

# Efecto protector del dimetil sulfóxido sobre un modelo experimental de lesión medular por reperfusión

*Nilüfer Nermin Turan<sup>1</sup>, Fatma Akar<sup>1</sup>, Baran Budak<sup>2</sup>, Mustafa Seren<sup>2</sup>, A. İhsan Parlar<sup>2</sup>, Selçuk Sürücü<sup>3</sup> y A. Tulga Ulus<sup>1</sup>, Ankara, Turquía*

El objetivo del presente estudio experimental fue investigar si el dimetilsulfóxido (DMSO) produce efectos protectores sobre la lesión de isquemia-reperfusión (I/R) de la médula espinal. Se incluyeron en el estudio conejos de Nueva Zelanda. Además del grupo de control, el grupo de estudio recibió 0,1 ml/kg de DMSO antes de la isquemia. Se obtuvieron muestras de sangre para determinar los niveles de nitritos-nitratos durante el procedimiento quirúrgico. Tras la evaluación neurológica a las 24 h de la reperfusión, se extirparon las médulas espinales lumbares para su evaluación con microscopio electrónico y determinaciones de malondialdeído y mieloperoxidasa. La puntuación media de Tarlov del grupo que recibió DMSO fue mayor que la del grupo control. Se efectuó un examen con microscopio electrónico de las muestras de tejido a las 24 h de la reperfusión. El grupo DMSO se caracterizó por una mejor preservación en la puntuación de microscopía electrónica comparado con el grupo de control. Los niveles de malondialdeído y mieloperoxidasa disminuyeron en el grupo DMSO comparado con el de control. A los 5 y 30 min de la reperfusión, los niveles de nitritos-nitratos también fueron más bajos en el grupo DMSO comparado con el control. El presente estudio demuestra un efecto neuroprotector del DMSO sobre los análisis neurológicos, bioquímicos e histopatológicos durante los períodos de lesión I/R de la médula espinal en conejos. Aunque se observó una diferencia entre ambos grupos en todos los parámetros determinados en el estudio, ésta no fue estadísticamente significativa. El DMSO merece una investigación adicional relacionada con la isquemia y reperfusión de la médula espinal. También debemos considerar su efecto cuando lo usamos como disolvente o vehículo en los modelos experimentales de isquemia-reperfusión.

## INTRODUCCIÓN

Los radicales libres del oxígeno (ROL) se liberan después de la lesión de isquemia-reperfusión (I/R) e inducen la muerte celular por sus mecanismos lesivos. Los ROL estimulan la peroxidación lipídica y, por tanto, lesionan las membranas celulares y

deterioran las funciones celulares. El óxido nítrico (NO) se sintetiza tanto en las células endoteliales como en las células musculares lisas vasculares por oxidación enzimática de la L-arginina por la óxido nítrico sintasa (NOS). El NO difunde a través de las membranas y activa la guanililciclase, que aumenta el guanosín monofosfato cíclico (c-GMP). La activación resultante de la proteincinasa dependiente de c-GMP da lugar a la relajación y disminución del tono muscular liso<sup>1,2</sup>. La interrupción de esta vía por un desequilibrio de las especies reactivas del oxígeno da lugar a cambios tanto del tono vascular como de la señalización iniciada por los radicales libres recién formados. Se ha descrito que las elevadas concentraciones de peroxinitrito, formado por una reacción entre los radicales superóxido y el NO, producen una disfunción vascular y endotelial, peroxidación

DOI of original article: 10.1016/j.avsg.2007.07.023.

<sup>1</sup>Pharmacology Department, University of Gazi, Ankara, Turquía.

<sup>2</sup>Cardiovascular Surgery Department, Türkiye Yüksek İhtisas Hospital, Ankara, Turquía.

<sup>3</sup>Anatomy Department, University of Hacettepe, Ankara, Turquía.

Correspondencia: Nilüfer Nermin Turan, Department of Pharmacology, Pharmacy Faculty, University of Gazi, 06330, Etiler, Ankara, Turquía. Correo electrónico: niluferturan@gazi.edu.tr

*Ann Vasc Surg* 2008; 22: 98-106

DOI: 10.1016/j.avsp.2008.04.005

© *Annals of Vascular Surgery* Inc.

Publicado en la red: 20 de diciembre de 2007

lipídica y una lesión del ADN<sup>3</sup>. Los niveles plasmáticos de 3-nitrotirosina, como marcador de la formación endógena de peroxinitrito<sup>4</sup>, no son detectables en voluntarios sanos; pero en pacientes renales con shock séptico se han detectado niveles elevados<sup>5-7</sup> (de unos 120  $\mu$ M).

Los órganos poseen diversos mecanismos endógenos de defensa antioxidante que disminuyen la generación de ROL, como la superóxido dismutasa (SOD), el glutatión reducido (GSH) y la catalasa. Además, diferentes agentes endógenos como el alfa-tocoferol disminuyen la peroxidación lipídica. La generación de ROL provoca la liberación de metabolitos del ácido araquidónico, factor activador plaquetario, leucocitos polimorfonucleares activados y xantina oxidasa, que son tóxicos para los órganos. Se han efectuado diversos estudios experimentales con la finalidad de prevenir la liberación de estos mediadores<sup>8,9</sup>. Por esta razón, se han usado diversos *scavengers* de radicales para prevenir la lesión y el salvamento de diversos órganos frente a la I/R, como el alopurinol, SOD, dimetilsulfóxido (DMSO), catalasa, etcétera<sup>10,11</sup>.

