



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

**“EFECTO ANTI-ALODINICO Y ANTI-HIPERALGESICO DE LA UTILIZACIÓN
DE N- ACETIL CISTEÍNA EN UN MODELO EN RATA DE LESIÓN
TRAUMÁTICA DE MEDULA ESPINAL”**

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

PRESENTA:
GINES FRANCISCO EDUARDO MANUEL

MATRICULA: 2173082134

Lugar donde se realizó el Servicio Social: Laboratorio de nanotecnología y
nanomedicina

Fecha de inicio: 11 de abril 2022 **Fecha de termino:** 12 de octubre 2022

ASESOR INTERNO

M. en C. GUSTAVO JARDON GUADARRAMA
NO. ECONÓMICO 38865

ASESOR EXTERNO

Q.F.B HÉCTOR ALONSO ROMERO SÁNCHEZ
NO. DE CEDULA 11858265

1.0. Introducción

La lesión traumática de medula espinal (LTME) se define como una lesión aguda en el tejido nervioso que se localiza en el conducto espinal, esta lesión da como resultado parálisis, déficit motor y trastornos sensoriales (Fakhri et al., 2021; Hagen, 2015). Se estima que la incidencia de una LTME es de entre 40 a 80 casos por cada millón de habitantes a nivel mundial, cada año se reporta una incidencia de entre 250,000 y 500,000 casos nuevos en todo el mundo, la gran mayoría de lesiones medulares son a causa de lesiones de tránsito, actos de violencia y caídas (Alito et al., 2021). La LTME repercute en la calidad de vida del paciente ya que provoca deficiencias como la tetraplejia, problemas respiratorios, complicaciones gastrointestinales, depresión, dependencias en las actividades de la vida diaria y dolor (Hejrati & Fehlings, 2021; Peter et al., 2015). Estudios anteriores indican que aproximadamente el 80 % de los pacientes con LTME padecen dolor crónico (Hagen, 2015), el dolor puede ser de tipo nociceptivo (daño al tejido no neural) o neuropático (daño o disfunción del sistema nervioso), se estima que del 50 al 70% de los pacientes con LTME padecen dolor neuropático (Fakhri et al., 2021). El tratamiento farmacológico de primera línea incluye anticonvulsivos, antidepresivos y analgésicos opioides para el dolor neuropático, sin embargo, el tratamiento tiene baja eficacia o efectos secundarios peores que la patología en si (Limcharoen et al., 2021), estos datos sustentan la necesidad de proponer nuevas terapias para el tratamiento del dolor neuropático con el fin de mejorar la calidad de vida del paciente. Así mismo, existen diversos estudios donde se utilizan antioxidantes para el tratamiento del dolor neuropático como la vitamina C y E, el ácido alfa lipoico y la N-acetilcisteína (NAC) (Kallenborn-Gerhardt et al., 2013; Lu et al., 2011). La NAC es un potente antioxidante directo ya que neutraliza las especies oxidantes al proporcionar grupos sulfhidrilo, y su efecto indirecto en la célula se debe al aumento del glutatión reducido intracelular (GSH), que es un componente importante de las vías por las cuales las células están protegidas del estrés oxidativo (Aldini et al., 2018; Elbini Dhouib et al., 2016). Además, se ha reportado que el tratamiento con NAC exhibe efectos

antiinflamatorios mediante la inhibición de la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) y reduce la liberación de citocinas proinflamatorias (Elbini Dhouib et al., 2016). En este sentido, los mecanismos de la NAC están relacionados con sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias así mismo, estudios recientes reportan que la NAC puede inducir analgesia en modelos animales de dolor inflamatorio y neuropático al inhibir las respuestas nociceptivas (Heidari et al., 2019; Notartomaso et al., 2020)

