

# Efecto neuroprotector y promotor de la recuperación funcional del tratamiento con WIN 55,212-2 en un modelo de lesión traumática de la médula espinal en rata

*Neuroprotective and functional recovery-promoting effect of WIN 55,212-2 treatment in a rat model of traumatic spinal cord injury*

Reyna Lamas,\* Camilo Ríos,<sup>‡</sup> Alfonso Mata-Bermúdez,<sup>§</sup>  
Marce Islas-Cortez,\* Araceli Diaz-Ruiz\*

## Palabras clave:

lesión traumática de la médula espinal, lipoperoxidación caspasas-8 y 3, recuperación funcional, WIN 55,212-2.

## Keywords:

spinal cord injury, lipoperoxidation, caspase-8 and 3, functional recovery, WIN 55,212-2.

## Resumen

**Introducción:** la lesión traumática de médula espinal (LTME) es un padecimiento que genera daño irreversible sobre la función sensitiva, motora y autonómica, para el que no se tiene un tratamiento eficaz que logre revertir el daño. La mayor incidencia se presenta en la población económicamente activa (20-45 años). La fisiología es muy compleja; sin embargo, se sabe que la excitotoxicidad, el estrés oxidante, la inflamación y la apoptosis son mecanismos de daño secundario claves que llevan a la pérdida del tejido adyacente sano, por lo que es necesario desarrollar tratamientos neuroprotectores eficaces. El uso de cannabinoides sintéticos como el WIN 55,212-2 (agonista sintético del receptor de cannabinoides) puede ser considerado como terapia neuroprotectora, ya que se ha reportado su efecto, antioxidante y antiinflamatorio en diferentes patologías. **Objetivo:** evaluar el efecto neuroprotector del WIN 55,212-2 en un modelo de LTME en rata. **Material y métodos:** evaluando los niveles de lipoperoxidación (LP) como marcador de estrés oxidativo, actividad de caspasas 8 y 3 como marcador de muerte celular por apoptosis y la recuperación funcional después de una LTME. **Resultados:** los hallazgos mostraron un incremento de los niveles de LP por efecto de la lesión, la cual disminuyó cuando los animales recibieron el tratamiento con WIN 55,212-2, asimismo se observó menor actividad de Caspasa-8 por efecto del WIN 55,212-2. Finalmente, los animales con WIN 55,212-2 mostraron un mejor desempeño funcional al ser comparados con el grupo control. **Conclusiones:** con estos resultados pudimos demostrar que el tratamiento con WIN 55,212-2 puede tener beneficio terapéutico después de una LTME; sin embargo, se requieren más estudios.

## Abstract

**Introduction:** spinal cord injury (SCI) is a disabling condition that generates irreversible damage to sensory, motor, and autonomic function, for which there is no effective treatment that can reverse the damage. The highest incidence occurs in the economically active population (20-45 years). The physiology is very complex, however; excitotoxicity, oxidative stress, inflammation and apoptosis are known to be crucial in secondary damage mechanisms that lead to the loss of adjacent healthy tissue, so it is necessary to develop effective neuroprotective treatments. The use of synthetic cannabinoids

\* Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía «Manuel Velasco Suárez».

<sup>‡</sup> Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Rehabilitación «Luis Guillermo Ibarra Ibarra».

<sup>§</sup> Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Ciudad de México, México.



**Citar como:** Lamas R, Ríos C, Mata-Bermúdez A, Islas-Cortez M, Diaz-Ruiz A. Efecto neuroprotector y promotor de la recuperación funcional del tratamiento con WIN 55,212-2 en un modelo de lesión traumática de la médula espinal en rata. Invest Discapacidad. 2024; 10 (1): 21-28. <https://dx.doi.org/10.35366/113827>



**Correspondencia:****Dra. Araceli Diaz-Ruiz****E-mail:** adiaz@innn.edu.mx

Recibido: 10 de agosto de 2023

Aceptado: 16 de octubre de 2023

such as WIN 55,212-2 (synthetic cannabinoid receptor agonist) can be considered neuroprotective therapy since its antioxidant and anti-inflammatory effect has been reported in different pathologies.

**Objective:** we evaluate the neuroprotective effect of WIN 55,212-2 in a spinal cord injury model in rats. **Material and methods:** we evaluated the participation of oxidative stress by measuring lipoperoxidation (LP) levels, caspase 8 and 3 activity as a marker of cell death by apoptosis, and functional recovery after SCI. **Results:** the findings showed, an increase in LP by effect of damage and a decrease when WIN 55,212-2 was administered. Likewise, an increase in the activities of caspases 3 and 8 was observed due to the effect of trauma that was not reversed by the treatment. Finally, the animals with WIN 55,212-2 showed a better functional performance when compared with the control group. **Conclusions:** with these results we were able to demonstrate that treatment with WIN 55,212-2 may have a therapeutic benefit after LTME, however, further studies are required.

