,2018)



**Gráfica 1.** Respuesta estímulo-dependiente que ilustra la aparición de la alodinia e hiperalgesia

## 2.5 ÓXIDO NÍTRICO (ON)

El óxido nítrico es producido por una activación de los receptores NMDA con el óxido nítrico-sintetasa, tiene la facilidad de atravesar las membranas y por ende su vida media es corta, existen estudios que han demostrado mediante una inyección intratecal de donantes de óxido nítrico inducen a una respuesta hiperalgesia, por el contrario, los inhibidores de la síntesis del óxido nítrico previenen la hiperalgesia, esto se demostró mediante una inyección intratecal de antagonistas de glutamato. Por lo tanto, el óxido nítrico modula la sensibilidad termoalgésica (Neira et al., 2004).



**Figura 2.** Síntesis de ON, a partir del aminoácido L-arginina con ayuda de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), con ayuda de del agente reductor NADPH y de cofactores como dinucleótido de flavinay adenina (FAD), mononucleótido de flavina y adenina (FMN) y hierro protoporfirina IX (hemo) para obtener la síntesis de NO.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La lesión traumática de médula espinal (LTME) afecta la vida diaria de los pacientes desglosando consecuencias en las funciones motoras y sensitivas, algunos pacientes experimentan hiperalgesia y alodinia asociada a la ansiedad y depresión posterior a una LTME representando un desafío terapéutico significativo para el mejoramiento de estos síntomas. Se ha demostrado que uno de los principales mecanismos implicados en el desarrollo de estos trastornos es la sobre activación de los receptores dependientes del glutamato, especialmente aquellos del receptor NMDA. Aunque la amantadina es utilizada para padecimiento como el Parkinson y gripe, este tiene una acción dopaminérgica lo que es posible una inhibición en la liberación de factores proinflamatorios, además, es un antagonista glutamatérgico del NMDA, conduciendo a procesos de alodinia e hiperalgesia, la cual podría representar una opción terapéutica eficaz que permita regular la disminución de los síntomas depresivos. Se requiere determinar si existe una relación causal entre la administración de amantadina, los niveles de óxido nítrico y la intensidad de la hiperalgesia en un modelo de LTME en rata. Por su potencial impacto en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el dolor neuropático post-LTME. La comprensión de la vía del óxido nítrico como mediador farmacológico y su modulación por antagonistas NMDA podría conducir a tratamientos más específicos y efectivos. Además, el uso de un modelo experimental en rata permitirá establecer relaciones causales directas que serían éticamente imposibles de estudiar en humanos.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles de óxido nítrico sobre el efecto de la amantadina en un modelo de lesión traumática de médula espinal en rata con relación a la hiperalgesia

#### 4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Registrar las respuestas conductuales de hiperalgesia, alodinia en ratas con LTME en tratamiento con amantadina, vehículo y sanas
2. Evaluar las concentraciones de óxido nítrico por detección espectrofotométrico en tejido de médula espinal en ratas con LTME

### 5. MATERIAL Y MÉTODO

#### 5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Las pruebas se realizaron con ratas hembras de la cepa wistar de 200 a 250 gramos de peso, a las cuales se les practicó una LTME a nivel de la 12<sup>a</sup> vértebra torácica, con una intensidad de lesión leve de 6.25 mm, con la finalidad de desarrollar un daño sin afectar las funciones motoras. Es decir, para que se dé inicio a la hiperalgesia fueron evaluadas con filamentos de Von Frey. Los animales fueron clasificados por grupos aleatorios de manera que se obtuvo un grupo naive (ratas sanas), un grupo sham (solo laminectomía), un grupo

vehículo (con LTME) y un grupo de amantadina (con LTME) a dosis de 50 mg/kg (Mata-Bermúdez et al., 2021). El tratamiento se inició a los 14 días después de la LTME y se administró 30 min antes de cada evaluación, durante los 21,28 y 35 días posteriores.

## 5.2 REACTIVOS Y FÁRMACOS

Se utilizó amantadina disuelta en solución salina fisiológica al 0.9% para su posterior administración intraperitoneal para la evaluación conductual hiperalgesia de las ratas, la sacarosa se disolvió en agua para la evaluación antidepresiva por la preferencia a esta y finalmente para la detección de los niveles de óxido nítrico se utilizó: ácido clorhídrico (solución acuosa 1M), solución saturada de cloruro de vanadio III, solución de diclorhidrato de N(1-naftil)etilendiamina, solución de sulfanilamida, estándar de nitratos 10 mM, solución de buffer de fosfatos y solución de sulfato de Zinc.