2.0. Marco Teórico

2.1 Lesión traumática de medula espinal.

La LTME se define como una afección neurológica en el tejido nervioso que se localiza en el conducto espinal, esta lesión da como resultado parálisis, déficit motor y trastornos sensoriales (Alizadeh et al., 2019; Fakhri et al., 2021). Una LTME se da mediante una lesión inicial o primaria y el daño posterior se le denomina lesión secundaria (Copley et al., 2020). La lesión primaria es causada por la aplicación fuerzas mecánicas a la medula espinal, ocasionando daño directo o indirecto al cordón, se ha identificado cuatro mecanismos de daño en la lesión primaria que incluyen: compresión, corte, laceración y estiramiento agudo (Alizadeh et al., 2019; Copley et al., 2020). La lesión primaria genera un daño axonal, pérdida de células neurogliales, disfunción sensoriomotora y deterioro vascular, como consecuencia se desencadena un cascada de eventos moleculares y celulares que exacerban los déficits neurológicos causados por el daño primario (Hejrati & Fehlings, 2021). La lesión secundaria se presenta en el tejido después del trauma mecánico de manera tardía y progresiva respecto al tiempo, la ruptura de los vasos sanguíneos y la alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica exponen a la medula a células inflamatorias macrófagos, células T y neutrófilos, estas células desencadenan la liberación de sustancias inflamatorias como citocinas, el factor de crecimiento de necrosis tumoral $TNF\alpha$ y diversas interleucinas, su concentración máxima se alcanza después 6 a 12 horas de la lesión secundaria permaneciendo hasta los 4 días posteriores (Ahuja et al., 2017; Hejrati & Fehlings, 2021). Por otra parte se observa

una pérdida osmótica iónica intracelular y extracelular provocando un aumento intracelular de calcio el cual activa las proteasas causando una difusión mitocondrial y muerte celular, además se ha reportado que las neuronas y oligodendrocitos son susceptibles a muerte celular mediada por el TNF- α , el daño de los radicales libres y la excitotoxicidad, la cual se observa en áreas lejanas al epicentro de la LTME, sin embargo cerca del epicentro de una LTME se genera una desmielinización de los axones, las células inflamatorias fagocitan los residuos de mielina en el sitio de la LTME, el resultado de la fagocitosis produce una liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y como consecuencia se lleva a cabo la oxidación de proteínas, daño del ácido desoxirribonucleico (ADN) y peroxidación de lípidos, lo que finalmente provoca necrosis celular y muerte celular retardada (Ahuja et al., 2017; Alito et al., 2021). Todos los mecanismos mencionados anteriormente provoca deficiencias como la tetraplejia, problemas respiratorios, complicaciones gastrointestinales, depresión, dependencias en las actividades de la vida diaria y conductas asociadas a dolor como alodinia táctil (dolor provocado por estímulos táctiles normalmente inocuos), hiperalgesia mecánica (respuesta exagerada a estímulos nocivos) (Hejrati & Fehlings, 2021; Peter et al., 2015; Zhao et al., 2021), la clasificación Internacional del dolor por lesión de médula espinal (ISCIP por sus siglas en inglés), desarrollo y valido un esquema para la clasificación del dolor derivado de la LTME, en el cual se divide al dolor en nociceptivo, neuropático y otros dolores, el dolor neuropático se define como el daño o disfunción del sistema nervioso somatosensorial, se estima que el 50-70% de los pacientes con LTME padecen dolor neuropático, el cual puede estar localizado por encima a nivel o por debajo de la lesión y generalmente se desarrolla en los primeros seis meses después de la lesión, persistiendo durante muchos años, afectando la calidad de vida del paciente (Fakhri et al., 2021; Hatch et al., 2018).

2.2. Definición del dolor

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) por sus siglas en ingles define al dolor como “Una experiencia sensorial y emocional desagradable

asociada con, o parecida a la asociada con, daño tisular real o potencial” (Raja et al., 2020). Si bien el dolor cumple con una función adaptativa, puede tener efectos adversos que influyen sobre la función del bienestar social y psicológico del paciente (Raja et al., 2020).