**Abreviaturas:**

DMSO = dimetilsulfóxido.

EROS = especies reactivas de oxígeno.

FDA = Food and Drug Administration.

IL-1 $\beta$  = interleucina 1 beta.

LP = lipoperoxidación.

LTME = lesión traumática de médula espinal.

pNA = cromóforo p-nitroanilina.

RI = respuesta inflamatoria.

TNF- $\alpha$  = necrosis tumoral alfa.**INTRODUCCIÓN**

La lesión traumática de médula espinal (LTME) es un padecimiento grave con alta mortalidad que en la mayoría de los casos produce una discapacidad permanente. Ocurre cuando el tejido nervioso de la médula espinal se daña y se interrumpe la comunicación axonal, lo que resulta en la pérdida de la función motora y sensitiva por debajo del nivel del trauma. Después de una lesión primaria irreversible, inician una serie de mecanismos autodestructivos (lesión secundaria) que dañan el tejido nervioso.<sup>1</sup> Durante esta etapa se presentan daño vascular, alteración iónica, formación de radicales libres, acumulación de neurotransmisores excitatorios (excitotoxicidad), respuesta inflamatoria (RI) y apoptosis, posteriormente en las etapas subaguda y crónica, se observa desmielinización de axones, degeneración Walleriana, remodelación, regeneración y la formación de una cicatriz glial.<sup>2</sup> Para inhibir o disminuir estos mecanismos, se han utilizado diversos fármacos como la metilprednisolona que es el tratamiento más empleado para este padecimiento; sin embargo, no ha demostrado ser eficaz, y su administración trae consigo una gran cantidad de efectos adversos que ponen en riesgo la vida de los pacientes, es por eso que la Food and Drug Administration (FDA) de los EE. UU. no ha aprobado su uso. Por tal motivo, se siguen desarrollando nuevas estrategias neuroprotectoras (sin éxito hasta el momento).

Recientemente, se ha propuesto el uso de cannabinoides como terapias neuroprotectoras en di-

versos padecimientos del sistema nervioso, como la enfermedad de Parkinson,<sup>3</sup> el estatus epiléptico,<sup>4</sup> el infarto cerebral,<sup>5</sup> en isquemia de la médula espinal,<sup>6</sup> etcétera. Asimismo, se ha reportado que la activación de receptor de cannabinoides CB2 se asocia con una reducción en el rodamiento y la adhesión de los glóbulos blancos a lo largo de las células endoteliales vasculares cerebrales, una reducción en el tamaño del infarto y un mejor desempeño funcional motor después de una isquemia focal transitoria en ratones.<sup>7</sup> De forma particular se ha reportado que el WIN 55,212-2, un agonista sintético de los receptores CB1 y CB2 de cannabinoides, tiene efecto antiinflamatorio, antioxidante y neuroprotector en un modelo *in vitro* de daño por hiperglucemia más péptido amiloide  $\beta$  oligomérico,<sup>8</sup> en este estudio se observó una reducción de los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROS), actividades de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, además de disminución en algunos marcadores de estrés nitrosativo. Asimismo, en este trabajo se demostró que el tratamiento disminuye los niveles de algunas moléculas relacionadas con la RI como son, la sintasa del óxido nítrico inducible, la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), lo que llevó al incremento en viabilidad celular. De igual forma, en modelos *in vivo* de infarto cerebral y LTME se ha demostrado que el tratamiento con WIN 55,212-2 tiene efecto antiinflamatorio, antiapoptótico y neuroprotector. Así lo reportan Sun y colaboradores,<sup>5</sup> en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media en ratas, observando que el tratamiento con WIN 55,212-2 promueve la proliferación de las células en la zona de penumbra después del infarto, al ejercer un efecto neuroprotector. Mientras que Su y colegas<sup>9</sup> demostraron reducción del daño secundario después de una LTME, por efecto del tratamiento con WIN 55,212-2, siempre y cuando el tratamiento se admi-

