



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA.

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN.

Estrés oxidante en lesión traumática de médula espinal en ratas.

PROYECTO GENÉRICO.

Evaluación de productos relacionados con la salud.

ETAPA.

Desarrollo de métodos y técnicas analíticas para el control físico, químico, biológico y/o microbiológico de productos relacionados con la salud.

ALUMNO: Norman Manning Balpuesta.

MATRÍCULA: 2163024880.

ASESOR INTERNO.

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda.

ASESOR EXTERNO.

Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz.

FECHA DE INICIO: 09 de febrero de 2022.

FECHA DE TÉRMINO: 09 de agosto de 2022.

INTRODUCCIÓN.

GLUTATIÓN COMO ANTIOXIDANTE.

El glutatión reducido (GSH) es un tripéptido endógeno cuya estructura se encuentra conformada por un residuo de ácido glutámico, uno de cisteína y uno de glicina (ver FIG 1). Éste comprende alrededor del 95 % de todos los tioles no proteicos del cuerpo, lo que por antonomasia lo convierte en el compuesto sulfhídrico no proteico más abundante en mamíferos; funciona como antioxidante, desintoxicante, y eliminador de especies químicas reactivas (RXS) –de oxígeno, nitrógeno y radicales libres– (Adeoye, Olawumi, Opeyemi, & Christiana, 2018; National Center for Biotechnology Information, 2022; Aoyama, 2021).

En su rol de controlador de especies químicas dañinas, se comporta como sustrato ante la enzima glutatión S-transferasa para contrarrestar haluros, epóxidos y radicales libres; actúa ante la presencia de xenobióticos para contrarrestarlos por medio de eliminación de fase 2, para transformarlos en especies solubles en agua y desecharlas por la orina. Como sustrato de la enzima glutatión peroxidasa, previene daños por oxidación a fosfolípidos, proteínas y bases nitrogenadas, a través de la reducción de peróxidos y de metahemoglobina (Adeoye, Olawumi, Opeyemi, & Christiana, 2018; National Center for Biotechnology Information, 2022; Aoyama, 2021; Leaver & George, 1998; Muthukumar, Rajakumar, Sarkar, & Nachiappan, 2011).

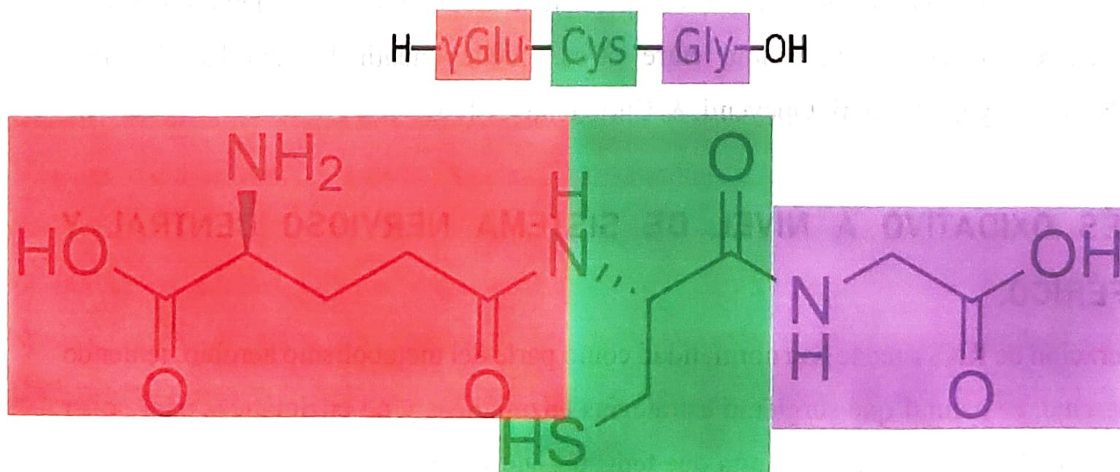
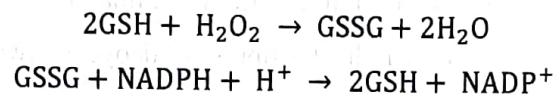


FIG 1. Estructura química de glutatión reducido, acompañado de fórmula de aminoácidos con nomenclatura de tres letras. Ácido glutámico resaltado en rojo, cisteína resaltada en verde y glicina resaltada en morado (National Center for Biotechnology Information, 2022).

