



INSTITUTO NACIONAL DE
NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

Ciencias Biológicas y de la Salud 04960, Mex

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

Informe Final de Servicio Social

Efecto anti-hiperalgésico de la gabapentina y su asociación con las concentraciones de óxido nítrico en un modelo de lesión traumática de la médula espinal en rata

Tutor interno:

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Firma

Tutor externo:

Dra. María de los Angeles Araceli Diaz Ruiz

Firma

Alumna:

Espinoza Toribio Georgina (2192031335)

2024

1. INTRODUCCIÓN

La lesión medular se refiere a un daño en la médula espinal que afecta las funciones motoras, sensitivas y autónomas del cuerpo. Este tipo de lesión puede causar dolor y afectar los sistemas urinario e intestinal, entre otros problemas, los cuales pueden persistir durante toda la vida del paciente (Rodríguez et al., 2020). Las principales causas de lesiones medulares son accidentes de tránsito, caídas y violencia. Se estima que entre el 20% y 30% de las personas con lesiones medulares experimentan síntomas de depresión. (OMS, 2013)

La hiperalgesia se define como una intensificación del dolor en respuesta a un estímulo doloroso. Esta respuesta aumentada es mediada por los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), cuya activación puede provocar alteraciones en el sistema sensorial y llevar a una excitación neuronal, manifestándose como un dolor anormal, relacionado con la hiperalgesia (Collins et al., 2010). En contraste, la alodinia se refiere a la respuesta dolorosa ante estímulos que normalmente no son dolorosos, lo que indica una sensibilidad anómala al dolor provocada por estímulos inofensivos (Yam, 2018).

La depresión puede dificultar la realización de diversas actividades. Los síntomas depresivos están relacionados con la actividad de los receptores de dopamina (Humo, 2019). Por otro lado, los receptores NMDA, que son receptores de glutamato, se han estudiado en relación con la depresión y el dolor neuropático debido a su papel en la regulación de este último (Dean, 2017).

El óxido nítrico se produce cuando los receptores NMDA son activados por el óxido nítrico-sintetasa. Este compuesto puede atravesar membranas celulares, y se ha demostrado que la inyección intratecal de donantes de óxido nítrico provoca una respuesta de hiperalgesia. Por el contrario, los inhibidores de la síntesis de óxido nítrico pueden prevenir esta respuesta, lo que sugiere que el óxido nítrico juega un papel en la modulación de la sensibilidad termoalgésica (Neira et al., 2004).

La gabapentina es un fármaco de primera línea recomendado para el tratamiento del dolor neuropático. (Russo, et al. 2023) Actúa en el sitio $\alpha 2\text{-}\Delta 1$ del canal de calcio controlado por voltaje, situado en cerebro y médula espinal, a su vez, actúa aumentando la síntesis y acumulación de ácido- γ -aminobutírico (GABA), inhibiendo la GABA-transaminasa y disminuyendo la liberación de monoaminas: dopamina, norepinefrina y serotonina. Se ha demostrado también su interacción con los receptores NMDA, proteína C y citocinas inflamatorias (Garg, 2017).

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto anti-hiperalgésico de la gabapentina respecto a la asociación que tiene con el óxido nítrico en un modelo de lesión traumática de médula espinal en rata utilizando la determinación de nitritos y nitratos por el método de Griess.

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, dando como resultado una alteración en las funciones motoras, sensitivas y autónomas, las cuales se ven reflejadas por debajo del sitio de 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 con 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 con 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).

2.2 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).

2.3 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)

2.4 GABAPENTINA

La gabapentina es un fármaco de primera línea recomendado para el tratamiento del dolor neuropático. (Russo, et al. 2023) Actúa en el sitio $\alpha 2\text{-}\Delta 1$ del canal de calcio controlado por voltaje, situado en cerebro y médula espinal, a su vez, actúa aumentando la síntesis y acumulación de ácido- γ -aminobutírico (GABA), inhibiendo la GABA-transaminasa y disminuyendo la liberación de monoaminas: dopamina, norepinefrina y serotonina. Se ha demostrado también su interacción con los receptores NMDA, proteína C y citocinas inflamatorias (Garg, 2017). Gabapentina presenta una amplia serie de efectos secundarios, entre estos se incluyen somnolencia, mareos, alteraciones visuales y disminución en la capacidad de reacción, estos efectos secundarios han ocasionado que los pacientes tengan un mal apego a su tratamiento, ya que se ha reportado que les resulta difícil realizar sus actividades diarias. A su vez, se han documentado también efectos adversos como vértigo,