nistre inmediatamente después del daño. Con base en esta información, en el presente trabajo evaluamos el efecto antioxidante, antiapoptótico y neuroprotector del WIN 55,212-2, iniciando el tratamiento tres horas después del daño en un modelo de lesión traumática de la médula espinal en rata.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Consideraciones éticas para el uso de animales en la experimentación: para la realización del presente estudio, se siguieron los lineamientos establecidos a nivel internacional, así como por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, en la cual se establecen los criterios y especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Cirugía y cuidados postoperatorios: se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar adultas de 200 a 250 g de peso, asignadas a los grupos experimentales de manera aleatorizada. A los animales se les practicó una LTME o un procedimiento quirúrgico falso (laminectomía), con previa anestesia de pentobarbital sódico (50 mg/kg) administrado por vía intraperitoneal. Durante la cirugía la temperatura corporal se mantuvo a 37 °C. Se les practicó una incisión en la piel y se disecó el tejido conectivo y muscular para dejar expuestos los procesos espinosos, una vez realizado este procedimiento se retiró de manera cuidadosa la lámina torácica 9 para dejar expuesta la médula espinal. Al finalizar la cirugía, los animales controles no lesionados se suturaron y el resto fueron sometidos a una lesión por contusión moderada utilizando un equipo desarrollado por la Universidad de Nueva York (*New York University Spinal Cord Impactor*). La lesión se produjo dejando caer un cilindro metálico de 10 g de peso de una altura de 25 mm (25 g/cm), directamente sobre la médula espinal. Inmediatamente después de la cirugía los animales recibieron cuidados postoperatorios en una cámara de cuidados intensivos para pequeñas especies (Schoer Manufacturing CO., Kansas City, MO.), así como un tratamiento farmacológico antipirético con acetaminofén (5 mL/2 L de H<sub>2</sub>O) y antibiótico con benzatina bencilpenicilina de 1,200,000 U en dosis única (200 µL intramuscular). Durante siete días, se les manipuló la vejiga y los intestinos para su vaciamiento cada 12 horas durante los primeros tres días (etapa de choque medular) y cada 24 horas en los subsecuentes cuatro días. Finalmente, los animales fueron colocados de manera individual en cajas de acrílico, diariamente se realizaron chequeos del

estado de salud, para evitar la aparición de úlceras por decúbito, durante todo el estudio los animales se mantuvieron en ciclos de 12 horas luz/obscuridad y con libre acceso al agua y al alimento.

Tratamiento farmacológico: los animales fueron asignados de forma aleatoria a cada uno de los cuatro grupos como sigue: grupo con laminectomía (sólo con procedimiento quirúrgico) tratados con vehículo (DMSO/10%, Twen 80/5% y solución salina/85%), por vía i.p., grupo LTME/Veh: animales con lesión más vehículo, grupo LTME/WIN 0.3 mg y grupo LTME/WIN 3 mg: animales lesionados y tratados con WIN 55,212-2 a 0.3 mg/kg (dosis baja) o con 3.0 mg/kg (dosis alta) respectivamente cada 24 horas iniciando el tratamiento tres horas después del daño (una sola dosis) para los animales a los que se les evaluó los niveles de LP y actividad de caspasas 8 y 3, mientras que para los animales a los que se les evaluó la función motora el tratamiento fue por tres días una dosis cada 24 horas, este esquema de tratamiento fue establecido de acuerdo con lo reportado por Page y colaboradores.<sup>10</sup>

Ensayo de lipoperoxidación: los animales fueron sacrificados 24 horas después del daño de acuerdo con lo reportado por Díaz-Ruiz y colegas<sup>11</sup> como pico máximo de LP después de la LTME. La cuantificación de la peroxidación de lípidos se realizó mediante la técnica descrita por Triggs y Willmore<sup>12</sup> para determinar los productos finales de la LP. Las ratas se sacrificaron por decapitación para obtener el tejido fresco del epicentro de la lesión, el cual fue homogeneizado en solución salina, se tomó una alícuota de 1 mL y se le incorporaron 4 mL de una mezcla de cloroformo metanol y se dejó reposar durante 30 min para permitir la separación de la fase clorofórmica; posteriormente, se hizo la lectura en un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS50B a 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. Los resultados se expresaron en unidades de fluorescencia por gramo de tejido.

Ensayo de la actividad de caspasa-8 y caspasa-3 en el hipocampo: previo a realizar el ensayo de caspasas, determinamos las concentraciones de proteína de cada muestra utilizando el método de Lowry,<sup>13</sup> como se describe: cada muestra se diluyó 1:50 (50 µL de homogeneizado + 950 µL de agua), 0.4 mL de la muestra diluida se pipeteó y se adicionaron 2 mL de la siguiente solución: 49 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% + 0.5 mL de CuSO<sub>4</sub> al 1%, 10 min después se adicionó el reactivo folin fenol 1:1 (0.2 mL por muestra) y 30 min después las muestras fueron leídas en espectrofotómetro de UV/visible Perkin-Elmer lambda 20, a 550