2.3. Dolor Neuropático y LTME

El dolor neuropático se desarrolla después de una LMTE debido a alteraciones neuroquímicas, anatómicas, excitotóxicas e inflamatorias (Fakhri et al., 2021). Si bien los mecanismos del dolor neuropático no son comprendidos en su totalidad se ha reportado que el daño celular y la isquemia, aumentan significativamente la concentración de glutamato extracelular, el cual se une a los receptores inotrópicos (N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA y Kainato), así como a los receptores metabotrópicos, aumentando el calcio (Ca^{2+}) intracelular y a la activación de las vías de las prostaglandinas mediadas por especies reactivas de oxígeno (EROS), causando sensibilidad central (Alizadeh et al., 2019; Fakhri et al., 2021). La sensibilidad central aumenta la respuesta a estímulos mecánicos no dolorosos favoreciendo la hipersensibilidad que es un estímulo dependiente de alodinia táctil e hiperalgesia mecánica, que son conductas asociadas al dolor neuropático (Gwak et al., 2012). Actualmente se cuenta con diversas estrategias terapéuticas para tratar el dolor neuropático derivado de la LTME, sin embargo, el tratamiento farmacológico tiene baja eficacia o efectos secundarios (Fakhri et al., 2021; Limcharoen et al., 2021). Por ello surge la necesidad de proponer nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de este padecimiento con el fin de mejorar la calidad de vida del paciente.

2.4. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en el dolor

Las EROS y nitrógeno (NOS), son un grupo de moléculas con actividad oxidativa, se ha reporta en diversos estudios que están implicadas en el desarrollo del dolor, que resulta de una lesión nerviosa o un proceso inflamatorio (Little et al., 2012; Yowtak et al., 2011). El aumento en la producción de radicales libres se debe a la

sobre excitación de los receptores de glutamato, en particular los N -metil-D-aspartato (NMDA), como consecuencia se lleva a cabo la oxidación de proteínas, daño del ácido desoxirribonucleico (ADN) y peroxidación de lípidos, lo que finalmente provoca necrosis y muerte celulares retardada (Alizadeh et al., 2019; Roberts et al., 2010). Además, se ha demostrado que el aumento de EROS y NOS contribuye a la sensibilización central y al desarrollo del dolor neuropático por medio de distintos mecanismos, incluso se ha demostrado que aumentan la fosforilación de receptores NMDA e inhibe la trasmisión de GABA contribuyendo al desarrollo del dolor neuropático (Fakhri et al., 2021; Yowtak et al., 2011).

2.5. N-Acetilcisteína

La NAC es un profármaco de la cisteína y un precursor del glutati6n (GSH), con fuertes efectos antioxidante el cual se ha utilizada para el tratamiento de neuropatía inducida por diabetes y cancer (Heidari et al., 2019). Su actividad antioxidante en la célula es por el aumento intracelular del glutati6n, que es el miembro más importante de las defensas antioxidantes naturales del cuerpo por las cuales las células están protegidas del estrés oxidativo (Heidari et al., 2019). Además, se ha reportado que el tratamiento con NAC exhibe efectos antiinflamatorios mediante la inhibición de la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) reduciendo la liberación de citocinas proinflamatorias (Elbini Dhouib et al., 2016)

3.0. Objetivo

- Evaluar el efecto anti-nociceptivo de la administración de NAC en un modelo de lesión traumática de la medula espinal en rata.

3.1 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto antialodínico del tratamiento con N-Acetilcisteína una vez que se presenta el evento doloroso por efecto de la lesión traumática de la medula espinal, utilizando el paradigma de ensayo up-Down
- Evaluar el efecto antihiperalgésico del tratamiento con N-Acetilcisteína una vez que se presenta el evento doloroso por efecto de la lesión traumática de la medula espinal, utilizando el paradigma de ensayo up-Down

4.0. Materiales y Métodos

4.1. Animales

Los experimentos se realizaron en ratas hembra de la cepa Wistar, con un peso aproximado de 200 a 220 g. con acceso libre al agua y alimento ad libitum, en condiciones normales de laboratorio (ciclo de luz/obscuridad 12 h, 22 °C), todo experimento se llevó a cabo en estricta conformidad bajo los lineamientos establecidos por la Norma Oficial Mexicana Nom-062-ZOO-1999 y los lineamientos y estándares para la investigación de dolor Experimental en animales (Zimmermann, 1983).