2.5 ÓXIDO NÍTRICO

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).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La lesión traumática de médula espinal (LTME) genera dolor neuropático que afecta severamente la calidad de vida de los pacientes. Aunque la gabapentina es ampliamente utilizada para el tratamiento del dolor neuropático, se desconoce el mecanismo específico por el cual podría modular los niveles de óxido nítrico (NO) y su relación con el efecto anti-hiperalgésico en la LTME.

Este estudio es importante ya que la gabapentina, al inhibir los canales de calcio presinápticos y reducir la liberación de neurotransmisores excitatorios, podría tener un mecanismo de

acción relacionado con la modulación del óxido nítrico. Comprender esta interacción permitiría optimizar su uso terapéutico y potencialmente desarrollar tratamientos más efectivos para el dolor neuropático post-LTME.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto anti-hiperalgésico de la gabapentina y su asociación con las concentraciones de óxido nítrico en un modelo de lesión traumática de la médula espinal en rata

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1. Registrar las respuestas conductuales de hiperalgesia, alodinia en ratas con LTME en tratamiento con gabapentina, vehículo y fluoxetina como fármaco de referencia en depresión incluyendo ratas sanas

4.2.2. Evaluar el efecto anti-hiperalgésico y antialodínico de la gabapentina en ratas con LTME mediante su preferencia a sacarosa

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Las pruebas se realizaron con ratas hembra de la cepa Wistar de 200 a 250 gramos de peso, a las cuales se les practicó una LTME a nivel de la 12^a vértebra torácica, con una intensidad de lesión leve de 6.25 mm, con la finalidad de desarrollar un daño sin afectar las funciones motoras. Esto con la finalidad de generar daño en el tejido nervioso que desarrolle hiperalgesia la cual fueron evaluadas con filamentos de Von Frey. Los animales fueron distribuidos de forma aleatoria en los siguientes grupos: Naive (ratas sanas), un grupo sham (solo laminectomía), un grupo vehículo (con LTME y tratado con el vehículo del tratamiento) 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 gabapentina disuelta en solución salina fisiológica al 0.9% para su posterior administración intraperitoneal para la evaluación conductual hiperalgesia de las ratas.

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.

5.4 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

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, 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_x)

La determinación de nitratos y nitritos (NO_x) por el método de Griess es una técnica utilizada para cuantificar los metabolitos estables derivados del óxido nítrico (NO) (Tenorio et al., 2005).

5.5.1. Preparación de soluciones.

5.5.1.1. 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.

5.5.1.2 Solución Saturada de Cloruro de Vanadio III (Sol. VCl₃).

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.

5.5.1.3 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.

5.5.1.4. 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 µL de ácido clorhídrico (HCl) 37.5 %. Posteriormente, gotear agua desionizada hasta llenar $\frac{3}{4}$ partes de la perilla del matraz y se adiciono 200 mg de sulfanilamida, solubilizando completamente sólido antes de llevar al aforo con agua desionizada.

5.5.1.5 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.

5.5.1.6 Estándar de nitratos 1mM

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

5.5.1.7. 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.

5.5.1.8. Solución de Sulfato de Zinc (Sol. ZnSO₄-7H₂O) [1 M].

Se añadió 0.3702 g de ZnSO₄-7H₂O 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 (ZnSO₄-H₂O), pesar 0.8969gr para 5 mL de solución.

5.5.1.9. 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.

5.6. Preparación de la Curva de Calibración.

5.6.1 Curva de Calibración para desproteización 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 (μM) | Vol. (SE 10,000) (μL) | Vol. Aforo (μL) |
|--|------------------------------------|------------------------------|
| 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 μL y se adicionaron 15 μL 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 μL del sobrenadante y se colocaron en la placa de poliestireno de 96 pozos.
- Posteriormente se añadieron 200 μL 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.