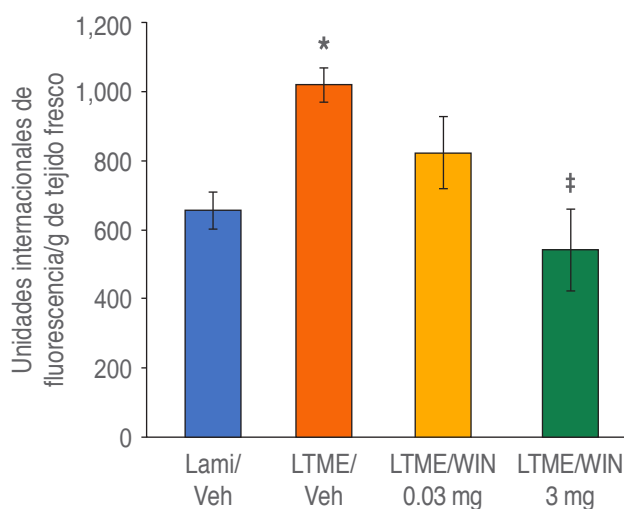
nm. Es importante mencionar que la concentración de proteínas necesaria para realizar la prueba de actividad de caspasas en el hipocampo debe ser de 250  $\mu\text{g}$  por muestra. La actividad de caspasa-8 se evaluó utilizando un kit colorimétrico (APT 171 Merck Millipore) que reconoce la secuencia de aminoácidos IETD, este ensayo se basa en la detección del cromóforo p-nitroanilina (pNA) después de la escisión del sustrato marcado IETD-pNA el pNA es liberado. Asimismo, la actividad de la caspasa-3 se midió utilizando un kit de ensayo colorimétrico (APT165 Merck Millipore) que identifica la secuencia de aminoácidos DEVD. Este ensayo se basa en la detección del cromóforo pNA después de la escisión del sustrato marcado DEVD-pNA, el pNA es liberado. Todas las actividades se midieron a 405 nm, utilizando un espectrofotómetro de microplacas (BioTek Eon™).

**Evaluación funcional:** los animales fueron evaluados al día siguiente de la lesión para comprobar la ausencia de movimiento en los miembros posteriores, y subsecuentemente se realizó la evaluación motora una vez por semana durante un mes, utilizando la escala BBB (Basso, Beattie y Bresnahan) estandarizada por Basso y su equipo.<sup>14</sup> Esta escala consta de 22 grados de recuperación en la que se describe con detalle cada uno de los movimientos de las articulaciones de los miembros posteriores (cadera, rodilla y tobillo), así como la coordinación entre las extremidades anteriores y las posteriores durante la marcha, cabe mencionar que previo a la evaluación los animales fueron habituados a la superficie en la cual fueron colocados para su evaluación, cada animal fue evaluado en sesiones de cinco minutos (como máximo) para evitar la fatiga y confundir el desempeño motor. La evaluación fue realizada por tres observadores que desconocían la asignación de los tratamientos (evaluación en ciego).

**Análisis estadístico:** en todos los casos se realizó un análisis exploratorio de los datos para determinar si los valores tenían una distribución normal aplicando la prueba de Kolmogorov-Smirnov y homogeneidad de varianzas aplicando la prueba de Levene. Una vez determinado esto, se utilizaron pruebas estadísticas paramétricas ANOVA de una vía seguida de la prueba *post hoc* de Tukey para analizar los valores del ensayo de LP y actividad de caspasas-8 y 3 mientras que, la prueba de ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett fue aplicada para analizar los resultados de la evaluación funcional. En todos los casos se tomó como diferencia significativa una  $p < 0.05$ . Paquete estadístico SPSS 21.0.

## RESULTADOS

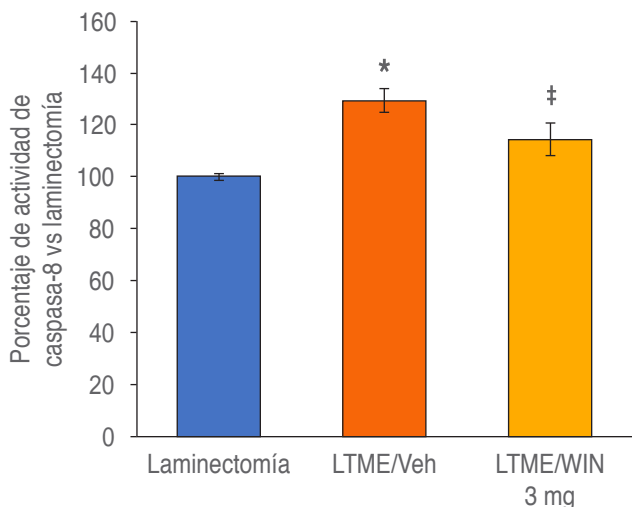
El WIN 55,212-2 disminuye la LP después de la lesión de la médula espinal: los resultados de la cuantificación de la LP evaluada a 24 horas después del daño se muestran en la **Figura 1**, los valores están expresados en unidades internacionales de fluorescencia por gramo de tejido y representan el valor promedio  $\pm$  error estándar de seis a ocho animales por grupo. El valor promedio de LP en el grupo con laminectomía fue de  $656.15 \pm 53.28$ , mientras que en el grupo LTME y vehículo fue de  $1,017.77 \pm 49.83$ , asimismo en los animales lesionados y tratados con WIN 55,212-2 a dosis baja (LTME/WIN 0.03 mg) fue de  $822.49 \pm 103.79$  desmotándose una reducción de la LP por efecto del WIN 55,212-2 administrado a dosis baja aunque éste no fue estadísticamente significativo, finalmente los valores promedio en los animales lesionados y tratados con WIN 55,212-2 a