La eficacia de los agentes farmacológicos utilizados en la actualidad para prevenir la lesión de la médula espinal, durante la cirugía de la aorta toracoabdominal es limitada, y su beneficio controvertido a raíz de los resultados de los estudios clínicos publicados<sup>12</sup>. A pesar de las diversas estrategias farmacológicas, la paraplejía no se ha eliminado por completo<sup>13,14</sup>. El DMSO ( $[\text{CH}_3]_2\text{SO}$ ) es una molécula anfipática con un dominio sumamente polar y dos grupos apolares que la hacen soluble en medios tanto acuosos como orgánicos. Un disolvente de uso generalizado para los preparados farmacéuticos hidrofóbicos se reconoce como un *scavenger* relativamente eficaz de los radicales hidroxilo. El objetivo del presente estudio fue investigar los efectos del DMSO, un *scavenger* no enzimático de los ROL, en la lesión por isquemia-reperfusión de la médula espinal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio 12 conejos de Nueva Zelanda. El peso medio de los animales fue de  $3,5 \pm 0,5$  kg. En el primer grupo (control), los animales no recibieron DMSO antes del período de isquemia, mientras que el segundo (grupo de estudio) recibió 0,1 ml/kg de DMSO (1 ml/1 g; Carlo Erba, Italia). Los animales del grupo de control no recibieron ninguna medicación. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los *principios para los cuidados de animales de laboratorio* y la

*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (publicación NYH 80-23 revisada en 1985), y se obtuvo la aprobación del comité ético.

Los animales recibieron ketamina (50 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) por vía intravenosa para la inducción de la anestesia y se les permitió la respiración espontánea sin ventilación mecánica. Se administraron dosis intravenosas adicionales de ketamina según las necesidades durante todo el experimento. No se empleó hipotermia. Se insertó un catéter en la vena marginal de la oreja para la administración de fármacos intravenosos y otro en la arteria central de la oreja para monitorizar la presión arterial y obtener muestras sanguíneas.

Se realizó una laparotomía media de unos 5 cm de longitud y se examinó la aorta abdominal. Después de controlar la aorta abdominal con grapas, se clampó justo por debajo del origen de la arteria renal izquierda. Antes del clampaje, se administró heparina intravenosa en dosis de 50 UI/kg a cada animal. La aorta se clampó durante 30 min, tras lo cual, los animales fueron reperfundidos mediante desclampaje durante otros 60 min. Después de completar el procedimiento, se retiraron todos los catéteres y se cerraron los abordajes con suturas. En los 5 primeros minutos de isquemia, se perfundió el preparado farmacológico, recibiendo todos los grupos una cantidad idéntica de líquidos durante el estudio.

Los modelos experimentales de isquemia de la médula espinal se han desarrollado en primates, perro, cerdo, conejo y rata con una reproducibilidad variable; pero no se ha usado extensamente en ratón. Este modelo de isquemia medular se usa con frecuencia, en particular para simularlas complicaciones después de la cirugía de la aorta toracoabdominal en humanos<sup>14-18</sup>.

## Evaluación neurológica

El estado neurológico de los animales se puntuó mediante la evaluación de la función neurológica de las patas traseras 24 h después del procedimiento, utilizando una modificación del sistema de medición de Tarlov<sup>19</sup>. A cada animal se le asignó una puntuación de 0 a 5 del modo siguiente: 0, ausencia de movimiento voluntario de las patas traseras; 1, movimiento perceptible de las articulaciones; 2, movimiento activo pero incapaz de sentarse sin ayuda; 3, capaz de sentarse pero incapaz de saltar; 4, saltos débiles; 5, restablecimiento completo de la función de las patas traseras. Tras la evaluación del estado neurológico al término de las 24 h, se administró de nuevo anestesia y se obtuvieron biopsias en

sacabocados a partir del segmento de la médula espinal por debajo del nivel de clampaje.

### Estudio con microscópico electrónico

Las muestras de tejido se fijaron en glutaraldehído al 2,5% durante 24 h, tras lo cual se sometieron a fijación adicional con OsO<sub>4</sub> durante una hora. Después de una deshidratación con concentraciones crecientes de alcohol, los tejidos se expusieron a propileno y se sumergieron en araldita CY 212 para obtener cortes muy finos de 60-90 nm de espesor. Los cortes se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo examinándose con microscopio electrónico (JEOL JEM 1200 EX Electron Microscope; JEOL, Peabody MA). Cada muestra se puntuó de acuerdo con los criterios mostrados en la tabla I.

### Obtención de los datos

Se obtuvieron muestras de sangre para determinar los niveles de nitritos-nitratos al término del período isquémico a los 5 y 30 min de la reperfusión. Después de la evaluación neurológica a las 24 h de la reperfusión, se extirparon las médulas espinales lumbares para el examen con microscopio electrónico y las determinaciones de malondialdehído (MDA) y mieloperoxidasa (MPO).