El grupo sulfhidrido (-SH), contenido en el residuo de cisteína, confiere a la molécula su carácter reductor. En consecuencia, GSH se convertirá en glutatión oxidado (GSSG) a través de la dimerización de dos moléculas de GSH por medio de un enlace covalente entre los dos grupos sulfhidrido. Este proceso es reversible en presencia de la enzima glutatión reductasa y nicotidamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). En las ecuaciones mostradas a continuación, se puede apreciar el proceso previamente descrito (Adeoye, Olawumi, Opeyemi, & Christiana, 2018; Aoyama, 2021):



La síntesis de GSH es un proceso enzimático de dos pasos que requiere de ATP para su desarrollo. En el primer paso interviene la Glu-Cys ligasa y en el segundo interviene la GSH sintasa; en este proceso, el GSH ya existente inhibe la producción de nuevo GSH; así mismo, este proceso enzimático es dependiente de la disponibilidad de cisteína. El cuerpo almacena una cantidad finita de GSH, con una concentración entre los 0.5 y los 10 mM, dependiendo del tejido; derivado del proceso descrito en el párrafo anterior, una cantidad significativa se recicla y el faltante lo produce el organismo a partir de nutrientes presentes en la alimentación. No obstante, la dieta, el consumo de medicamentos –derivado de que GSH interviene en procesos de fase dos de eliminación de fármacos–, la polución, el estrés, contacto agudo o crónico con toxinas, contacto agudo o crónico con metales pesados, traumatismos, infecciones, radiación, entre otros, pueden abatir la cantidad de GSH disponible (Adeoye, Olawumi, Opeyemi, & Christiana, 2018).

ESTRÉS OXIDATIVO A NIVEL DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y PERIFÉRICO.

La generación de RXS sucede con normalidad como parte del metabolismo aerobio; teniendo esto presente, es natural que surgieran estrategias enzimáticas y no enzimáticas para poder mantener una homeostasis que permita que tengan lugar los procesos oxidativos necesarios para el correcto funcionamiento metabólico, al tiempo que se contrarresta la proliferación de especies químicas que resultarían en daños a las estructuras y procesos celulares. Bajo

condiciones fisiopatológicas concretas, la producción de RXS puede elevarse (Sies, 1997; Aoyama, 2021; Mata-Bermudez, y otros, 2021).

El estrés oxidativo se presenta cuando la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y radicales libres superan la capacidad de los procesos endógenos para su neutralización, derivado de una mayor abundancia de especies químicas, o bien a una escasez de antioxidantes (Adeoye, Olawumi, Opeyemi, & Christiana, 2018; Aoyama, 2021).

Cuando se genera un estado sostenido de estrés oxidativo, las estructuras celulares se ven comprometidas. En este orden de ideas, este fenómeno bioquímico ocurre en el marco del desarrollo de diversas fisiopatologías, entre ellas están: las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington; la esclerosis lateral amiotrófica; procesos diversos de muerte celular como el ocurrido a nivel de sistema nervioso periférico (SNP) tras una lesión traumática; entre otras. Las RXS resultan dañinas para estructuras y funciones celulares derivado de que su reactividad tiene como diana a proteínas, lípidos y bases nitrogenadas de funciones diversas. Dada esta circunstancia, se trata de un problema que se alimenta a sí mismo, debido a que la desregulación de procesos genómicos, y el daño por proteólisis y lipoperoxidación repercute en un aumento en la cantidad de RXN, si el déficit en especies antioxidantes continúa, los daños derivan en una degeneración progresiva del paciente, ocasionando que se agrave la condición (Angoa & Rivas, 2007; Ahuja, y otros, 2017; Eckert & Martin, 2017; Aoyama, 2021).

LESIÓN TRAUMÁTICA EN MÉDULA ESPINAL.

De acuerdo con información de la Organización Mundial de la Salud, se estima que, a nivel mundial, las lesiones traumáticas en médula espinal suelen presentarse entre 250,000 y 500,000 casos anuales. La gran mayoría de casos se deben a siniestros como accidentes de tránsito, caídas y actos de violencia. Menores ingresos y menor escolaridad están relacionados a una menor tasa de supervivencia, una mayor tasa de muerte prematura y mayores probabilidades de padecer esta condición.