## 5.3 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO PARA LTME

Con excepción del grupo naive, se realizó una cirugía bajo el anestésico de pentobarbital, con condiciones asépticas, se comenzó rasurando al animal en el área correspondiente, posteriormente se comenzó con una incisión para descubrir la piel y el músculo, limpiando cuidadosamente, con una pinza se hizo una laminectomía a la altura de la 12<sup>a</sup> vértebra torácica para dejar descubierto la médula espinal. Se sujeto de la columna vertebral del animal colocándolo en el equipo NY inductor en el cual se impactó la médula espinal por contusión dejando caer la columna metálica del equipo con un peso de 10 gramos a una altura de 6.5 mm. Una vez finalizado el impacto se suturo la incisión hecha inicialmente. Finalmente, se colocaron los animales en cajas individuales de acrílico para su pronta recuperación. Como se muestra en la figura 3.



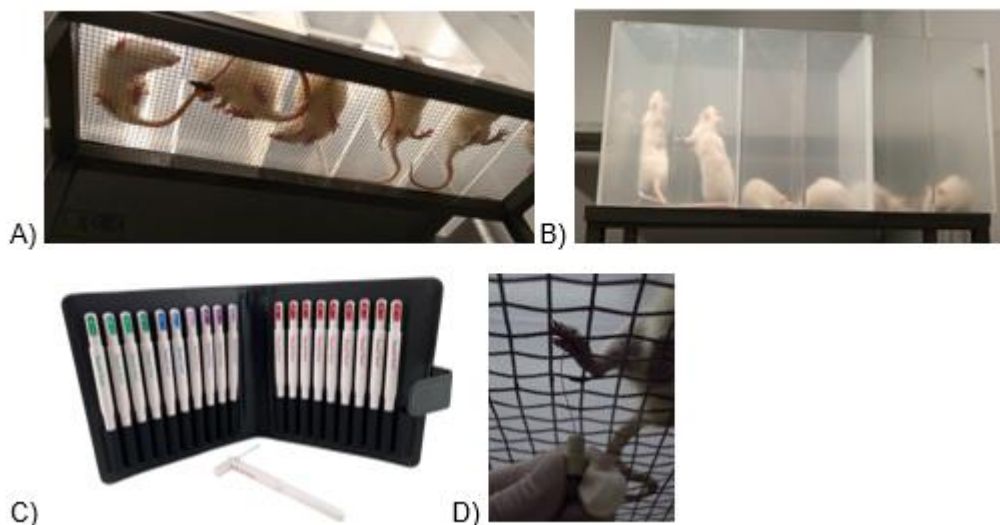
**Figura 3.** Procedimiento quirúrgico. A) Rasurado, B) incisión, C) Laminectomía, D) Lesión Medular y E) Sutura y recuperación

## 5.4 PRUEBAS CONDUCTUALES

### 5.4.1 INDUCCIÓN DE HIPERALGESIA

Para esta prueba se utilizó la cuantificación de las respuestas que el animal presentó, de acuerdo al levantamiento de las extremidades posteriores ante un estímulo mecánico, este estímulo se aplicó con ayuda de los filamentos de Von Frey, utilizando el filamento de 15

gramos, el cual se aplicó sobre la superficie plantar posterior del animal con intervalo de 3 segundos por 10 veces (O-Arciniega et al., 2009) dándonos un retiro inmediato de la pata como una respuesta positiva, en esta prueba los animales estuvieron en una cámara de acrílico individualmente sobre una superficie de maya metálica. Se llevó a cabo a los 14, 21,28 y 35 días posterior a la LTME



**Figura 4.** Pruebas conductuales, A) Maya metálica, B) Cámara de acrílico, C) Filamentos de Von Frey y D) Inducción de hiperalgesia y alodinia.