### Análisis de MDA en los tejidos

El MDA es un índice de la peroxidación lipídica y de la generación de radicales libres. La peroxidación lipídica en las muestras de médula espinal se determinó como concentración de MDA. Los niveles de MDA en tejidos se determinaron mediante un método basado en la reacción con ácido tiobarbitúrico (ATB). Brevemente,, las muestras se mezclaron con 2 volúmenes de solución salina fría que contenía un 0,001% de hidroxitolueno butilado (BHT, 200 µl de una solución al 0,01% de BHT en metanol) y un 0,07% de sulfato de dodecilo sódico (SDS, 20 µl de SDS al 7%). Acto seguido, se añadió 1 ml de las muestras a 500 µl de 0,01 NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 500 µl de reactivo ATB (0,67% de ATB en un 50% de ácido acético) para precipitar las proteínas. Las muestras se calentaron en agua hirviendo durante 60 min. Después de su enfriamiento, se añadió un volumen igual (2 ml) de n-butanol a cada tubo de prueba y se mezcló. La muestra se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. La absorbancia de la capa orgánica en un ml de células se leyó a 535 nm (Versamax Microplate Reader; Molecular Devices, Palo Alto,

**Tabla I.** Criterios de puntuación microscópica electrónica de las muestras

Edema intracelular	
Ausente	0
+	1
++	2
Degeneración axónica	
Capas de mielina normales	0
Desdoblamiento de las capas de mielina	1
Fragmentación de las capas de mielina	2
Aspecto en panal	3
Degeneración axónica-mielina	
No	0
Sí	1
Lesión mitocondrial	
Normal	0
Lesión de carácter leve	1
Lesión de carácter grave	2

CA). La absorbancia fue lineal en 200 mg de tejido. La concentración de MDA en las muestras se calculó mediante una curva de calibración estándar de 1,1,3,3-tetraetoxipropano preparado de la misma forma. Cada determinación se efectuó por duplicado. Las concentraciones de MDA se expresaron como nmoles por gramo de tejido de peso húmedo<sup>20</sup>.

### Determinaciones de nitritos-nitratos

El NO es oxidado rápidamente a un producto estable, nitritos y/o nitratos, por el oxígeno. La determinación de la concentración de nitritos/nitratos o la concentración total de nitratos y nitritos (NOx) se utiliza habitualmente como índice de la producción de NO. Las concentraciones plasmáticas de nitritos-nitratos se analizaron con un equipo de análisis NO disponible comercialmente (Assay Designs, Ann Arbor, MI). El equipo permite la conversión enzimática de nitratos en nitritos por la enzima nitrato-reductasa, seguido de la detección colorimétrica de nitritos como producto azoico teñido en la reacción de Griess. Investigamos la producción de NOx total; los nitratos fueron reducidos a nitritos por el dinucleótido adenina nicotinamida reducido, en presencia de nitrato reductasa, leyéndose la densidad óptica a 540 nm (Molecular Devices Versamax Microplate Reader).

### Determinaciones de MPO

La MPO, una proteína hem y un catalito de la oxidación de las (lipo)proteínas, está presente en las células mononucleares. La capacidad de MPO para generar ácido hipocloroso/hipoclorito (HOCl/

OCl<sup>-</sup>) a partir del peróxido de hidrógeno en presencia de iones cloro es una actividad exclusiva y definitoria de esta enzima. El sistema MPO-peróxido de hidrógeno-cloro da lugar a una diversidad de aductos de proteínas y lípidos clorados, que, a su vez, pueden causar disfunción de las células<sup>21</sup>. En el presente estudio, la isquemia seguida de reperfusión de la médula espinal dio lugar a pruebas locales de lesión. Los productos de oxidación generados por MPO aumentan, con efectos paralelos cuando la protección tisular se relaciona con la reducción del contenido de MPO. Por lo tanto, los niveles sanguíneos y leucocitarios elevados de MPO demuestran una lesión isquémica porque el ácido hipocloroso reacciona fácilmente con los aminoácidos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, bases nucleicas y antioxidantes. Los aminoácidos que contienen azufre (cisteína, metionina y cistina) y las aminas de los aminoácidos, bases nucleicas, glúcidos y lípidos son los principales objetivos de los ácidos hipoclorosos<sup>21</sup>.

En el presente estudio, la actividad de la MPO específica de neutrófilo se determinó mediante ligeras modificaciones<sup>22</sup>. Se homogeneizaron segmentos de la médula espinal con 50 mmol/l del amortiguador fosfato potásico (pH 6) que contenía un 0,05% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAP) en hielo, y los homogeneizados se centrifugaron a 10.000 × g durante 20 min. El HTAP es un detergente que libera MPO de los gránulos de los neutrófilos. La actividad MPO en el sobrenadante se determinó en 0,6 ml de 0,1 M de amortiguador fosfato (pH 6,0) que contenía dihidrocloruro de o-dianesidina (0,167 mg/ml) y peróxido de hidrógeno (0,0005%). Una unidad de actividad MPO se definió utilizando la MPO como estándar. La absorbancia a 460 nm se monitorizó con un espectrofotómetro y se calculó utilizando una curva estándar preparada para MPO purificada.

#### **Determinación de ONOO<sup>-</sup>: un marcador de la nitrotirosina**

Se dispone de pruebas de que el NO y los radicales superóxido pueden combinarse rápidamente formando ONOO<sup>-</sup>, que es un oxidante potente y puede ejercer muchos efectos citotóxicos a concentraciones elevadas<sup>23,24</sup>. El 3-NT es un producto estable que puede evaluarse directamente mediante diversos métodos, incluido un análisis espectrofotométrico, en función de los límites de detección requeridos, la disponibilidad de equipo y la experiencia del operador. Para detectar 3-NT en los tejidos se ha utilizado ampliamente un análisis de enzimo-inmunsorreactancia (ELISA) o

inmunohistoquímica<sup>25</sup>. En el presente estudio, determinamos el contenido de nitrotirosina libre mediante ELISA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) en suero como marcador de la formación de ONOO<sup>-</sup>. El ONOO<sup>-</sup> favorece la nitración de los compuestos fenólicos como la tirosina, cuya nitración da lugar a la formación de un producto estable, la nitrotirosina. En pocas palabras, se añadieron 220 µl de muestras de suero a 4 × volumen de etanol a 4°C, se mezclaron bien y se centrifugaron a 3.000 × g durante 10 min. El sobrenadante se evaporó con nitrógeno y se disolvió de nuevo en 105 µl de agua ultrapura. Las muestras se incubaron con el marcador etilcolinesterasa de nitrotirosina en micropocillos prerrecubiertos (inmunoglobulina G anticonejo de ratón), seguido por el desarrollo con reactivo de Ellman<sup>26</sup>. La concentración sérica de nitrotirosina se expresa como nanomoles por litro.