4.1.1. Determinación del posible efecto antialodínico y antihiperalgésico inducido por la administración de N-Acetilcisteína en un modelo de lesión traumática de medula espinal

Para el diseño de este proyecto de investigación y con el propósito de evaluar el efecto antinociceptivo de N-Acetilcisteína se utilizó un modelo de LTME que consiste en dejar caer un cilindro metálico de 10 g de peso a una altura de 6.25 mm directamente sobre la medula espinal a la altura de la vertebra torácica T12. Las ratas se dividirán en distintos grupos experimentales (n=6), grupo Sham, grupo LTME, grupo Naive, grupo SCI vehículo y los grupos LTME a los que se les administro Nac. La evaluación de alodinia táctil e hiperalgnesia mecánica se realizó el día 14 después de la LTME.

<i>Grupos n=6</i>	<i>Procedimiento quirúrgico</i>	<i>Dosis</i>
<i>Naive</i>	Ninguno	Ninguna
<i>Sham</i>	Laminectomía	Ninguna
<i>Vehículo</i>	LTME	Sol. Salina 0.9%
<i>Gabapentina</i>	LTME	30 mg/Kg
<i>NAC</i>	LTME	37.5 mg/Kg
<i>NAC</i>	LTME	75 mg/Kg
<i>NAC</i>	LTME	150 mg/Kg
<i>NAC</i>	LTME	300 mg/Kg

Figura 1. Diseño de tratamiento farmacológico

4.2. Procedimiento quirúrgico

4.2.1. Modelo de lesión traumática de la medula espinal en rata

Los animales que se utilizaron en este estudio se distribuyeron en grupos Sham, ratas a las cuales solo se les hizo el proceso de laminectomía con el fin de ver si el procedimiento per se tiene algún efecto, el grupo vehículo y las ratas tratadas con NAC y gabapentina se les realizó la lesión medular según el procedimiento de contusión reportados por (Basso et al., 1996), el procedimiento se realizó bajo anestesia con pentobarbital (50 mg/kg i.p.) en condiciones asépticas, se realizó una incisión extendida en el lomo de la rata seguida de una laminectomía, desde la región torácica media baja, incluida la porción caudal T10 y toda la T12 para así exponer la medula espinal con la dura madre integra. Se produjo una LTME controlada por contusión con ayuda del dispositivo impactador de caída libre de peso de la Universidad de Nueva York (NYU) con 10 g de peso a una distancia de 6.25 mm (Mata-Bermudez et al., 2021).

4.3. Pruebas conductuales

4.3.1. Determinación del 50% del umbral de retiro de la pata

La alodinia táctil se evaluó midiendo el 50% del umbral de retiro de la pata, este procedimiento se realizó mediante el método de up-down descrito por Dixon (Dixon, 1980) y modificado por Chaplan (Chaplan et al., 1994). Las ratas se colocaron de manera individual en cámaras de acrílico transparentes sobre una superficie de malla metálica para facilitar el contacto con la superficie plantar de las patas de la rata. Las ratas se dejaron acondicionar por un lapso de 30 minutos antes de evaluar la alodinia táctil con el fin de permitir a la rata adaptarse al entorno, después de este tiempo se aplicó un estímulo durante 10 s con los filamentos de von frey (Stoelting, Wood Dale, IL, USA), de acuerdo con el método descrito por (Dixon, 1980) . Este método consiste en la aplicación de un estímulo con una fuerza preestablecida de 2 gr como mínimo y una de 15 gr como máximo, la respuesta se tomó como positiva cuando la rata levanta la pata marcándose con una "X", posteriormente consecuentemente se pasará al filamento inmediatamente inferior, en caso de ser negativo se marcará con un "O" y se pasará al filamento inmediatamente superior. La prueba se realizó hasta que se registraron seis respuestas iguales una vez que se presentó el primer cambio en la respuesta conductual o hasta que se excedió el valor del filamento de gramaje más alto (15 g).