#### 5.4.2 INDUCCIÓN DE ALODINIA

En la prueba de alodinia se tuvieron a los animales en las mismas condiciones para la prueba de hiperalgesia (figura 4), se buscó un estímulo de la superficie plantar posterior con ayuda de los filamentos de Von Frey (Chaplan et al., 1994). En esta prueba se aplicaron estímulos de forma ascendente, es decir, de 2 a 15 gramos, comenzando en la superficie posterior izquierda y finalizando con el lado derecho. En este método se aplicaron estímulos comenzando con el filamento de 2 gramos hasta obtener una respuesta positiva, es decir, tener un levantamiento de la parte posterior del animal, hasta obtener 6 respuestas una vez presentada la primera respuesta positiva. Se llevó a cabo a los 14, 21,28 y 35 días posterior a la LTME

#### 5.5 DETERMINACIÓN DE NITRATOS Y NITRITOS (NO<sub>x</sub>)

También conocido como método de Griess en la cual se determinan nitritos/nitratos es una de muchas técnicas utilizadas para cuantificar los metabolitos estables derivados del óxido nítrico (NO) (Tenorio et al., 2005).

##### I. Preparación de soluciones.

- a) Ácido Clorhídrico, solución acuosa 1 M.

Se adicionó 4.1 mL de ácido clorhídrico a 37.5 % en un matraz aforado de 50 mL, y se llevó al aforo con agua desionizada.

- b) Solución Saturada de Cloruro de Vanadio III (Sol. VCl<sub>3</sub>).

Se colocaron 400 mg de Cloruro de vanadio en un matraz aforado de 50 mL y se llevó al aforo con solución acuosa HCl 1 M (numeral 1.1).

NOTA: Preparar al momento de ser utilizado y guardar de la luz.

c) Solución de Diclorhidrato de N(1-naftil)etilendiamina (Sol. NEDD-2HCl) 0.1 %

Se colocaron 10 mg de NEDD-2HCl en un matraz aforado de 10 mL, y se llevó al aforo con agua desionizada.

d) Solución de Sulfanilamida (Sol. SULF) 2%

Se pesaron 200 mg de SULF. En un matraz aforado de 10 mL se colocó 1 mL de agua desionizada y se añadió 500  $\mu$ L de ácido clorhídrico (HCl) 37.5 %. Posteriormente, gotear agua desionizada hasta llenar  $\frac{3}{4}$  partes de la perilla del matraz y se adicione 200 mg de sulfanilamida, solubilizando completamente sólido antes de llevar al aforo con agua desionizada.

e) Estándar de nitratos 10 mM.

Se pesó 0.0212 g de nitrato de sodio, y se llevó al aforo en un matraz aforado de 25 mL.

f) Estándar de nitratos 1mM

Se tomo una alícuota de 500  $\mu$ L del estándar 10 mM (numeral 1.5), colocándolos en un matraz volumétrico de 5 mL y aforar con agua desionizada.

g) Solución de Buffer de Fosfato (PBS pH=7.4).

En un vaso de precipitado de 1000 mL se añadió 900 mL de agua desionizada y se agregó: 8.0 gr de Cloruro de Sodio, 0.2 gr de fosfato monobásico de Potasio, 2.9 gr de fosfato dibásico de sodio dodecahidratado y 0.2 gr de cloruro de potasio. Se realizó el ajuste de pH a 7.4 y se aforo con agua desionizada en un matraz volumétrico de 1 L.

NOTA: Revisar la hidratación de Fosfato monobásico de Potasio y realizar el ajuste de peso en caso de ser necesario.

NOTA: Revisar la hidratación de Fosfato Dibásico de Sodio y realizar el ajuste de peso en caso de ser necesario.

h) Solución de Sulfato de Zinc (Sol. ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O) [1 M].

Se añadió 0.3702 g de ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O en un matraz aforado de 2 mL. Se agito hasta que la solución pase de ser blanca a muy ligeramente turbia y sin sedimentos o grumos.

NOTA: Verifique la hidratación de Sulfato de Zinc y realice el ajuste de peso de ser necesario. En caso de utilizar la sal monohidratada (ZnSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O), pesar 0.8969gr para 5 mL de solución.

i) Mezcla Reactiva de Griess.

En un recipiente se preparó una mezcla en una proporción 50 % (Sol. VCl3): 25 % (Sol. NEDD-2HCl) :25 % (Sol. SULF), suficiente para el número de muestras a analizar.

NOTA: La mezcla reactiva deberá prepararse en el momento de utilizarse, es decir, las muestras deberán estar cargadas en la placa de lectura antes de preparar. A continuación, se agregará la mezcla reactiva a cada pozo de lectura.

II. Preparación de la Curva de Calibración.

a. Curva de Calibración para desproteinización con Sulfato de Zinc.

A partir de (SE 10,000) se realizaron las diluciones para los puntos de concentración conocida de la curva de calibración como se indica en la siguiente tabla.