#### **Análisis estadístico**

Todos los valores se presentan como la media ± error estándar de la media (EEM). Las determinaciones se analizaron para la comparación mediante la prueba de la U de Mann Whitney. La diferencia entre los grupos en términos de puntuaciones de Tarlov se determinó mediante un análisis estadístico no paramétrico usando la prueba de Kruskal-Wallis. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

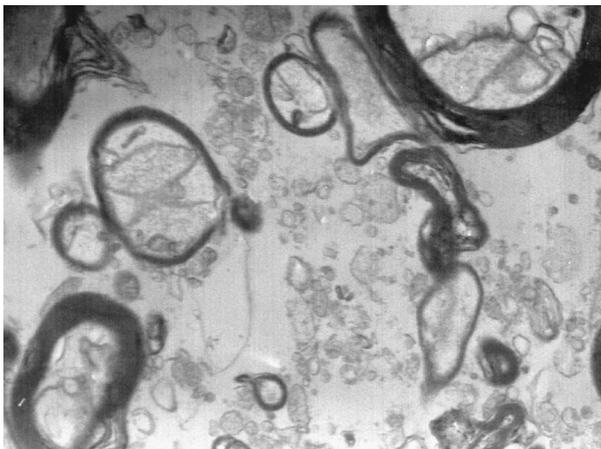
La puntuación media de Tarlov del grupo DMSO (1,3) fue mayor que la del grupo de control (0,7) ( $p > 0,05$ ). Aunque la diferencia entre grupos no fue significativa, en el grupo DMSO los valores fueron mejores que en el grupo de control.

El examen con microscopio electrónico se llevó a cabo con las muestras de tejido a las 24 h de la reperfusión. En el grupo de control, en la sustancia blanca se observó edema axoplásmico; una degeneración completa de la mayor parte de axones, identificándose lesión, inflamación y vacuolización mitocondrial importante (fig. 1). En el grupo DMSO se observó edema leve de los axones de la sustancia blanca, degeneración parcial de las capas de mielina y lesión mitocondrial leve (fig. 2). La puntuación mediante microscopio electrónico fue de  $7,6 \pm 0,9$  para el grupo de control y de  $5,5 \pm 3,0$  para el grupo DMSO ( $p > 0,05$ ).

En el grupo DMSO comparado con el grupo de control se observó una disminución de los niveles de MDA y MPO, pero la de esta última no alcanzó



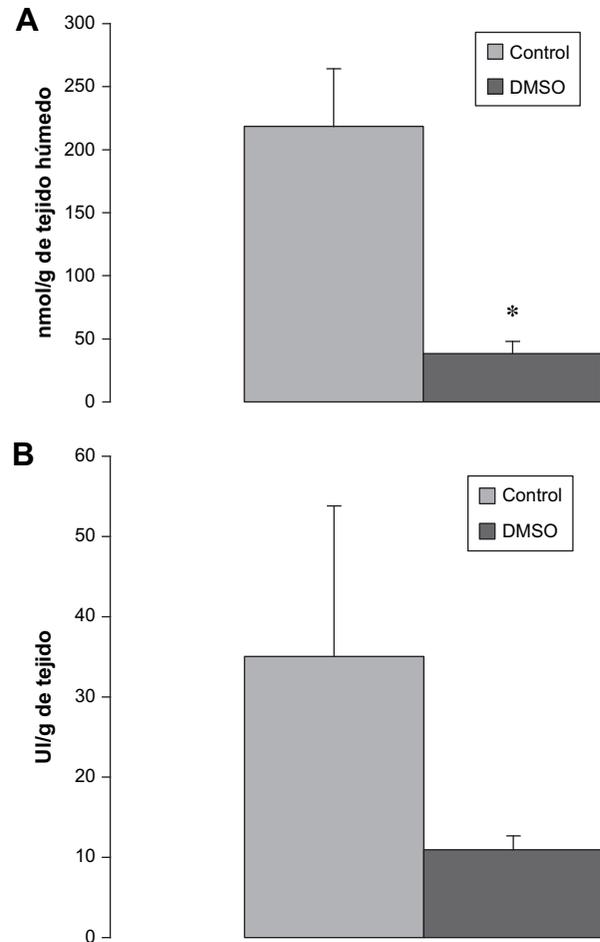
**Fig. 1.** Aspecto con microscopio electrónico de la médula espinal del grupo de control mostrando en la mayor parte de axones una degeneración de la vaina de mielina y edema mitocondrial grave. A: axón; flechas blancas, mitocondrias; M: mielina.