En el territorio nacional, Estrada-Mondaca et al. (2007) calcularon una incidencia de 18.1 casos por cada millón de habitantes; aunque el recuento realizado por ellos no tiene una actualización, puede inferirse que la situación no ha mejorado. La literatura disponible más

bien aborda las posibles soluciones a la afección descrita. Igualmente, la OMS y Estrada-Mondaca et al. (2007) coinciden en que la condición es más común en pacientes varones.

DETECCIÓN DE GSH POR FLUORESCENCIA.

Diversos autores han documentado que la detección y cuantificación de glutatión puede hacerse mediante un método de fluorescencia. El fundamento consiste en hacer reaccionar en un medio alcalino al GSH con *o*-ftalaldehído para que se dé la conformación de un aducto glutatión indol (ver FIG 2).

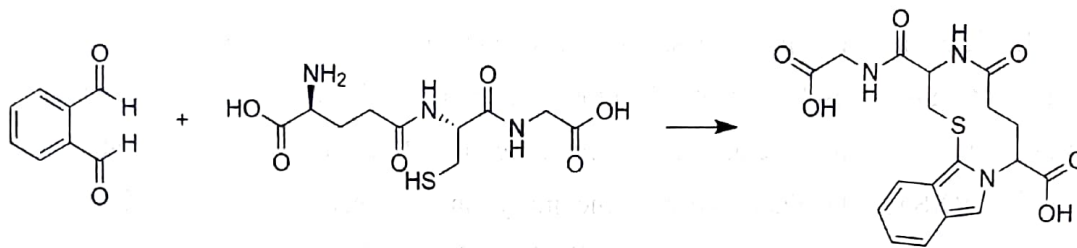


FIG 2. Reacción de *o*-ftalaldehído con glutatión para la formación de un aducto con características fluorescentes (National Center for Biotechnology Information, 2022; Francioso, y otros, 2021).

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Diseñar y estandarizar un método cuantitativo para la detección y cuantificación por espectrofotometría de fluorescencia de glutatión reducido en un modelo *in vivo* de lesión traumática en médula espinal en ratas.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Estandarizar el método para su tolerancia al utilizar un medio de homogeneización distinto al propuesto por Hissin & Hilf.
- Estandarizar el método para su utilización en otras regiones neurológicas.

METODOLOGÍA.

PARTICIPACIÓN DEL ALUMNO.

El método se evaluará con respecto a los tejidos de ratas sanas y a una curva de calibración compuesta por estándares externos de concentración conocida. Posteriormente, la asesora externa proporcionará al alumno los tejidos de 120 ratas Wistar hembra con el peso de tejido para que puedan ser procesados y cuya información será contrastada con los resultados de un método conductual y un método de lipoperoxidación realizados por otros alumnos suyos.

A partir del método propuesto por Hissin & Hilf (1976), en el cual se cuantifica GSH por espectrofotometría de fluorescencia en tejido hepático de rata Wistar. Debido al tipo de muestra –médula espinal– y a que a esas muestras se les practicarán otras pruebas bioquímicas, la participación del alumno de servicio social consiste en evaluar y argumentar si una modificación al método puede proporcionar resultados cuantitativos de valor.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Las muestras fueron analizadas en el espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer Fluorescence Spectrometer LS 50 B con una celda de cuarzo de 4 mL, a través del software Fl WinLab. Los ajustes del lector son:

- Slit = 5;
- Tiempo de integración = 1 segundo;
- λ de excitación = 350 nm, y;
- λ de emisión = 420 nm.

Los resultados de las intensidades dadas por el equipo se compararon con una curva de calibración de concentración conocida, a partir de un estándar externo, en las mismas condiciones que el tratamiento aplicado a las muestras.

TRATAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Para la estandarización del método, se le proporcionó al alumno 1 mL de homogenado de tejido de médula espinal de rata albina Wistar hembra. Éste consiste en 30 a 40 mg del tejido

obtenido de la disección de los animales de experimentación, procesado en un homogeneizador de pistilo, en 3 mL de solución salina isotónica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

VALIDACIÓN.

1. **LINEALIDAD.** Las tres curvas de calibración tienen valores de $r^2=0.9999$, por lo tanto, el método es lineal (ver Tabla 1 y FIG 3).