Los datos obtenidos se transformaron a valores numéricos mediante la siguiente formula:

$$50\% \text{ Umbral} = \left(\frac{10^{(Xf+k\delta)}}{10000} \right)$$

Donde:

Xf: Valor en unidades logarítmicas del último filamento de Von Frey utilizado.

k: Valor obtenido a partir de las tablas de Dixon (Dixon, 1980).

δ : Media de las diferencias entre los puntos fuertes de estímulo en unidades logarítmicas.

4.3.2. Evaluación de la hiperalgesia mecánica

Se evaluó la hiperalgesia mecánica, mediante el número de respuestas de retiro de las patas traseras ante la aplicación de un estímulo mecánico nocivo. El estímulo mecánico mencionado anteriormente se aplicó en la superficie plantar de la pata trasera utilizando el filamento de von Frey calibrado con una fuerza de 5,46 (250 mN [26 g]). Dicho estímulo se repitió 10 veces por triplicado en intervalos de aproximadamente 3 segundos (Mata-Bermudez et al., 2021).

4.4. Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico GraphPad Prism 9. Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para las medidas repetidas para analizar los datos del modelo LTME utilizando tratamientos (entre) y el tiempo de prueba (dentro) como factores. Se utilizó ANOVA unidireccional para analizar el área bajo curva (AUC) en el modelo LTME. El porcentaje de efecto máximo posible (%MPE) se calculó con la siguiente fórmula (Mata-Bermudez et al., 2021)

$$\%MEP = \left(\frac{ABC_{Farmaco} - ABC_{Vehiculo}}{ABC_{Sham}ABC_{Vehiculo}} \right) \times 100$$

5.0 Actividades realizadas

- Evaluación basal de Alodinia e Hiperalgesia Mecánica con filamentos de Von Frey
- Lesión Traumática de Medula Espinal
- Preparación de soluciones de NAC, Vehículo y Gabapentina
- Administración de NAC, Vehículo y Gabapentina
- Evaluación de Alodinia e Hiperalgesia Mecánica con filamentos de Von Frey antes y posterior a la administración de NAC, Vehículo y Gabapentina

6.0. Metas alcanzados

- Se realizó de manera correcta el modelo de LTME en rata.
- Se logró realizar la evaluación del efecto antialodínico y antihiperálgico del tratamiento con N-Acetilcisteína por medio del paradigma de ensayo up-Down.

7.0. Resultados

7.1. Determinación del posible efecto antinociceptivo inducido por la administración de Nac en la hipersensibilidad estímulo dependiente (alodinia táctil e hiperálgia mecánica).

Los resultados obtenidos para el efecto antialodínico por la administración en dosis crecientes de NAC (37.5, 75, 150 y 300 mg/Kg) en ratas con LTME se muestran en la Figura (2). El panel A muestra los valores de los grupos controles (Sham y Naïve) con valores superiores de los 14 g, lo cual indica que estos animales no desarrollaron dolor (alodinia táctil). Sin embargo las dosis crecientes de Nac (300 mg/kg, i.p.) y Gabapentina (30 mg/kg, i.p.) aumentó significativamente ($p < 0.05$) el umbral de retiro de la pata en ratas con LTME (T12, 6.25 mm), con respecto al grupo vehículo (solución salina fisiológica al 0.9% i.p.) donde no se observó el efecto. El panel B muestra que la administración de Nac 300 mg/kg, i.p., alcanzó un máximo efecto antialodínico del 44.64 %, mientras que la gabapentina produjo una eficacia de 94.34%. El %MEP resultante de la administración de Nac 300 mg/kg, i.p., se alcanzó 4 horas después de la administración y permaneció constante hasta la hora 8, estos hallazgos indican un cambio en la conducta asociada a dolor, teniendo respuestas superiores a los 4g lo que sugiere un efecto antialodínico.