**Fig. 2.** Aspecto con microscopio electrónico de la médula espinal del grupo DMSO. La ultraestructura axonal de la sustancia blanca es casi normal, con un edema leve, vaina de mielina normal y estructura intacta de las mitocondrias. A: axón; flechas blancas, mitocondrias; M: mielina.

significación estadística ( $p > 0,05$ ). Los valores para el grupo DMSO y el de control fueron de  $38,2 \pm 9,6$  y  $219 \pm 45$  nmol/g de tejido húmedo para el análisis de MDA ( $p > 0,05$ ) y de  $10,9 \pm 5,3$  y  $35,1 \pm 10,8$  U/g de tejido para el análisis de MPO ( $p > 0,05$ ) (figs. 3A y 3B).

A los 5 y 30 min de la reperusión, los niveles de nitritos-nitratos fueron más bajos en el grupo DMSO comparado con el de control ( $p > 0,05$ ) (fig. 4). Aunque en el grupo DMSO se identificaron valores más bajos durante el período de reperusión, esta diferencia no alcanzó



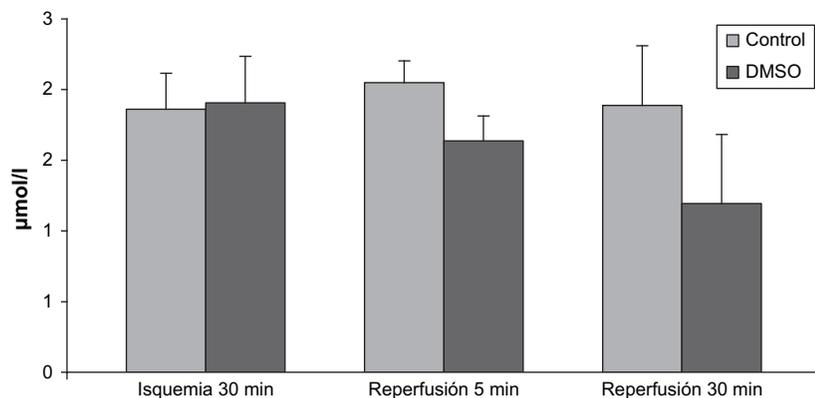
**Fig. 3.** Niveles de MDA (A) y MPO (B) de los segmentos de la médula espinal del grupo de control y el grupo DMSO tras una lesión isquémica ( $p > 0,05$ ). Los valores se expresan como media  $\pm$  EEM. DMSO: dimetilsulfóxido.

significación estadística. Los niveles de nitritos-nitratos fueron de  $1,2 \pm 0,5$  y de  $1,9 \pm 0,8$   $\mu\text{mol/l}$  en el grupo DMSO y control, respectivamente.

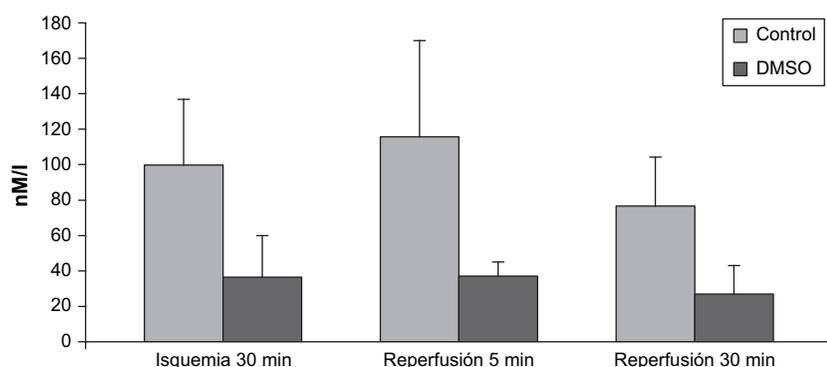
Al igual que los otros parámetros, para los niveles de nitrotirosina también se observó el mismo perfil y, durante la isquemia y reperusión, se observaron valores más bajos en el grupo DMSO comparado con el grupo de control. A los 30 min de la reperusión, los valores de nitrotirosina fueron de  $27,0 \pm 16,0$  y  $76,7 \pm 27,7$  nmol/g en el grupo DMSO y el de control, respectivamente ( $p > 0,05$ ) (fig. 5).

## DISCUSIÓN

En la presente investigación hemos demostrado que el pretratamiento con DMSO redujo marcadamente



**Fig. 4.** Efectos del DMSO sobre los niveles de nitritos/nitratos en segmentos de la médula espinal después de la lesión de isquemia/reperfusion ( $p > 0,05$ ). Los valores se expresan como media  $\pm$  EEM. DMSO: dimetilsulfóxido.



**Fig. 5.** Efectos del DMSO comparado con el grupo de control sobre los niveles de 3-NT en segmentos de la médula espinal después de la lesión de isquemia/reperfusion ( $p > 0,05$ ). Los valores se expresan como media  $\pm$  EEM. DMSO: dimetilsulfóxido.

el MDA, un marcador de la peroxidación lipídica. Las puntuaciones de Tarlov aumentaron y los niveles de MPO, nitritos-nitratos, y nitrotirosina sérica también disminuyeron en el grupo DMSO, aunque no de manera significativa. Por primera vez, los resultados del presente estudio proporcionan pruebas en el modelo de lesión de médula espinal de conejo de que el DMSO induce una protección farmacológica, lo que limita los biomarcadores de isquemia.

Después de una lesión traumática de médula espinal, se producen una serie de acontecimientos fisiopatológicos en el tejido lesionado que dan lugar a la destrucción del tejido y paraplejía. Estos acontecimientos incluyen necrosis hemorrágica, isquemia, edema, inflamación, pérdida de calcio del espacio extracelular, y pérdida de potasio del espacio intracelular. Además, se produce una peroxidación lipídica e hidrólisis de las membranas celulares iniciada por el traumatismo. Tanto la peroxidación lipídica como la hidrólisis lesionan directamente las células<sup>27</sup>.