**Figura 1:** Efecto del tratamiento con WIN 55,212-2 sobre la cantidad de productos finales de la lipoperoxidación evaluados 24 horas después del daño, los valores están expresados como unidades internacionales de fluorescencia por gramo de tejido y son el valor promedio  $\pm$  error estándar. Laminectomía (sólo con procedimiento quirúrgico), LTME/Veh: animales con lesión traumática de la médula espinal y vehículo (grupo control), LTME/WIN 0.3 mg: animales con lesión y tratados con WIN 55,212-2 a una dosis de 0.3 mg/kg en dosis única (dosis baja) iniciando el tratamiento tres horas después de la lesión, LTME/WIN 3 mg: animales con lesión y tratados con WIN a una dosis de 3 mg/kg en dosis única (dosis alta). ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). LTME = lesión traumática de médula espinal.

\* Diferente del grupo con laminectomía. ‡ Diferente vs grupo LTME/Veh.





**Figura 2:** Efecto del tratamiento con WIN 55,212-2 sobre la actividad de caspasa-8 evaluada 24 horas después del daño. Los valores están expresados en porcentaje de actividad de caspasa-8 con respecto al grupo control y corresponden al valor promedio  $\pm$  error estándar. Laminectomía: sólo con el procedimiento quirúrgico, LTME/Veh: animales con lesión traumática de la médula espinal y vehículo (grupo control), LTME/WIN: animales con lesión y tratados con WIN 55,212-2 (3 mg/kg en dosis única) iniciando el tratamiento tres horas después de la lesión. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). LTME = lesión traumática de médula espinal.

\* Diferente del grupo con laminectomía. † Diferente vs grupo LTME/Veh.

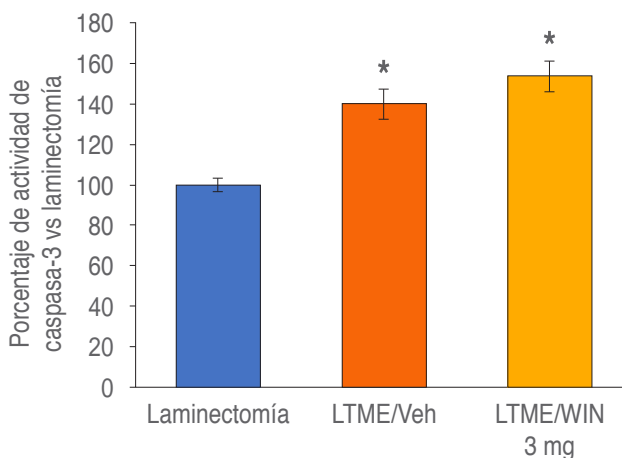
dosis alta fue de  $542.02 \pm 117.04$ , observándose que la reducción en la LP fue estadísticamente significativa al ser comparados con el grupo con lesión y tratados sólo con vehículo ANOVA seguida de la prueba de Tukey.

El WIN 55,212-2 disminuye la actividad de la caspasa-8 después de la lesión de la médula espinal: la activación de la vía extrínseca de la apoptosis se evaluó a través de la actividad de la caspasa-8. Los resultados obtenidos de la actividad de la caspasa-8 se muestran en la **Figura 2**. Los valores están expresados en porcentaje de actividad de caspasa-8 con respecto al grupo con laminectomía y son el valor promedio  $\pm$  SEM de cuatro a seis animales por grupo. Como se puede apreciar, hay un aumento significativo en la actividad de caspasa-8 por efecto de la lesión ( $129.26 \pm 4.39$ ), que corresponde a 29.26%, al ser comparado con el grupo con laminectomía (sólo con procedimiento quirúrgico) ( $100 \pm 1.26$ ) con respecto al grupo con lesión y tratado con WIN 55,212-2 el valor promedio de actividad fue de  $114.51 \pm 5.96$ , lo que corresponde a una disminución de la actividad de -13%, al ser

comparada con el grupo lesionado no tratado, esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