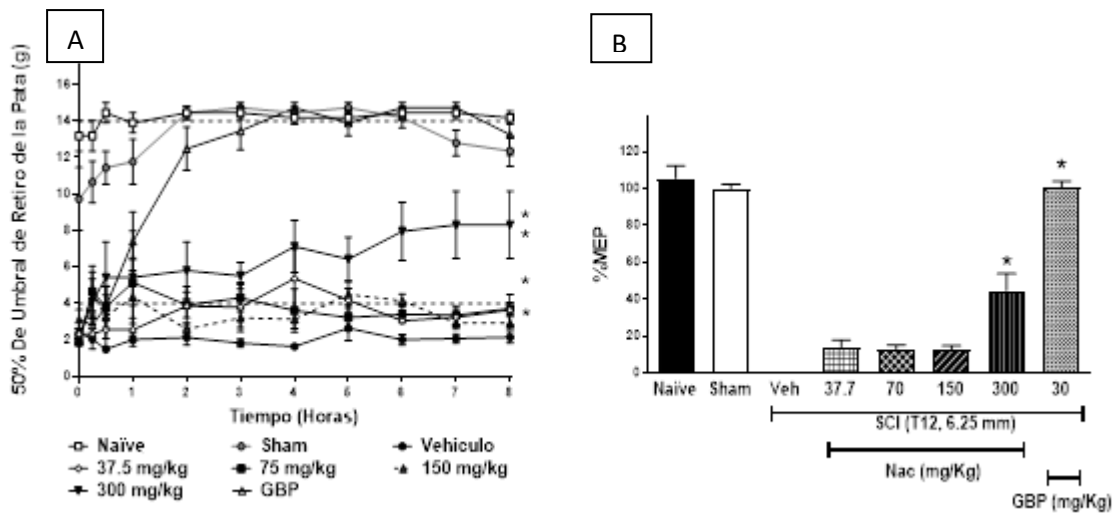


Figura 2. Efecto del tratamiento con N-acetilcisteína sobre hipersensibilidad (alodinia táctil). Panel A) Resultado del curso temporal del efecto antialodínico inducido por la administración en dosis crecientes de NAC (37.5, 75, 150 y 300 mg/Kg) o gabapentina (30 mg/kg, i.p.). Panel B) Porcentaje de máximo efecto antialodínico posible (%MEAP).

Los resultados obtenidos para el efecto antihiperalgésico por la administración en dosis crecientes de NAC (37.5, 75, 150 y 300 mg/Kg) en ratas con LTME se muestran en la Figura (3). El panel A muestra los valores de los grupos controles (Sham y Naïve) presentaron una respuesta de retiro de la pata trasera de 2 en promedio lo cual indica que estos animales no desarrollaron dolor (hiperalgesia mecánica). Sin embargo las dosis crecientes de Nac (300 mg/kg, i.p.) y Gabapentina (30 mg/kg, i.p.) disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) el número de respuestas de retiro de la pata trasera ante un estímulo nocivo (5.45, 26 g de intensidad) en ratas con LTME (T12, 6.25 mm), con respecto al grupo vehiculo (solucion salina fisiologica al 0.9% i.p.) que tienen umbrales de retiro de la pata mas alto. El panel B muestra que la administracion de Nac 300 mg/kg, i.p, alcanzo un máximo efecto antihiperalgésico del 34.61 %, mientras que la gabapentina produjo una eficacia de 94.34%. El %MEP resultante de la administración de Nac 300 mg/kg, i.p, fue

alcanzado en la hora 2 después de la administración permaneciendo constante hasta la hora 8.