La protección de la médula espinal frente a una agresión isquémica es un problema importante en el tratamiento quirúrgico de los aneurismas de la aorta toracoabdominal. La lesión I/E es una serie

compleja de acontecimientos con consecuencias patológicas lesivas. Participan numerosos factores, incluida la liberación de radicales libres del oxígeno durante la reperfusion, la acumulación lesiva de calcio en el tejido isquémico y la infiltración neutrófila en los vasos reperfundidos. Probablemente los radicales libres del oxígeno sean los agentes más responsables en este ámbito<sup>28-30</sup>. La generación de ROL inicia reacciones en cadena, como la peroxidación lipídica y de ácidos nucleicos y la alteración de la estructura y función de cualquier componente celular y no celular. Estas reacciones provocan el deterioro de la función celular que da lugar a una lesión tisular<sup>31</sup>.

Los ROL se generan a niveles acelerados en el tejido postisquémico. Los múltiples tipos de células y diferentes enzimas contribuyen al aumento de producción de especies reactivas del oxígeno y al estrés oxidativo asociado con la I/R. Para prevenir o disminuir en parte la lesión, como protectores bioquímicos se han usado numerosas técnicas quirúrgicas o agentes bioquímicos (alopurinol, SOD, DMSO, catalasa, etc.) para el salvamento de los órganos<sup>10,11,32</sup>. Por esta razón, la eliminación de los radicales libres habría contribuido a la capacidad documentada de estos agentes para

conferir protección frente a las agresiones hipóxicas o isquémicas de diversos tejidos<sup>33</sup>. Un disolvente de uso frecuente en los preparados farmacéuticos hidrofóbicos, el DMSO se reconoce como un *scavenger* relativamente eficaz de los radicales hidroxilo. El DMSO puede modificar los resultados de los estudios si se usa como excipiente o disolvente en la formulación de los fármacos protectores. El objetivo del presente estudio consistió en investigar los efectos del DMSO como *scavenger* no enzimático de los ROL, en la lesión I/R de la médula espinal.

Se ha demostrado que el DMSO previene el aumento de la permeabilidad vascular y mejora la función celular captando radicales hidroxilo, uno de los productos más tóxicos de la formación de radicales superóxido<sup>11,34</sup>. Puesto que el DMSO atraviesa fácilmente la mayor parte de membranas titulares y aumenta la penetración de otras moléculas, se utilizaba como agente tópico o vehículo de los preparados farmacéuticos<sup>35</sup>. En este estudio, obtuvimos resultados similares; el marcador de la peroxidación lipídica MDA disminuyó significativamente y los niveles de MPO, nitritos-nitratos y nitrotirosina descendieron en el grupo DMSO comparado con el control. Se ha documentado que el DMSO aumenta el tiempo de vida de los hepatocitos humanos, probablemente debido a un aumento de la concentración intracelular de calcio<sup>36</sup>. También se ha demostrado que aumenta el flujo sanguíneo celular cuando se administra por vía parenteral e induce vasodilatación tras la aplicación tópica de una concentración elevada. El DMSO favorece la formación de ATP a partir del ADP e inhibe la Na,K-ATPasa y la captación de oxígeno<sup>37-39</sup>. Se ha documentado que en sangre entera humana estimulada con lipopolisacárido inhibe de manera dosisdependiente la producción de interleucina 8<sup>40</sup>.

Aunque algunos estudios experimentales sobre DMSO han demostrado un efecto beneficioso, en otros no ha podido identificarse. La toxicidad sistémica aguda es uno de los factores que limita los ensayos experimentales con dosis altas<sup>35</sup>. El efecto antiinflamatorio se ha demostrado en el tratamiento de la cistitis, enfermedad granulomatosa de la piel, artrosis e incluso meningitis<sup>41,42</sup>. También se ha usado tópicamente para reducir la lesión I/R del intestino<sup>43</sup>. En las arteriolas de la corteza cerebral se documentaron, en experimentos efectuados en animales, efectos vasodilatadores a concentraciones altas de DMSO tópico<sup>37</sup>. No obstante, se han publicado algunos estudios que indican que el uso sistémico de DMSO no confiere protección después de la

isquemia cerebral<sup>45</sup>. En su estudio experimental de lesión I/R Korthuis et al<sup>43</sup> demostraron una atenuación en el aumento de la permeabilidad vascular cuando sometieron a los animales a un pretratamiento con DMSO. En un modelo de rata, Stein et al<sup>44</sup>, describieron una mejora de los marcadores bioquímicos e histológicos de lesión hepática con DMSO. En el presente estudio, el resultado neurológico reveló que el grupo DMSO obtuvo mejores puntuaciones que el control, aunque la diferencia no fue significativa. Yüksel et al<sup>30</sup> demostraron que la lesión I/R fue menor en conejos tratados con DMSO que en los no tratados. Park y Tator<sup>34</sup> estudiaron los efectos del DMSO aplicado tópicamente sobre la lesión aguda de la médula espinal y no pudieron demostrar efectos beneficiosos sobre el flujo sanguíneo de la médula espinal o los potenciales evocados.