El WIN 55,212-2 no disminuye la actividad de la caspasa-3 después de la lesión de la médula espinal: los resultados obtenidos de la actividad de la caspasa-3 se muestran en la **Figura 3** y están expresados como porcentaje con respecto al grupo con laminectomía, como podemos observar existe un incremento de la actividad de caspasa-3 por efecto de la lesión de 40% ( $139.99 \pm 7.43$ ), al ser comparada con la del grupo con laminectomía, esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Mientras que los valores de actividad del grupo con lesión y tratado con WIN 55,212-2 fueron de  $153.64 \pm 7.62$  mostrando que el tratamiento no fue capaz de reducir la actividad de dicha caspasa al ser comparado con los valores del grupo con lesión y sin tratamiento.

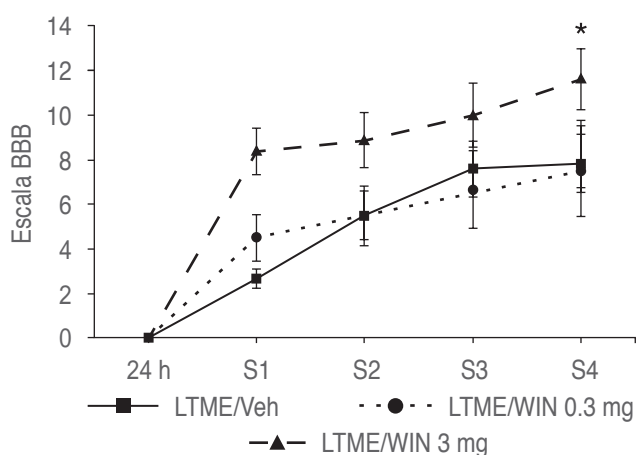
El WIN 55,212-2 administrado a dosis altas favorece una mejor recuperación funcional después de la lesión de la médula espinal: los resultados del efecto de la administración de WIN 55,212-2 a dos diferentes dosis sobre la función motora evaluada durante



**Figura 3:** Efecto del tratamiento con WIN 55,212-2 sobre la actividad de caspasa-3 evaluada 24 horas después del daño. Los valores están expresados en porcentaje de actividad de caspasa-3 con respecto al grupo con laminectomía y corresponden al valor promedio  $\pm$  error estándar. Laminectomía: sólo con el procedimiento quirúrgico, LTME/Veh: animales con lesión traumática de la médula espinal y vehículo (grupo control), LTME/WIN: animales con lesión y tratados con WIN 55,212-2 (3 mg/kg en dosis única) iniciando el tratamiento tres horas después de la lesión. ANOVA de una vía seguida de la prueba Tukey.

LTME = lesión traumática de médula espinal.

\*  $p < 0.05$ .



**Figura 4:** Efecto de WIN 55,212-2 sobre la recuperación motora evaluada durante cuatro semanas (S) en ratas con LTME. LTME/Veh: animales con lesión traumática de la médula espinal y vehículo (grupo control), LTME/WIN 0.3 mg: animales con lesión y tratados con WIN 55,212-2 a una dosis de 0.3 mg/kg en dosis única (dosis baja) iniciando el tratamiento tres horas después de la lesión, LTME/WIN 3 mg: animales con lesión y tratados con WIN 55,212-2 a una dosis de 3 mg/kg en dosis única (dosis alta). Los valores están expresados como el promedio  $\pm$  error estándar de seis animales por grupo. Los resultados fueron analizados con una ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. BBB = Basso, Beattie y Bresnahan. LTME = lesión traumática de médula espinal.

\*  $p < 0.05$  vs grupo LTME/Veh.

cuatro semanas se muestran en la **Figura 4**. Como podemos observar existe un menor desempeño funcional en los animales con LTME que sólo reciben el vehículo (LTME/vehículo), así como en el grupo que sólo recibe tratamiento con WIN 55,212-2 a dosis baja (0.3 mg/kg) desde la primera semana de evaluación, observándose un valor promedio de  $2.67 \pm 0.40$  y  $4.5 \pm 1.04$ , respectivamente, mientras que en el grupo con LTME y tratado con las dosis altas de WIN 55,212-2 (3.0 mg/kg) el valor promedio en la primera semana fue de  $8.37 \pm 1.03$  (**Figura 4**). Finalmente, los resultados de la recuperación funcional evaluada cuatro semanas después del daño mostraron mejor recuperación funcional sólo en el grupo tratado con WIN 55,212-2 a dosis alta (3 mg) al ser comparado con el grupo control tratado sólo con vehículo ( $11.63 \pm 1.34$  y  $7.8 \pm 1.29$ , respectivamente), esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), lo que demuestra que el tratamiento con WIN 55,212-2 tiene un efecto dosis respuesta ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett.