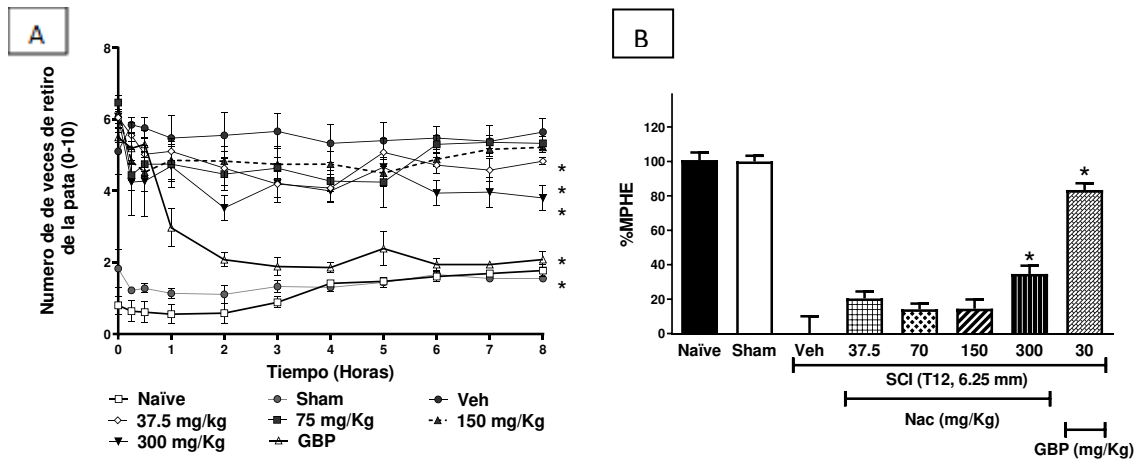


Figura 3. Efecto del tratamiento con N-acetilcisteína sobre hipersensibilidad (hiperalgesia mecánica). Panel A) Resultado del curso temporal del efecto antialodínico inducido por la administración en dosis crecientes de NAC (37.5, 75, 150 y 300 mg/Kg) o gabapentina (30 mg/kg, i.p.). Panel B) Porcentaje de máximo efecto antihiperalgésico posible (% MEAP).

8.0 Conclusiones

La administración aguda de N-Acetilcisteína reduce la hipersensibilidad estímulo dependiente (alodinia táctil e hiperalgesia mecánica) inducida por la lesión traumática de medula espinal en ratas. Estos efectos pueden estar modulados a través del estrés oxidativo y la reducción de la excitotoxicidad asociada con la activación de los receptores NMDA.

9.0. Recomendaciones

Una vez concluido el presente reporte se considera interesante investigar sobre los posibles mecanismos de acción que tiene el NAC para modular las conductas nociceptivas asociadas al estrés oxidativo después de una lesión traumática de medula espinal.

10.0 Referencias

- Ahuja, C. S., Wilson, J. R., Nori, S., Kotter, M. R. N., Druschel, C., Curt, A., & Fehlings, M. G. (2017). Traumatic spinal cord injury. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17018. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.18>
- Aldini, G., Altomare, A., Baron, G., Vistoli, G., Carini, M., Borsani, L., & Sergio, F. (2018). N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radical Research*, 52(7), 751-762. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1468564>
- Alito, A., Filardi, V., Famà, F., Bruschetta, D., Ruggeri, C., Basile, G., Stancanelli, L., D'Amico, C., Bianconi, S., & Tisano, A. (2021). Traumatic and non-traumatic spinal cord injury: Demographic characteristics, neurological and functional outcomes. A 7-year single centre experience. *Journal of Orthopaedics*, 28, 62-66. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jor.2021.11.007>
- Alizadeh, A., Dyck, S. M., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2019). Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms [Review]. *Frontiers in Neurology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00282>
- Basso, D. M., Beattie, M. S., & Bresnahan, J. C. (1996). Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol*, 139(2), 244-256. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.0098>
- Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M., & Yaksh, T. L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, 53(1), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9)
- Copley, P. C., Jamjoom, A. A. B., & Khan, S. (2020). The management of traumatic spinal cord injuries in adults: a review. *Orthopaedics and Trauma*, 34(5), 255-265. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mporth.2020.06.002>
- Dixon, W. J. (1980). Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 20, 441-462. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.20.040180.002301>
- Elbini Dhouib, I., Jallouli, M., Annabi, A., Gharbi, N., Elfazaa, S., & Lasram, M. M. (2016). A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. *Life Sciences*, 151, 359-363. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.003>
- Fakhri, S., Abbaszadeh, F., & Jorjani, M. (2021). On the therapeutic targets and pharmacological treatments for pain relief following spinal cord injury: A mechanistic review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111563. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111563>
- Gwak, Y. S., Kang, J., Unabia, G. C., & Hulsebosch, C. E. (2012). Spatial and temporal activation of spinal glial cells: role of gliopathy in central neuropathic pain following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*, 234(2), 362-372. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.10.010>
- Hagen, E. M. (2015). Acute complications of spinal cord injuries. *World J Orthop*, 6(1), 17-23. <https://doi.org/10.5312/wjo.v6.i1.17>
- Hatch, M. N., Cushing, T. R., Carlson, G. D., & Chang, E. Y. (2018). Neuropathic pain and SCI: Identification and treatment strategies in the 21st century. *Journal of the Neurological Sciences*, 384, 75-83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.11.018>
- Heidari, N., Sajedi, F., Mohammadi, Y., Mirjalili, M., & Mehrpooya, M. (2019). Ameliorative Effects Of N-Acetylcysteine As Adjunct Therapy On Symptoms Of Painful Diabetic Neuropathy. *J Pain Res*, 12, 3147-3159. <https://doi.org/10.2147/jpr.S228255>