5.7 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 homogenizo sobre hielo en Homogenizador Ultrasónico a amplitud del 40 % hasta homogeneidad del contenido.
- A 285 μL de homogenado se adiciono 15 uL 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 °C por 10 minutos.
- Se tomó 100 μL del sobrenadante y se depositaron en una placa de lectura de UV
- Se agregó 200 μL de la Mezcla Reactiva de Griess.
- Se colocó la placa en el lector de placas-UV y se incubó por 30 minutos durante 37 °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.

5.8. 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 Dunnet. Los resultados fueron expresados como el promedio + error estándar y fueron estadísticamente significativos con una $p < 0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la prueba conductual de alodinia e hiperalgesia se obtuvieron los resultados que se muestran en las figuras 1 y 2.

En donde se muestra la diferencia entre el Área Bajo la Curva (ABC) del efecto antialodínico y anti-hiperalgésico. Los datos obtenidos demostraron que la hipersensibilidad, se va desarrollando de manera significativa después de LTME, manteniéndose durante todo el periodo de observación, con relación a los animales con tratamiento de gabapentina se observó una reducción en comparación con el grupo control que únicamente fue tratado con vehículo.

Respecto a la evaluación del efecto de la gabapentina sobre la alodinia, en las ratas Naivè se observó un valor promedio de 63.97, en el grupo Sham (solo con laminectomía) de 61.42, en las ratas lesionadas y tratadas con el vehículo el valor fue de 136.61, mientras que el grupo LTME y tratado con gabapentina el valor promedio fue de 105.00 ± 16 ES (figura 1).

Se observa que Nivè y Sham tienen menor ABC a diferencia del grupo Alodinia, lo que indica que a mayor valor de ABC existe una mayor interacción con el fármaco, por lo tanto, menor reflejo en la conducta dolorosa, de acuerdo con lo reportado por Chaplan et al., 1994

Con respecto al efecto anti-hiperalgésico se obtuvieron los valores promedio de 106.06, 112.09, 52.98 y 59.20 ± 11 SE, para los grupos Nive, Sham, vehículo y gabapentina respectivamente. Chaplan et al., (1994) mencionan que la determinación de este efecto aumenta significativamente en los grupos a los cuales no se les administró el fármaco. Así como se muestra en la figura 2, el ABC del efecto anti-hiperalgésico es menor en el grupo administrado con gabapentina respecto a los grupos Sham y Nive.

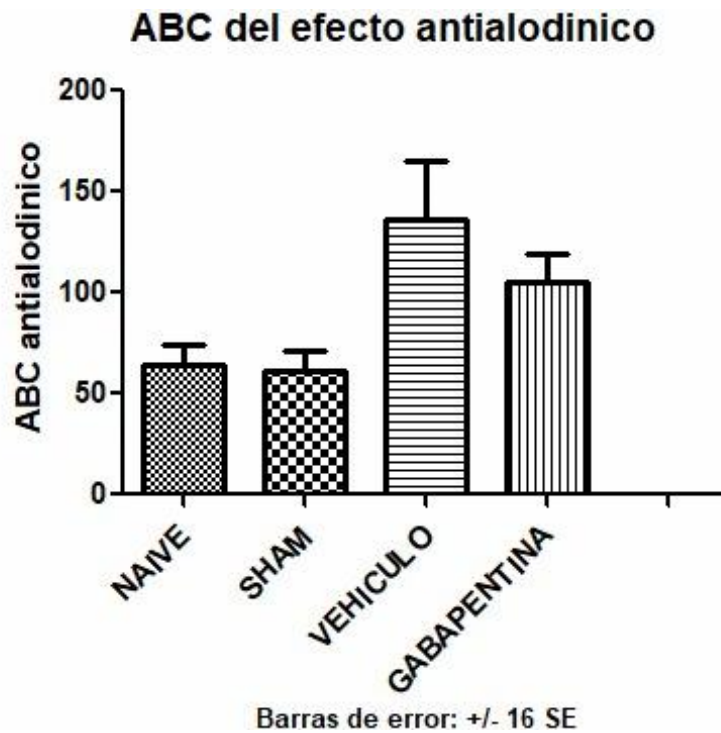


Figura 1. Gráfica en la que se muestran los resultados de la evaluación del efecto anti-hiperalgésico y de la gabapentina en ratas con lesión traumática de la médula espinal. Los valores corresponden al área bajo la curva del de los grupos Nivel (sanos), Sham (solo con laminectomía), Vehículo (ratas con Lesión traumática de la médula espinal y tratados con vehículo) y Gabapentina (ratas con Lesión traumática de la médula espinal y tratados con Gabapentina). ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett.