Concentración conocida ( $\mu\text{M}$ )	Vol. (SE 10,000) ( $\mu\text{L}$ )	Vol. Aforo ( $\mu\text{L}$ )
2.5	12.5	5,000
5	25	5,000
10	50	5,000
20	100	5,000
40	200	5,000
80	400	5,000
160	800	5,000
320	1600	5,000

- A partir de cada estándar, se tomaron 285  $\mu\text{L}$  y se adicionaron 15  $\mu\text{L}$  de (Sol.  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).
- Se dejaron reposar durante 10 minutos y se centrifugaron a 14,000 rpm a 4 °C por 10 minutos
- Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se colocaron en la placa de poliestireno de 96 pozos.
- Posteriormente se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de Mezcla Reactiva de Griess en el pozo de la placa.
- Finalmente se colocaron en el lector de UV y se procedió a una incubación de 30 minutos durante 37 °C con tapa o película de parafilm para evitar pérdida de volumen.
- La placa se leyó a una longitud de onda de 540 nm.

III. Tratamiento de tejidos.

- Se multiplicó el peso del tejido en gramos por 20 y el resultado nos indicó la cantidad que se añadió de Buffer PBS (pH=7.4) dada en mL.
- A continuación, se homogenizó sobre hielo en Homogenizador Ultrasónico a amplitud del 40 % hasta homogeneidad del contenido.

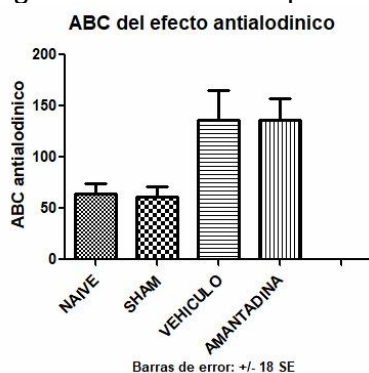
- A 285  $\mu\text{L}$  de homogenado se adicióno 15  $\mu\text{L}$  de (Sol.  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y se dejó reposar a temperatura ambiente 10 minutos.
- Se centrifugó a 14,000 rpm a 4  $^\circ\text{C}$  por 10 minutos.
- Se tomó 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se depositaron en una placa de lectura de UV
- Se agregó 200  $\mu\text{L}$  de la Mezcla Reactiva de Griess.
- Se colocó la placa en el lector de placas-UV y se incubó por 30 minutos durante 37  $^\circ\text{C}$  con tapa o película de parafilm para evitar pérdida de volumen.
- Finalmente se leyó la placa a una longitud de onda de 540 nm.

## 5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

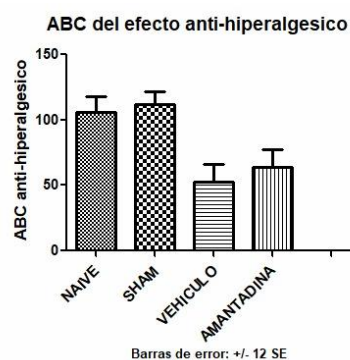
Los resultados fueron analizados utilizando el programa SPSS 21.0 de estadística. Para determinar la distribución normal y la homogeneidad de varianzas, se aplicaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Levene respectivamente, con base en esto se utilizó una ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc de Dunnett. Los resultados fueron expresados como el promedio + error estándar y tendrán significancia estadística con una  $p < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las pruebas conductuales para la inducción de hiperalgesia y alodinia se obtuvieron los siguientes resultados que se muestran en las figuras 5 y 6.



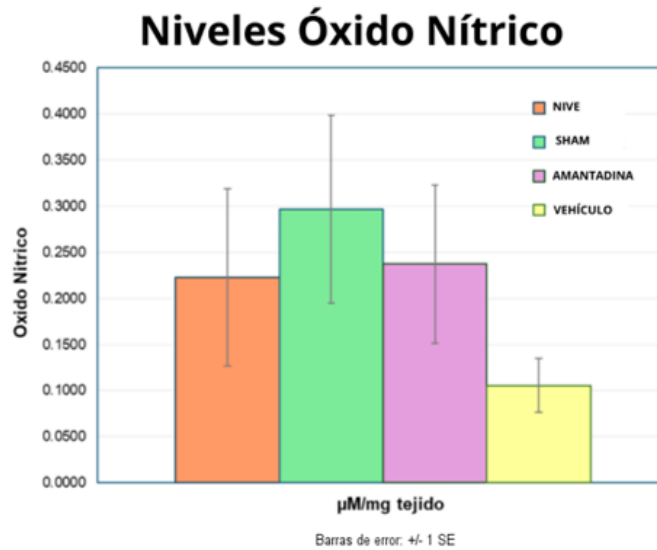
**Figura 5.** ABC antialodínico. Los valores corresponden al área bajo la curva del de los grupos Nivel (sanos), Sham (solo con laminectomía), Vehículo (ratas con Lesión traumática de la médula espinal y tratados con vehículo) y Amantadina (ratas con Lesión traumática de la médula espinal y tratados con Amantadina). ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett.