La concentración apropiada de DMSO en los diferentes estudios publicados varía según la vía de aplicación. Aunque cuando se administra por vía tópica puede usarse una solución al 40-70%, en órganos como el intestino o la vejiga urinaria han de usarse concentraciones del 1-10%. Para la administración intravenosa, en general, se han usado concentraciones del 10-40% que han sido relativamente seguras y bien toleradas cuando se han administrado en bolo en dosis de menos de 1-2 g/kg. En su estudio experimental en ratas, tras la infusión intravenosa de 1,5 g/kg de DMSO, administrado durante un período de 10 a 15 min, Park y Tator<sup>34</sup> observaron una hipotensión arterial aguda que se restableció espontáneamente después de interrumpir la infusión.

No obstante, algunos de los efectos sobre el tejido neural se han inducido mediante concentraciones elevadas, ya que se obtuvo una facilitación sináptica del ganglio simpático mediante una concentración del 3-10% o con un bloqueo de la conducción nerviosa periférica mediante una concentración de, al menos, un 9%. Entre los diversos usos farmacológicos, la mejor acción protectora para la criopreservación de las células se obtuvo con DMSO al 10%<sup>35,46,47</sup>. El DMSO se aplicó por vía intravenosa antes de la isquemia a una dosis de hasta 1 g/kg después de la lesión. Con esta concentración se observaron los menores cambios irreversibles<sup>47</sup>. Sahin et al<sup>9</sup> demostraron un efecto beneficioso del DMSO después de una lesión de isquemia/reperfusión del hígado. Sin embargo, se han descrito efectos adversos nefrotóxicos de este preparado, lo que puede limitar su aplicación clínica<sup>48</sup>. Por esta razón, en el presente estudio seleccionamos una concentración baja de DMSO (0,1 mg/kg).

En conclusión, los resultados de este estudio demuestran que la administración exógena de DMSO (0,1 ml/kg) produce efectos beneficiosos para la lesión de la médula espinal. En todos los parámetros determinados se identificó una diferencia entre el grupo DMSO y el de control, aunque no fue estadísticamente significativa. Se han publicado diversos estudios sobre DMSO que han deparado resultados muy dispares. Estos resultados dependen de la concentración de DMSO, tiempo de aplicación y del tejido diana. Cuando se utilice el DMSO como disolvente o excipiente en los modelos experimentales los investigadores han de considerar sus efectos.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.
- Lounsbury KM, Hu Q, Ziegelstein RC. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1362-1369.
- Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol* 1994;233:229-240.
- van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem* 1997;272(12):7617-7625.
- Fukuyama N, Takebayashi Y, Hida M, Ishida H, Ichimori K, Nakazawa H. Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Radic Biol Med* 1997;22(5):771-774.
- Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991;161:488-503.
- Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81:637-647.
- Van Bebber IP, Boekholz WK, Goris RJ, Schillings PH, Dinges HP, Bahrami S, Redl H, Schlag G. Neutrophil function and lipid peroxidation in a rat model of multiple organ failure. *J Surg Res* 1989;47:471-475.
- Sahin M, Avsar FM, Ozel H, Topaloglu S, Yilmaz B, Pasaoglu H, Avunduk MC, Erikoglu M, Hengirmen S. The effects of dimethyl sulfoxide on liver damage caused by ischemia-reperfusion. *Transplant Proc* 2004;9:2590-2592.
- Kunz R, Schoenberg MH, Büchler M, Jost K, Beger HG. Oxygen radicals in liver ischemia and reperfusion-experimental data. *Klin Wochenschr* 1991;69:1095-1098.
- Brayton CF. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet* 1986;76:61-90.
- Svensson LG, Crawford ES, Hess KR, Coselli JS, Safi HJ. Experience with 1509 patients undergoing thoracoabdominal aortic operations. *J Vasc Surg* 1993;17:357-368.
- de Haan P, Kalkman CJ, Jacobs MJ. Pharmacologic neuroprotection in experimental spinal cord ischemia: a systematic review. *J Neurosurg Anesthesiol* 2001;13:3-12.
- Ulus AT, Saritas A, Yamak B, Surucu S, Tuncer M, Katircioglu SF. ATP-MgCl<sub>2</sub> utilization for spinal cord protection during experimental thoracic aortic occlusion. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1999;4:495-499.
- Fukumoto Y, Mori Y, Takagi H, Iwata H, Umeda Y, Hirose H. Protective effect of prostaglandin E1 against ischemia of spinal cord during aortic cross clamping. *J Vasc Surg* 2003;37:156-160.
- Wakamatsu Y, Shiiya N, Kunihara T, Watanabe S, Yasuda K. The adenosine triphosphate-sensitive potassium channel opener nicorandil protects the ischemic rabbit spinal cord. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;728-733.
- Kaplan S, Ulus AT, Tutun U, Aksoyek A, Ozgencil E, Saritas Z, Apaydin N, Pamuk K, Can Z, Surucu S, Katircioglu SF. Effect of Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> usage on spinal cord ischemia-reperfusion injury: electron microscopic and functional evaluation. *Eur Surg Res* 2004;36(1):20-25.
- Ulus AT, Turan NN, Seren M, Budak B, Tutun U, Yazicioglu H, Surucu S, Akar F, Katircioglu SF. In Which Period of Injury Is Resveratrol Treatment Effective: Ischemia or Reperfusion? *Ann Vasc Surg* 2007;21(3):360-366.
- Katircioglu SF, Ulus AT, Gokce P, Surucu S. Iloprost protects the spinal cord during aortic cross-clamping in a canine model. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2000;1:89-93.
- Usul H, Cakir E, Cobanoglu U, Alver A, Peksoyul B, Topbas M, Baykal S. The Effects of Tyrphostine Ag 556 on Experimental Spinal Cord Ischemia Reperfusion Injury. *Surg Neurol* 2004;61:45-54.
- Malle E, Buch T, Grone HJ. Myeloperoxidase in kidney disease. *Kidney Int* 2003;64(6):1956-1967.
- Taoka Y, Okajima K, Murakami K, Johno M, Naruo M. Role of neutrophil elastase in compression-induced spinal cord injury in rats. *Brain research* 1998;799:264-269.
- Sadeghi-Hashjin G, Folkers G, Henricks PAJ, Muijsers RBR, Nijkamp FP. Peroxynitrite in airway diseases. *Clin Exp Allergy* 1998;28:1464-1473.
- Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase activation by reactive nitrogen species—relevance for the pathogenesis of inflammation. *Nitric Oxide* 2006;14:169-179.
- Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 2001;30(5):463-488.
- Onody A, Csonka C, Giricz Z, Ferdinandy P. Hyperlipidemia induced by a cholesterol-rich leads to enhanced peroxynitrite formation in rat hearts. *Cardiovasc Res* 2003;58:663-670.
- Anderson DK, Demediuk P, Saunders RD, Dugan LL, Means ED, Horrocks LA. Spinal cord injury and protection. *Ann Emerg Med* 1985;14(8):816-821.
- Hamano K, Tsuboi H, Seyama A, Sato K. Shock-reinfusion injury to the central organs and the effect of free radical scavengers in the rat. *Surg Today* 1993;23:891-896.
- Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 1991;213:137-142.
- Yuksel M, Hatipoglu A, Temiz E, Salihoglu YS, Huseyinova G, Berkarda S. The role of hepatobiliary scintigraphy in the evaluation of the protective effects of dimethylsulphoxide in ischaemic/reperfusion injury of liver. *Nucl Med Commun* 2000;8:775-780.
- Koksal C, Bozkurt AK, Cangel U, Ustundag N, Konukoglu D, Musellim B, Sayin AG. Attenuation of ischemia/reperfusion injury by N-acetylcysteine in a rat hind limb model. *J Surg Res* 2003;2:236-239; Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery* 1983;94:415-422.