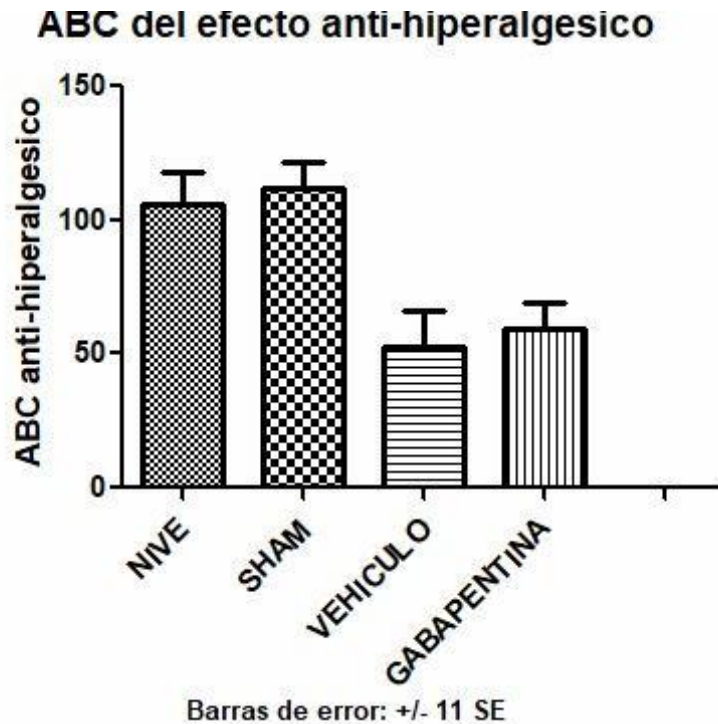


Figura 2. Gráfica en la que se muestran los resultados de la evaluación del efecto anti-hiperalgésico de la gabapentina en ratas con lesión traumática de la médula espinal. Los valores corresponden al área bajo la curva del de los grupos Nivel (sanos), Sham (solo con laminectomía), Vehículo (ratas con Lesión traumática de la médula espinal y tratados con vehículo) y Gabapentina (ratas con Lesión traumática de la médula espinal y tratados con Gabapentina) ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett.

Para la evaluación de óxido nítrico se obtuvo el resultado que se muestra en la figura 3. En el grupo Nive el valor obtenido es 0.22, en el grupo Sham se obtuvo 0.29, en los grupos de gabapentina y vehículo se observan los valores 0.11 y 0.10 similares entre ellos. Esto indica que los grupos a los cuales no se les administró el fármaco, tienen mayores niveles de óxido nítrico, por lo tanto, son más susceptibles a presentar depresión. Como lo menciona García M.C., 1997 el óxido nítrico produce efectos tanto inhibitorios como excitatorios sobre la actividad precanglionar simpática relacionada con el control de la presión arterial, pero no relacionada con la depresión.