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo demostraron que la LTME produce daño oxidativo, ya que los niveles de LP se incrementaron de forma significativa al ser comparados con el grupo control (sólo con laminectomía), este efecto concuerda con lo reportado previamente por nuestro grupo en un modelo de lesión por contusión en rata.<sup>11</sup>

Asimismo, se observó que el tratamiento con WIN 55,212-2 a dosis alta (3 mg/kg) administrado tres horas después del daño tiene efecto antioxidante al disminuir los niveles de LP. Este hallazgo es interesante, ya que es el primer estudio que demuestra este efecto después de una LTME.

El mecanismo por el cual el WIN 55,212-2 ejerce dicho efecto puede ser por su capacidad para inhibir la excitotoxicidad, esto basado en los hallazgos de Rangel-López y colaboradores,<sup>15</sup> quienes demostraron que el WIN 55,212-2 reduce el daño oxidativo en un modelo de excitotoxicidad inducido por ácido quinolínic (un agonista de los receptores N-metil-D-aspartato [NMDA]). Los resultados de este estudio mostraron disminuir los niveles de LP y de EROS en cultivo de células del cuerpo estriado de rata.

Con base en esta información, es probable que el efecto antiexcitotóxico del WIN 55,212-2 sea el mecanismo responsable de la disminución del daño oxidativo después de la lesión, ya que la excitotoxicidad es un mecanismo de daño secundario que se observa durante la etapa aguda después de una LTME.<sup>16</sup>

Por otra parte, pudimos demostrar que la LTME incrementa la actividad de la caspasa-8 y que el tratamiento con WIN 55,212-2 disminuye dicha actividad. Se sabe que la caspasa-8 se activa por efecto del TNF, sintetizado durante la RI, activándose la vía extrínseca de la apoptosis. En un estudio previo de nuestro grupo<sup>17</sup> demostramos que la LTME incrementa la actividad de la caspasa-8, lo que concuerda con los resultados de este estudio. Asimismo, observamos disminución de la actividad de la caspasa-8 por efecto del WIN 55,212-2, aunque se desconoce cuál puede ser el mecanismo, se ha descrito que el WIN 55,212-2 tiene efecto antiinflamatorio, así lo reporta Fernández-López y colegas<sup>18</sup> en un modelo de infarto cerebrovascular focal neonatal en rata, los resultados mostraron que el tratamiento con WIN 55,212-2 reduce el daño debido a su efecto antiinflamatorio sobre la microglía, de igual forma Huizenga y Forcelli<sup>19</sup> reportaron que el WIN 55,212-2 ejerce efecto neuroprotector, disminuyendo la muerte celular inducida por dimetilsulfóxido (DMSO)

en ratas en desarrollo. Finalmente, en este estudio observamos una mayor recuperación funcional en los animales tratados con WIN 55,212-2 administrado en dosis altas al ser comparados con el grupo no tratado. Es probable que el efecto antioxidante y antiapoptótico observado en este estudio sean mecanismos claves neuroprotectores que inciden en una mejoría funcional, este efecto sobre la recuperación funcional es acorde con lo reportado por Su y su equipo<sup>9</sup> después de una lesión, en este estudio demostraron que WIN 55,212-2 mejoró la función motora de los animales dependiente de la activación del receptor CB2, ya que al bloquear este receptor por el AM630 (un antagonista de CB2) no se observa recuperación funcional, mientras que cuando se bloquea el receptor CB1 por AM251 (un antagonista de CB1) se presenta mejoría motora, es importante destacar que, en este estudio la administración del WIN 55,212-2 (1 mg/kg) inició inmediatamente después del daño con un esquema de dosis repetidas a ocho y 24 horas, esto le confiere limitaciones en el uso durante la práctica médica por la imposibilidad de iniciar el tratamiento de forma inmediata después de la lesión. En nuestro estudio, el esquema de tratamiento inició tres horas después del daño con dosis de 3 mg/kg y se observó que a pesar de no ser administrado de manera inmediata el tratamiento tiene un beneficio terapéutico al incrementar el desempeño funcional motor en los animales, con base en estos hallazgos el WIN 55,212-2 pudiera ser considerado como una terapia traslacional para la LTME.

## CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos de este proyecto podemos concluir que el WIN 55,212-2 administrado en dosis de 3 mg/kg iniciando el tratamiento tres horas después de una LTME disminuye los niveles de LP, la actividad de caspasa-8 e incrementa el desempeño funcional motor de los animales. Tomando en cuenta que este efecto se obtiene aun cuando el tratamiento inicia tres horas después del daño, el WIN 55,212-2 puede ser tomado en consideración en la práctica clínica después de una LTME; sin embargo, se requiere de más estudios para demostrar su seguridad y beneficio terapéutico.

## Referencias

1. Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic spinal cord injury: an overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms. *Front Neurol*. 2019; 10: 282.
2. Bennett J, Das JM, Emmady PD. Spinal cord injuries. 2020. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
3. More SV, Choi DK. Promising cannabinoid-based therapies for Parkinson's disease: motor symptoms to neuroprotection. *Mol Neurodegener*. 2015; 10: 17.
4. Di Maio R, Colangeli R, Di Giovanni G. WIN 55,212-2 reverted pilocarpine-induced status epilepticus early Changes of the Interaction among 5-HT<sub>2C</sub>/NMDA/CB1 receptors in the rat hippocampus. *ACS Chem Neurosci*. 2019; 10 (7): 3296-3306.
5. Sun J, Fang YQ, Ren H, Chen T, Guo JJ, Yan J, et al. WIN55,212-2 protects oligodendrocyte precursor cells in stroke penumbra following permanent focal cerebral ischemia in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2013; 34 (1): 119-128.
6. Su B, Dong H, Ma R, Zhang X, Ding Q, Xiong L. Cannabinoid 1 receptor mediation of spinal cord ischemic tolerance induced by limb remote ischemia preconditioning in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009; 138 (6): 1409-1416.
7. Zhang M, Martin BR, Adler MW, Razdan RK, Jallo JI, Tuma RF. Cannabinoid CB (2) receptor activation decreases cerebral infarction in a mouse focal ischemia/reperfusion model. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007; 27 (7): 1387-1396.
8. Elmazoglu Z, Rangel-López E, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Túnez I, Aschner M, et al. Cannabinoid-profiled agents improve cell survival via reduction of oxidative stress and inflammation, and Nrf2 activation in a toxic model combining hyperglycemia+Aβ<sub>1-42</sub> peptide in rat hippocampal neurons. *Neurochem Int*. 2020; 140: 104817.
9. Su BX, Chen X, Huo J, Guo SY, Ma R, Liu YW. The synthetic cannabinoid WIN55212-2 ameliorates traumatic spinal cord injury via inhibition of GAPDH/Siah1 in a CB2-receptor dependent manner. *Brain Res*. 2017; 1671: 85-92.
10. Page ME, Oropeza VC, Sparks SE, Qian Y, Menko AS, Van Bockstaele EJ. Repeated cannabinoid administration increases indices of noradrenergic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007; 86 (1): 162-168.
11. Diaz-Ruiz A, Rios C, Duarte I, Correa D, Guizar-Sahagun G, Grijalva I et al. Cyclosporin-A inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett*. 1999; 266 (1): 61-64.
12. Triggs WJ, Willmore LJ. *In vivo* lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe<sup>2+</sup> injection. *J Neurochem*. 1984; 42: 976-980.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-275.
14. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol*. 1996; 139 (2): 244-256.

15. Rangel-López E, Colín-González AL, Paz-Loyola AL, Pinzón E, Torres I, Serratos IN, et al. Cannabinoid receptor agonists reduce the short-term mitochondrial dysfunction and oxidative stress linked to excitotoxicity in the rat brain. *Neuroscience*. 2015; 285: 97-106.
16. Goldshmit Y, Banyas E, Bens N, Yakovchuk A, Ruban A. Blood glutamate scavengers and exercises as an effective neuroprotective treatment in mice with spinal cord injury. *J Neurosurg Spine*. 2020; 3: 1-13.
17. Ríos C, Orozco-Suarez S, Salgado-Ceballos H, Mendez-Armenta M, Nava-Ruiz C, Santander I, et al. Anti-apoptotic effects of dapsone after spinal cord injury in rats. *Neurochem Res*. 2015; 40 (6): 1243-1251.
18. Fernández-López D, Faustino J, Derugin N, Wendland M, Lizasoain I, Moro MA, et al. Reduced infarct size and accumulation of microglia in rats treated with WIN 55,212-2 after neonatal stroke. *Neuroscience*. 2012; 207: 307-315.
19. Huizenga MN, Forcelli PA. Neuroprotective action of the CB1/2 receptor agonist, WIN 55,212-2, against DMSO but not phenobarbital-induced neurotoxicity in immature rats. *Neurotox Res*. 2019; 35 (1): 173-182.