Volumen de solución stock (µL).	Concentración nominal (µM).	Curva de calibración 1 (intensidad de fluorescencia).		Curva de calibración 2 (intensidad de fluorescencia).		Curva de calibración 3 (intensidad de fluorescencia).	
0	0	9.673	9.348	9.089	9.225	9.714	9.462
37.5	4.5	18.301	19.196	19.428	20.149	18.985	19.056
75	9	28.137	27.159	30.682	27.352	29.726	28.842
150	18	49.389	48.205	48.858	48.201	49.562	49.277
300	36	88.128	89.154	90.171	88.117	89.572	88.889
600	72	166.321	165.949	166.720	165.002	165.998	166.403

Tabla 1. Contenido de solución Stock del analito con su concentración nominal y las intensidades obtenidas.

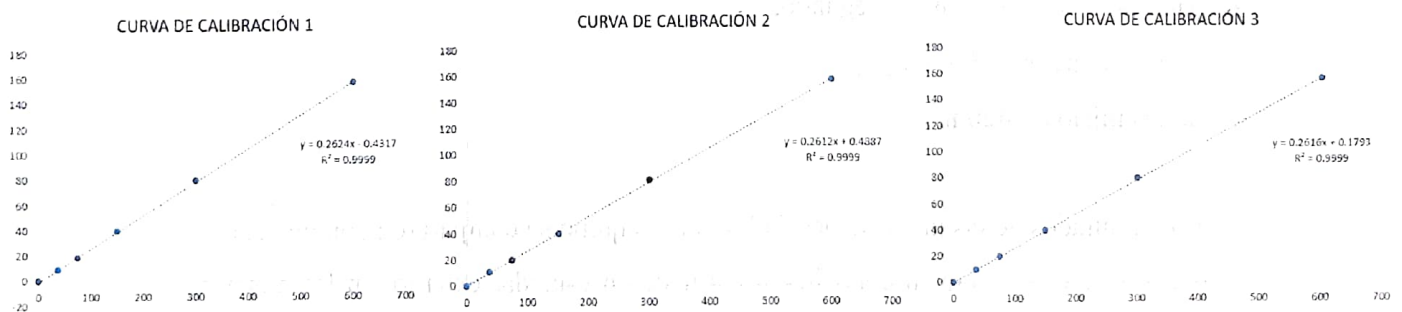


FIG 3. Representación gráfica de las curvas de calibración realizadas.

2. REPETIBILIDAD.

2.1. **PRECISIÓN.** Como aparece ilustrado en Tabla 2, ninguno de los valores entre repeticiones es mayor al 15 %, por lo tanto, el método es repetible.

Concentración nominal (μM).	Coefficiente de variación de curva 1 (%).	Coefficiente de variación de curva 2 (%).	Coefficiente de variación de curva 3 (%).
0	2.4164	1.0502	1.8584
4.5	3.3755	2.5754	0.2639
9	2.5013	8.1148	2.1345
18	1.7157	0.9573	0.4078
36	0.8185	1.6292	0.5412
72	0.1583	0.7324	0.1723

Tabla 2. Tabla de repetibilidad. Se muestran los valores de coeficiente de variación por puntos de la curva entre repeticiones.

2.2. EXACTITUD. Calculando la desviación absoluta de todos los puntos de las tres curvas en comparación con el respectivo valor nominal de concentración, ninguno de ellos tiene valores por encima del 15 %, por lo tanto, el método es preciso (ver Tablas 3 y 4).

Valor nominal (μM).	Valor calculado para intensidades de curva 1 (μM).		Valor calculado para intensidades de curva 2 (μM).		Valor calculado para intensidades de curva 3 (μM).	
4.5	4.2179	4.6272	4.7334	5.0631	4.5307	4.5632
9	8.7166	8.2693	9.8806	8.3575	9.4433	9.0390
18	18.4365	17.8950	18.1937	17.8932	18.5156	18.3853
36	36.1544	36.6237	37.0888	36.1494	36.8149	36.5025
72	71.9173	71.7472	72.0998	71.3141	71.7696	71.9548

Tabla 3. Comparación tabulada entre los valores nominales de la curva de calibración y las concentraciones que representa cada una de las intensidades individuales.