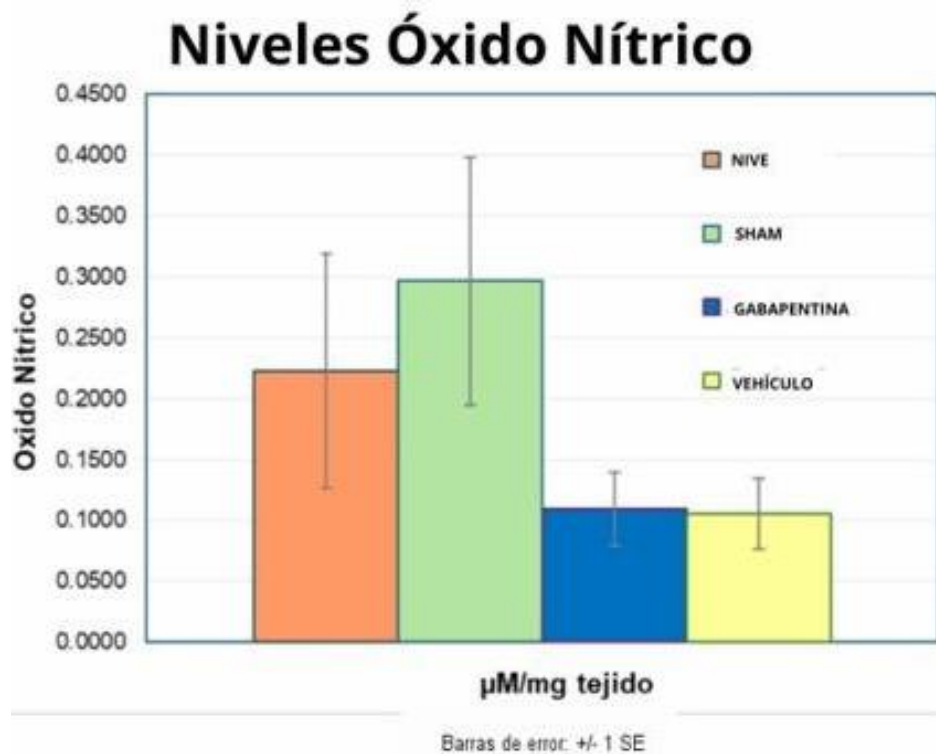


Figura 3. Gráfica en la que se muestran los resultados los niveles de óxido nítrico por efecto del tratamiento con gabapentina en ratas con lesión traumática de la médula espinal. Los valores corresponden al área bajo la curva del de los grupos Nivel (sanos), Sham (solo con laminectomía), Vehículo (ratas con Lesión traumática de la médula espinal y tratados con vehículo) y Gabapentina (ratas con Lesión traumática de la médula espinal y tratados con Gabapentina). Los resultados están dados en μM de Nitritos y Nitratos/mg de tejido fresco. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett.

7. CONCLUSIONES

1. En este estudio se demuestra que, la LTME a una intensidad leve a nivel de T12 produce respuestas conductuales de hiperalgesia y Alodinia en ratas, sin embargo al administrar el tratamiento a partir del día 14, el dolor disminuye en ellas.
2. Los niveles de óxido nítrico no son significativos para las conductas estímulo dependientes anti-hiperalgésico y antialodínico después de que las ratas hayan sufrido una LTME.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Arriagad, G. (2020). spinal cord injury (sci). bibliographic review. Elsevier, 31(5-6), 423-429. DOI: 10.1016/j.rmclc.2020.11.001
2. 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
3. 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.
4. Dean J & Keshavan M (2017). The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian journal of psychiatry*, 27, 101–111.
5. Del Valle, F. (2012). Steroids for acute spinal cord injury. Elsevier. 4(3), (179-180). DOI: 10.1016/j.neuarg.2012.06.008
6. Humo M, Lu H & Yalcin I (2019) The molecular neurobiology of chronic pain-induced depression. *Cell and tissue research*, 377(1), 21–43.
7. 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.
8. Neira, F & Ortega, J. (2004). NMDA glutamatergic receptor antagonists for the management of chronic pain. *Rev Soc Esp Dolor*; 11: 210-222.
9. Nesterowicz, M., Zendzian, M., Robert, J., Zalewska, A & Maciejczk, M. (2023). Antglycoxidative 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>
10. OMS, 2013, Lesiones de la Médula Espinal - Perspectivas Internacionales. Malta
11. 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>
12. 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>

13. Russo, M., Graham, B., & Santarelli, D. M. (2023). Gabapentin-Friend or foe?. *Pain practice : the official journal of World Institute of Pain*, 23(1), 63–69. <https://doi.org/10.1111/papr.13165>
14. 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.
15. Tenorio L., Fermín A.; del Valle M, Leonardo; Pastelín H., Gustavo. “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, enero-marzo, 2005, pp. 31-41. Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. Distrito Federal, México.
16. 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
17. 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.