- Hejrati, N., & Fehlings, M. G. (2021). A review of emerging neuroprotective and neuroregenerative therapies in traumatic spinal cord injury. *Current Opinion in Pharmacology*, 60, 331-340. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coph.2021.08.009>
- Kallenborn-Gerhardt, W., Lu, R., Syhr, K. M., Heidler, J., von Melchner, H., Geisslinger, G., Bangsow, T., & Schmidtko, A. (2013). Antioxidant activity of sestrin 2 controls neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Antioxid Redox Signal*, 19(17), 2013-2023. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4958>
- Limcharoen, T., Muangnoi, C., Dasuni Wasana, P. W., Hasriadi, Vajragupta, O., Rojsitthisak, P., & Towiwat, P. (2021). Improved antiallodynic, antihyperalgesic and anti-inflammatory response achieved through potential prodrug of curcumin, curcumin diethyl diglutarate in a mouse model of neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*, 899, 174008. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174008>
- Little, J. W., Doyle, T., & Salvemini, D. (2012). Reactive nitroxidative species and nociceptive processing: determining the roles for nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in pain. *Amino Acids*, 42(1), 75-94. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0633-0>
- Lu, R., Kallenborn-Gerhardt, W., Geisslinger, G., & Schmidtko, A. (2011). Additive antinociceptive effects of a combination of vitamin C and vitamin E after peripheral nerve injury. *PLoS One*, 6(12), e29240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029240>
- Mata-Bermudez, A., Ríos, C., Burelo, M., Pérez-González, C., García-Martínez, B. A., 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*, 25(8), 1839-1851. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ejp.1795>
- Notartomaso, S., Scarselli, P., Mascio, G., Liberatore, F., Mazzon, E., Mammanna, S., Gugliandolo, A., Cruccu, G., Bruno, V., Nicoletti, F., & Battaglia, G. (2020). N-Acetylcysteine causes analgesia in a mouse model of painful diabetic neuropathy. *Mol Pain*, 16, 1744806920904292. <https://doi.org/10.1177/1744806920904292>
- Peter, C., Müller, R., Post, M. W. M., van Leeuwen, C. M. C., Werner, C. S., & Geyh, S. (2015). Depression in spinal cord injury: Assessing the role of psychological resources. *Rehabilitation Psychology*, 60, 67-80. <https://doi.org/10.1037/rep0000021>
- Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F. J., Mogil, J. S., Ringkamp, M., Sluka, K. A., Song, X. J., Stevens, B., Sullivan, M. D., Tutelman, P. R., Ushida, T., & Vader, K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161(9), 1976-1982. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>
- Roberts, R. A., Smith, R. A., Safe, S., Szabo, C., Tjalkens, R. B., & Robertson, F. M. (2010). Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicology*, 276(2), 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.07.009>
- Yowtak, J., Lee, K. Y., Kim, H. Y., Wang, J., Kim, H. K., Chung, K., & Chung, J. M. (2011). Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. *Pain*, 152(4), 844-852. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.12.034>
- Zhao, L., Tao, X., & Song, T. (2021). Astaxanthin alleviates neuropathic pain by inhibiting the MAPKs and NF-κB pathways. *European Journal of Pharmacology*, 912, 174575. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174575>
- Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16(2), 109-110. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(83)90201-4)