Valor nominal (μM).	Desviación absoluta para intensidades de curva 1 (%).		Desviación absoluta para intensidades de curva 2 (%).		Desviación absoluta para intensidades de curva 3 (%).	
4.5	6.2687	2.8278	5.1858	12.5138	0.6832	1.4049
9	3.1493	8.1193	9.7840	7.1385	4.9258	0.4334
18	2.4251	0.5833	1.0759	0.5935	2.8647	2.1405
36	0.4290	1.7325	3.0246	0.4150	2.2636	1.3958
72	0.1148	0.3511	0.1386	0.9527	0.3200	0.0627

Tabla 4. Valor de desviación absoluta para cada intensidad experimental.

3. REPRODUCIBILIDAD. Ninguno de los valores críticos dados para F es mayor a 5, por lo tanto, el método es reproducible.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	42622.40014	2	21311.20007	19.9795432	0.0004896	4.256494729
Columnas	4.656488778	2	2.328244389	0.00218276	0.99782015	4.256494729
Interacción	4.702865889	4	1.175716472	0.00110225	0.99999704	3.633088511
Dentro del grupo	9599.859173	9	1066.651019			
Total	52231.61867	17				

Tabla 5. Análisis de varianza entre curvas 1 y 2

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	42699.1813	2	21349.59065	19.9365383	0.00049349	4.256494729
Columnas	1.768401333	2	0.884200667	0.00082568	0.99917474	4.256494729
Interacción	2.355418333	4	0.588854583	0.00054988	0.99999926	3.633088511
Dentro del grupo	9637.897658	9	1070.877518			
Total	52341.20277	17				

Tabla 6. Análisis de varianza entre curvas 1 y 3.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	42348.02215	2	21174.01108	19.7439728	0.00051137	4.256494729
Columnas	2.672177444	2	1.336088722	0.00124585	0.9987551	4.256494729
Interacción	2.982635556	4	0.745658889	0.0006953	0.99999882	3.633088511
Dentro del grupo	9651.861936	9	1072.429104			
Total	52005.5389	17				

Tabla 7. Análisis de varianza entre curvas 2 y 3.

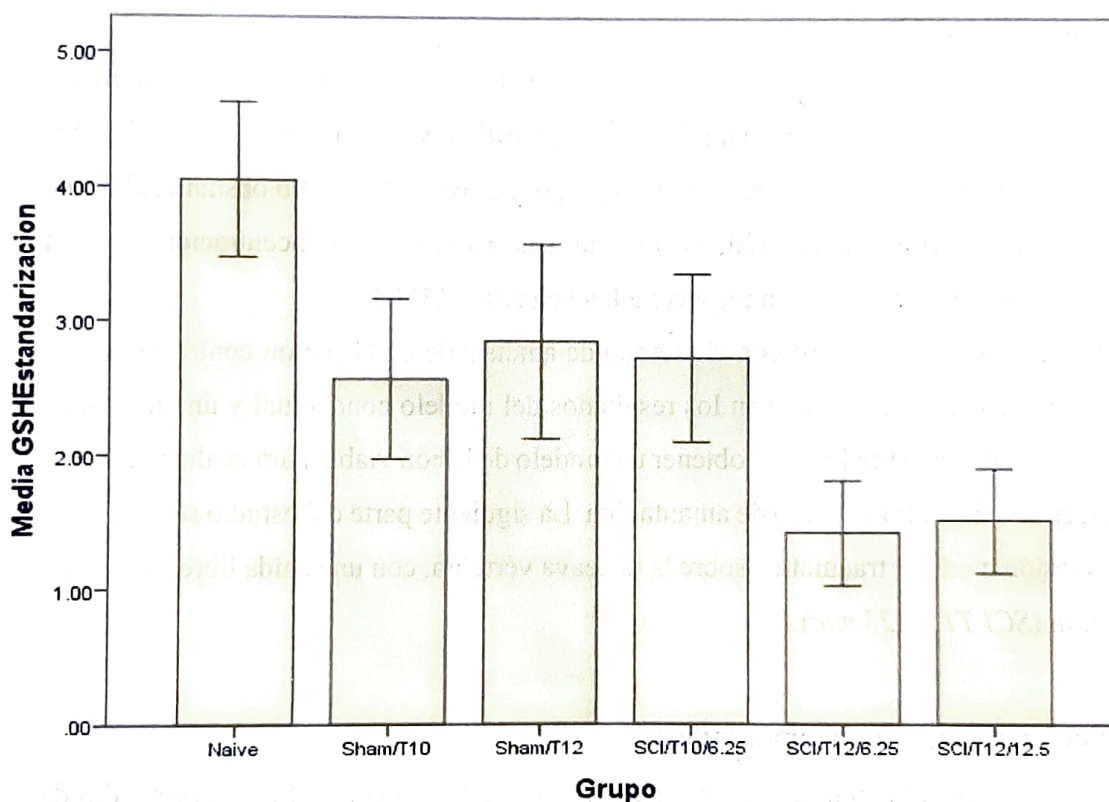
PARTICIPACIÓN EN EL EXPERIMENTO *IN VIVO*.