**Figura 6.** ABC anti-hiperalgésico. Los valores corresponden al área bajo la curva del de los grupos Nivel (sanos), Sham (solo con laminectomía), Vehículo (ratas con Lesión traumática de la médula espinal y tratados con vehículo) y Amantadina (ratas con Lesión traumática de la médula espinal y tratados con Amantadina). ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett.

En ellas se muestra la diferencia entre el Área Bajo la Curva (ABC) del efecto antialodínico y anti-hiperalgésico. Los resultados obtenidos en este proyecto nos indicaron que los animales tratados con amantadina no presentaron una diferencia significativa en la reducción de la conducta estímulo dependiente en comparación con el grupo control que solo fue tratado con vehículo, manteniéndose así los síntomas depresivos que se fueron desarrollando a lo largo del periodo de evaluación. Dando así valores en ABC del efecto antialodínico de naive 63.35, sham 61.44, vehículo 136.61 y amantadina 135.88 y valores en ABC del efecto anti-hiperalgésico de naive 106.06, sham 112.09, vehículo 52.98 y amantadina 63.97. De acuerdo con los datos del efecto antialodínico, las ratas naive y sham no tiene diferencia significativa, así como el vehículo y los animales tratados con amantadina no demostraron una respuesta significativa, se observó que hay una diferencia entre ABC antialodínica y anti-hiperalgésica de los grupos naive y sham debido a un aumento en el ABC anti-hiperalgésica, esto nos indique que a mayor ABC se tiene una mayor interacción con respecto al fármaco, es decir, será mejor el reflejo de la conducta del dolor. Esto es compatible con lo que chaplan et al., 1994 investigó, el menciona que la determinación de este efecto es aumentada significativamente en aquellos grupos que no recibieron tratamiento con el fármaco, esto se corrobora en la gráfica 3 donde se observa el incremento de naive y sham, obteniendo una disminución con amantadina con respecto a estos grupos

En la determinación de los niveles de óxido nítrico se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en la figura 7. Se observó al grupo naive con valor de 0.022 con respecto al grupo con tratamiento de amantadina con valor de 0.23 donde se determinó que no hubo una diferencia significativa, sin embargo, el grupo sham con valor de 0.29 y grupo vehículo con valor de 0.10 si tuvo una diferencia significativa con el tratamiento de amantadina. Estos resultados nos indican que se presentan niveles más altos de óxido nítrico en el grupo que solo se le realizó la laminectomía (Sham), mientras que se mantienen los niveles de óxido nítrico con la administración de amantadina en comparación con los animales sanos, finalmente existe una disminución de estos niveles en el grupo vehículo. De acuerdo con Neira et al., 2004 el óxido nítrico participa en el mantenimiento de los signos con respecto al dolor neuropático.



**Figura 7.** Gráfica en la que se muestran los resultados los niveles de óxido nítrico por efecto del tratamiento con amantadina en ratas con lesión traumática de la médula espinal. Los valores corresponden al área bajo la curva del de los grupos Nivel (sanos), Sham (solo con laminectomía), Vehículo (ratas con Lesión traumática de la médula espinal y tratados con vehículo) y Amantadina (ratas con Lesión traumática de la médula espinal y tratados con Amantadina). Los resultados están dados en  $\mu$  M de Nitritos y de Nitratos/mg de tejido fresco. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett.