32. Phillis JW, Estevez AY, O'Regan MH. Protective effects of the free radical scavengers, dimethyl sulfoxide and ethanol in cerebral ischemia in gerbils. *Neurosci Lett* 1998;13:109-111.
33. Carpenter RJ, Angel MF, Morgan RF. Dimethyl sulfoxide increases the survival of primarily ischemic island skin flaps. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;110:228-231.
34. Park YK, Tator CH. Failure of topical DMSO to improve blood flow or evoked potentials in rat spinal cord injury. *J Korean Med Sci* 1998;6:638-644.
35. Loretz LJ, Li AP, Fyle MW, Wilson AGE. Optimization of cryopreservation procedures for rat and human. *Hepatocytes Neobiotica* 1989;19:489-498.
36. Pitts LH, Young AR, McCulloch J, MacKenzie E. Vasomotor effects of dimethyl sulfoxide on cat cerebral arteries in vitro and in vivo. *Stroke* 1986;17:483-487.
37. Beharry S, Bragg PD. Interaction of beef-heart mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase with immobilized ATP in the presence of dimethylsulfoxide. *J Bioenerg Biomembr* 1992;24:507-514.
38. Robinson JD. Specific modifications of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-dependent adenosine triphosphatase by dimethyl sulfoxide. *Ann NY Acad Sci* 1975;243:60-72.
39. DeForge LE, Fantone JC, Kenney JS, Remick DG. Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin 8 production in human whole blood. *J Clin Invest* 1992;5: 2123-2129.
40. German DG, Artermii IA, Bulbuk EA. Treatment of chronic cerebral leptomeningitis (arachnoiditis) *Zh Nevropatol Psikhiatr. Im S S Korsakova* 1987;87:185-187.
41. Jacob SW, Herschler R. Pharmacology of DMSO. *Cryobiology* 1986;23:14-27; (30) Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993;21: 1376-1386.
42. Little JR, Spetzler RF, Roski RA, Selman WR, Zabramski J, Lesser RP. Ineffectiveness of DMSO in treating experimental brain ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 1983;411:269-277.
43. Korthuis RJ, Granger DN, Townsley MI, Taylor AE. The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ Res* 1985;57:599-609.
44. Stein HJ, Oosthuizen MMJ, Hinder RA, Lamprechts H. Oxygen free radicals and glutathione in hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 1991;50:398-402.
45. Matsumoto M, Riker WK, Takashima K, Goss JR, Mela-Riker L. DMSO effects on synaptic facilitation and calcium dependence in bullfrog sympathetic ganglion. *Eur J Pharmacol* 1985;109:213-218.
46. Evans MS, Reid KH, Sharp JB. Dimethylsulfoxide (DMSO) blocks conduction in peripheral nerve C fibers: a possible mechanism of analgesia. *Neurosci Lett* 1993; 150:145-148.
47. Hatipoglu AR, Temiz E, Yüksel M, Hoscokun Z, Coskun I, Huseyinova G. The comparison of electron microscopy and scintigraphy in determining the protective effect of dimethylsulfoxide (DMSO) on ischemia/reperfusion injury through pringle maneuver. *Hepatogastroenterol* 2001;48:799-802.
48. Nishihara G, Sakemi T, Ikeda Y, Baba N, Shimamoto Y. Multiple organ failure associated with dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch in autologous blood stem cell transplantation. *Nephron* 1996;72:356-357.