Grupos control.

El diseño experimental de la investigación en la que el alumno de servicio social fue partícipe consiste en 7 grupos de animales de experimentación con las siguientes denominaciones con las siguientes características:

- 1. Naïve:** ratas sanas con el propósito de medir los parámetros normales.
- 2. SHAM T10:** ratas a las que se les practicó laminectomía sobre la décima vértebra torácica con el propósito de establecer valores de oxidación basales.
- 3. SHAM T12:** respecto al grupo anterior, solo cambia que la laminectomía se les aplicó sobre la doceava vértebra torácica.
- 4. SCI T10 6.25 mm a:** lesión medular ocasionada sobre décima vértebra torácica con instrumento IMPACTOR dejando caer libremente una biela de 10 g desde una altura de 6.25 mm sobre la médula espinal expuesta.

5. **SCI T10 6.25 mm b:** otro grupo de 6 ratas con una lesión igual a la anterior.
6. **SCI T12 6.25 mm:** lesión medular ocasionada sobre doceava vértebra torácica con instrumento IMPACTOR dejando caer libremente una biela de 10 g desde una altura de 6.25 mm sobre la médula espinal expuesta.
7. **SCI T12 12.5 mm:** lesión medular ocasionada sobre doceava vértebra torácica con instrumento IMPACTOR dejando caer libremente una biela de 10 g desde una altura de 12.5 mm sobre la médula espinal expuesta.



Barras de error: ± 1 SE

FIG 4. Valores de concentración promedio de GSH para los grupos de control de lesión *Naive*, *SHAM T10*, *SHAM T12*, *SCI T10 6.25 mm*, *SCI T12 6.25 mm* y *SCI T12 12.5 mm*.

Una muestra biológica de cada una de las ratas que conforman estos grupos fue proporcionada al alumno de servicio social para que se analizara la cantidad de GSH presente en la región evaluada, de este modo se obtuvieron valores promedio para cada caso (ver FIG 4).

Como era de esperarse, las ratas *Naïve*, quienes no fueron intervenidas de ningún modo presentaron los valores de concentración de GSH más altos, debido a que no fueron expuestas a factores que les causaran estrés oxidativo. Por otro lado, las ratas de los grupos *SHAM* quienes fueron sometidas a un proceso quirúrgico que involucra remover fracciones óseas en la vértebra correspondiente a su grupo, tuvo una repercusión en forma de estrés oxidante en las ratas de experimentación, con esto se obtuvo un valor de concentración que muestra que hay una diferencia entre el estrés oxidativo provocado por la laminectomía *per se* y aquellas que recibieron, además de la intervención quirúrgica, el impacto dado por el instrumento IMPACTOR.

Por parte de los grupos de experimentación que fueron sometidos a lesión traumática de médula espinal, puede observarse un detrimento significativo en la concentración de GSH en comparación a los valores obtenidos por los grupos *Naïve* y *SHAM*. No obstante, el grupo *SCI T10 6.25mm* es la excepción, dado que sus valores de concentración no son estadísticamente significativos con respecto a los valores *SHAM T10*.

Los resultados obtenidos con el método de análisis de GSH fueron contrastados por los tutores y otros colaboradores con los resultados del modelo conductual y un análisis de lipoperoxidación con la finalidad de obtener un modelo de lesión viable para evaluar el efecto anti nociceptivo de un tratamiento de amantadina. La siguiente parte del estudio se realizó en ratas con lesión medular traumática sobre la doceava vértebra, con una caída libre de la biela de 6.25 mm (*SCI T12 6.25 mm*).

Grupos con tratamiento de amantadina.