## 7. CONCLUSIONES

1. En las respuestas conductuales de hiperalgesia y alodinia en ratas con LTME a la altura de la 12<sup>a</sup> vértebra torácica, con una intensidad de lesión de 6.25 mm, con la finalidad de desarrollar un daño sin afectar las funciones motoras se demostró que produce estas respuestas tu tuvieron una diferencia significativa con relación a la amantadina
2. Los niveles de óxido nítrico fueron significativos en los resultados de los animales con tratamiento de amantadina, en comparación al grupo control tratado con vehículo quienes presentaron una disminución en los niveles de óxido nítrico

## 8. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

Antonio Pérez-Estudillo, C., Sánchez, D., +b, A., Leonor López-Meraz, M., Morgado-Valle, C., Beltran-Parrazal, L., Coria-Avila, G. A., Elena, M., Aguilar, H., & Denes, J. M. (2018). Aplicaciones terapéuticas para la lesión de médula espinal. *ENeurobiología*, ISSN-e 2007-3054, Vol. 9, Nº. 21, 2018, 9(21), 2.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7735378&info=resumen&idioma=SPA>

Arriagad, G. (2020). spinal cord injury (sci). bibliographic review. Elsevier, 31(5-6), 423-429. DOI: [10.1016/j.rmcl.2020.11.001](https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2020.11.001)

Chaplan, SR, Bach, FW, Pogrel, JW, Chung, JM, Yaksh, TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53, 55–63

Collins S, Sigtermans MJ, Dahan A, Zuurmond WW & Perez RS (2010) NMDA receptor antagonists for the treatment of neuropathic pain. *Pain medicine (Malden, Mass.)*, 11(11), 1726–1742.

Dean J & Keshavan M (2017). The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian journal of psychiatry*, 27, 101–111.

Del Valle, F. (2012). Steroids for acute spinal cord injury. Elsevier. 4(3), (179-180). DOI: [10.1016/j.neuarg.2012.06.008](https://doi.org/10.1016/j.neuarg.2012.06.008)

Humo M, Lu H & Yalcin I (2019) The molecular neurobiology of chronic pain-induced depression. *Cell and tissue research*, 377(1), 21–43.

Mata-Bermudez A, Ríos C, Burelo M, Pérez-González C, García-Martínez BA, Jardón-Guadarrama G, Calderón-Estrella F, Manning-Balpuesta N, & Diaz-Ruiz A (2021) Amantadine prevented hypersensitivity and decreased oxidative stress by NMDA receptor antagonism after spinal cord injury in rats. *European journal of pain (London, England)*, 25(8), 1839–1851.

Neira, F & Ortega, J. (2004). NMDA glutamatergic receptor antagonists for the management of chronic pain. *Rev Soc Esp Dolor*; 11: 210-222.

Nesterowicz, M., Zendzian, M., Robert, J., Zalewska, A & Maciejczk, M. (2023). Antiglioxidative properties of amantadine - a systematic review and comprehensive in vitro study. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 38(1). 138-155. <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2137161>

OMS, 2013, Lesiones de la Médula Espinal - Perspectivas Internacionales. Malta

O-Arciniega, M., Diaz-Reval, M., Cortés-Arrollo, A., Domínguez-Ramírez, A & López-Muñoz, F. (2009). Sinergismo antinociceptivo de morfina y gabapentina en el dolor neuropático inducido por lesión por constricción crónica. *Farmacología Bioquímica y Conducta*. 92(3). 457-464.

<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.01.013>

Pérez Fuentes, J. (2020). Updated version of the IASP definition of pain: one step forward or one step back. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 27(4), 232-233. Epub 13 de octubre de 2020. <https://dx.doi.org/10.20986/resed.2020.3839/2020>

Rodríguez, A., & Oltra, E. (2020). Traumatic spinal cord injury in Asturias: clinical features, complications and patient support: *Enfermería*. <https://doi.org/10.6018/eglobal.421941>

Shi M, Wang JY, & Luo F (2010) Depression Shows Divergent Effects on Evoked and Spontaneous Pain Behaviors in Rats. *The Journal of Pain*, 11(3), 219–229.

Tenorio L., Fermín A.; del Valle M, Leonardo; Pastelín H., Gustavo. (2005). "Validación de un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de metabolitos estables de óxido nítrico en fluidos biológicos". *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 36, núm. 1, pp. 31-41. Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. Distrito Federal, México.

Wang T, Huang XJ, Van Ken C, Went G, Nguyen J, & Lyeth B, (2014) Amantadine Improves Cognitive Outcome and Increases Neuronal Survival after Fluid Percussion Traumatic Brain Injury in Rats. *Journal of Neurotrauma*, 31(4), 370–377

Woolf CJ (2010) What is this thing called pain? *J Clin Invest* 120, 3742–3744.

Yam M, Loh Y, Tan C, Khadijah-Adam S, Abdul-Manan N, & Basir R (2018) General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2164.