Para evaluar los grupos con tratamiento, se comparó el valor de concentración promedio de GSH del grupo *Naïve* y *SHAM T12 6.25 mm* contra cinco grupos que fueron sometidos a lesión traumática *SCI T12 6.25 mm*, los cuales recibieron una de cinco dosis posibles de amantadina, correspondientes con el grupo que se le asignó a cada rata, con solución salina fisiológica como vehículo por medio de administración intraperitoneal de: 0 (correspondiente al grupo que sólo recibió solución salina isotónica), 6.25, 12.5, 25 y 50 mg/Kg del medicamento.

El grupo vehículo y el grupo con tratamiento de 6.25 mg/Kg de amantadina fueron las ratas que experimentaron mayor estrés oxidativo, mientras que quienes recibieron los

tratamientos de 25 y 50 mg/Kg tuvieron niveles de concentración más parecidos a las referencias *SHAM* y *Naïve*. Por este medio, el método proporcionó evidencia dentro del estudio dirigido por los tutores, de que el tratamiento con amantadina tiene un efecto antioxidante dosis-dependiente.

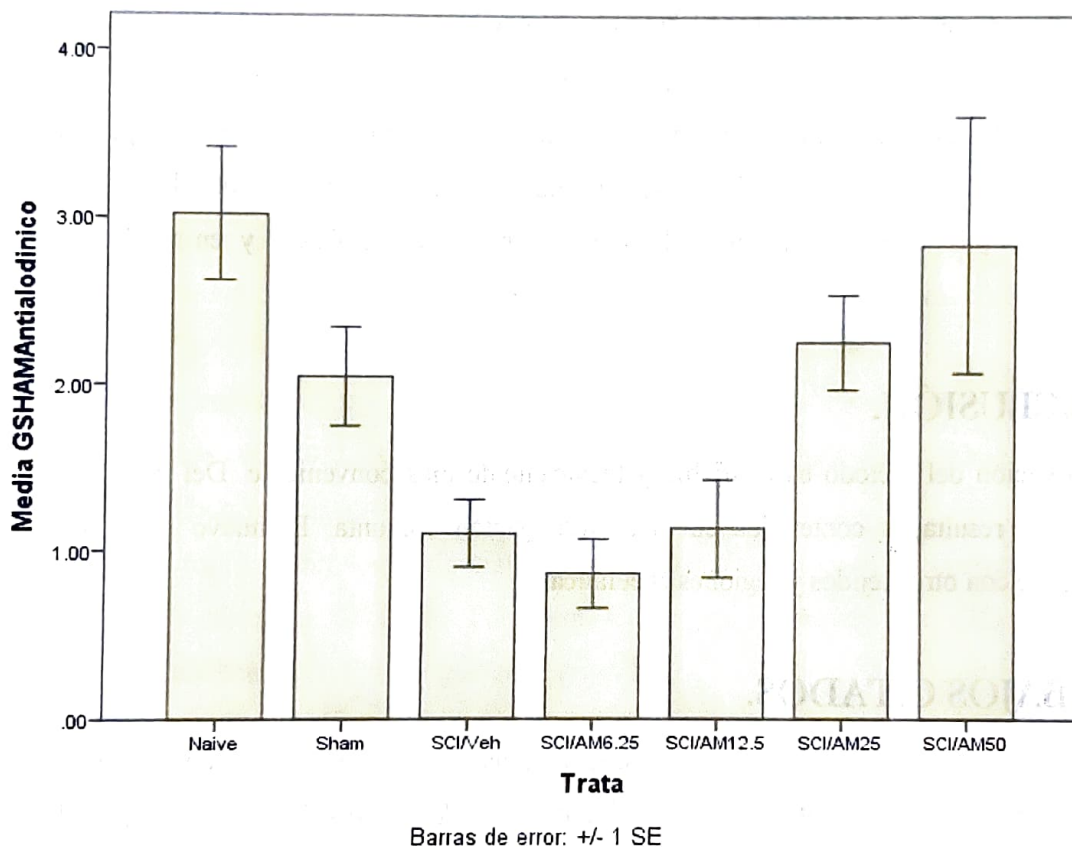


FIG 5. Valores de concentración de GSH promedio en grupos *Naïve*, *SHAM T12 6.25 mm*, y los grupos con lesión traumática *SCI T12 6.25 mm* que recibieron dosis: 0 (sólo vehículo de solución salina isotónica), 6.25, 12.5, 25 y 50 mg/Kg de amantadina.

OBSERVACIONES DEL MÉTODO.

Para las primeras muestras biológicas se evaluó el método de homogeneización de Hissin & Hilf (1976), para los tejidos evaluados: plasma, hígado, corteza frontal, hipocampo, médula ósea y médula espinal. El principal problema técnico que se afrontó con el método del que se partió fue la concentración original del homogenado, debido a que requería diluciones extra, significando la inclusión de dos operaciones unitarias adicionales, por lo tanto, una fuente de error y un gasto de solución amortiguadora, materiales, recursos y tiempo.

La transición hacia el uso de un homogenado en solución salina, con una proporción tejido/solución más baja, da como resultado un ahorro de tiempo en la preparación de las muestras para análisis, incorporación directa del sobrenadante al tubo de reacción, ahorro de reactivos, y menor exposición de muestras al exterior.

Por otro lado, las lecturas del espectrofotómetro de fluorescencia resultan más estables entre integraciones derivado del nuevo método de homogenización y del uso de agua desionizada en vez de metanol anhidro, para el lavado de la celda entre muestras.

Finalmente, compartir la preparación de la muestra con otro método analítico permite obtener información adicional de la misma muestra y coordinar eficientemente al equipo de investigación, lo que permitió el análisis de las muestras en fresco y en un horario compartido.

CONCLUSIÓN.

La adaptación del método es confiable y técnicamente más conveniente. Del método se obtuvieron resultados contenidos en una investigación conjunta. El nuevo método es compatible con otros tejidos y regiones encefálicas.


TRABAJOS CITADOS.

- Adeoye, O., Olawumi, J., Opeyemi, A., & Christiana, O. (2018). Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA Assisted Reproduction*, 22(1), 61-66. doi:10.5935/1518-0557.20180003
- Ahuja, C. S., Nori, S., Tetreult, L., Wilson, J., Kwon, B., Harrop, J., . . . Fehlings, M. G. (2017). Traumatic spinal cord injury—Repair and regeneration. *NEUROSURGERY*, 80(3), S9-S22.
- Angoa, M., & Rivas, S. (2007). Estrés oxidativo y neurodegeneración; ¿causa o consecuencia? *Arch Neurocién (Mex)*, 12(1), 45-54.
- Aoyama, K. (2021). Glutathione in the brain. *Int. J. Mol. Sci.*, 22. doi:10.3390/ijms22095010
- Eckert, M. J., & Martin, M. J. (2017). Trauma: spinal cord injury. *Surg Clin Am*, 97, 1031-1045. doi:10.1016/j.suc.2017.06.008

- Estrada-Mondaca, S., Carreón-rodriguez, A., Parra-Cid, M., Ibarra-Ponce de León, C., Velasquillo-Martínez, C., Vacanti, C., & Belkind-Gerson, J. (2007). Lesión de Médula Espinal y medicina regenerativa. *Salud Pública Mex*, 49(6), 437-444.
- Francioso, A., Fanelli, S., Cavallaro, R. A., Fontana, M., Matioli, R., D'Erme, M., & Mosca, L. (2021). Fluorometric optimized determination of total glutathione in erithrocytes. *Separations*, 8(83), 1-6. doi:10.3390/separations8060083
- Hissin, P. J., & Hilf, R. (1976). A Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. *Analytical Biochemistry*(74), 214-226.
- Mata-Bermudez, A., Ríos, C., Burelo, M., Pérez-Gonzalez, C., García-Martínez, B., Jardón-Guadarrama, G., . . . Díaz-Ruiz, A. (2021). Amantadine prevented hypersensitivity and decreased oxidative stress by NMDA receptor antagonism after spinal cord injury in rats. *Eur J Pain*, 1-13. doi:10.1002/ejp.1795
- National Center for Biotechnology Information. (2022). *Glutathione*. Recuperado el 19 de Septiembre de 2022, de PubChem Compound Summary for CID 124886: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/124886>
- National Center for Biotechnology Information. (2022). *o-Phthalaldehyde*. Recuperado el 19 de Septiembre de 2022, de PubChem Compound Summary for CID 4807: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4807>
- Organización Mundial de la Salud. (19 de Noviembre de 2013). *Lesiones Medulares*. Recuperado el 28 de Enero de 2022, de Datos y Cifras: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury>
- Sies, H. (1997). Physiological Society Symposium; Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. *Experimental Physiology*, 82, 219-295.

Vo. Bo. 
ASESOR INTERNO.

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda.

Vo. Bo. 
ASESOR EXTERNO.
Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz.