

ESTUDIO DEL EFECTO DEL DIMETILFUMARATO EN LA NEUTROPENIA Y
NEUROPATÍA PERIFÉRICA INDUCIDAS POR EL DOCETAXEL EN UN MODELO
EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Q. Juan Sebastian Cubides Cely

Trabajo de Grado para Optar al Título de Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas

Director

Mario Felipe Negrette Guzmán, PhD.

Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Medicina UIS

Codirectora

María Carolina Velásquez Martínez, PhD.

Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Medicina UIS

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina – Departamento de Ciencias Básicas

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Bucaramanga

2025

Agradecimiento

Primero que todo gracias a Dios, por su gracia, sabiduría y acompañamiento durante todo el desarrollo de este trabajo.

A mis padres: Hector Manuel Cubides Montaña y María del Carmen Cely Becerra, a mi hermano Oscar Julián Cubides Cely y demás familiares por su apoyo incondicional y respaldo emocional, económico y desinteresado.

Al Dr. Mario Negrette, por su gran dedicación, acompañamiento, entrega, paciencia, bondad, ejemplo, amistad y motivación que inculcó diariamente en mi formación durante mi trabajo como investigador; lo aprendido será parte ahora en adelante en mi vida y profesión.

A la Dra. Patricia Escobar, directora del área de quimioterapia del CINTROP, y mi ex directora en el proyecto de pregrado, que en su momento me propuso el trabajar de la mano con el Dr. Mario en un nuevo proyecto para mi maestría, sin ella probablemente no estaría donde estoy.

A la Dra. María Carolina Velásquez, por su acompañamiento, consejos y guía durante el desarrollo de la maestría.

Al Grupo de Investigación en Farmacología y Metabolismo (FARMET) por permitirme desarrollar nuevas habilidades en sus instalaciones y a nuestros apreciados compañeros del grupo, que de una u otra manera me acompañaron en el proceso de crecimiento: Pablo Prado, Lizeth Vargas, Viviana Pimiento, Alexander David Castro y Pedro Espitia.

A mis compañeras de la maestría: Laura Chaparro, Dayany Arias y Dayana Perdomo, por su acompañamiento, consejo y amistad durante mi formación en la maestría.

A mis amigos asociados al laboratorio 204, especialmente a Brigitte Peña, por su ayuda incondicional, apoyo, consejo y gran amistad brindada durante todo este proceso.

A los grupos de investigación CINTROP y GEMEICA, por su ayuda en el desarrollo del proyecto, tanto con material e instalaciones prestadas, lo cual permitió el desarrollo rápido y efectivo de los diferentes procesos que llevé a cabo.

Al Bioterio de la Universidad Industrial de Santander y especialmente a Jesús M. Rodríguez y a Eduardo Caballero Plata, por su ayuda con la observación y mantenimiento de los animales usados para este proyecto, así como su guía para los diferentes procesos llevados a cabo.

Agradecimientos la Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo. Convocatoria 896-2021 “Fortalecimiento De Capacidades Regionales De Investigación En Salud” y al proyecto de investigación 8757: "Evaluación del efecto protector de inductores del factor de transcripción Nfr2 contra la mielotoxicidad y la neuropatía periférica inducidas por docetaxel en un modelo preclínico animal" por los fondos y sustento para el desarrollo de este proyecto.

Al ICETEX por la ayuda brindada en la convocatoria de Expertos Internacionales de Icetex, mediante la cual pude acceder a recursos para financiar la participación de expertos nacionales e internacionales en eventos y actividades organizadas en Colombia o el exterior, por instituciones de educación superior (IES), con la cual fue posible llevar mis resultados al “X Congreso Internacional De Investigación En Salud Y Envejecimiento & VIII Congreso Internacional De Investigación En Salud” realizado en Murcia-España.

A todos ustedes gracias, espero que continúen en mi vida de ahora en más.

Tabla de Contenido

		Pág.
Introducción		15
1	Objetivos	20
1.1	Objetivo General	20
1.2	Objetivos Específicos.....	20
2	Marco teórico y estado del arte	21
2.1	Quimioterapia	21
2.2	Toxicidad sistémica inducida por quimioterapia	22
2.3	Estrés oxidante y especies reactivas de oxígeno (ERO)	24
2.4	Toxicidad del docetaxel	26
2.5	Antioxidantes	30
2.6	Efectos de antioxidantes sobre la toxicidad de fármacos antineoplásicos	31
2.7	Factor Nrf2.....	32
2.8	Dimetilfumarato	34
3	Metodología	36
3.1	Establecimiento del modelo experimental animal en la inducción conjunta de la neuropatía periférica y neutropenia (Fase 1)	37
3.1.1	Reactivos.....	37
3.1.2	Animales	37
3.1.3	Tratamiento con docetaxel para inducción conjunta de neuropatía periférica y neutropenia <i>in vivo</i>	38
3.1.4	Pruebas comportamentales sensoriales y eutanasia	41

3.1.5	Neutropenia.....	42
3.2	Evaluación del efecto protector del dimetilfumarato (Fase 2).....	42
3.2.1	Tratamiento protector usando dimetilfumarato	42
3.2.2	Evaluación de la neutropenia y química sanguínea	44
	Neutropenia.....	44
	Química sanguínea.....	44
	Creatina quinasa (CK-MB).....	45
	Aspartato aminotransferasa (AST)	45
	Alanina aminotranferasa (ALT).....	46
	Fosfatasa alcalina (ALP).....	46
	Creatinina.....	46
	Urea.....	47
3.3	Evaluación de los mecanismos de protección del dimetilfumarato contra la neuropatía periférica inducida por el docetaxel (Fase 3).....	48
3.3.1.	Evaluación de marcadores de daño y estrés oxidante	48
	Peroxidación lipídica.	49
	Determinación de glutatión total.....	51
	Actividad de enzimas antioxidantes.....	53
	Catalasa.....	53
	Superóxido dismutasa	54
3.4.	Análisis estadístico.....	56
4	Resultados	57
4.1.	Inducción conjunta de neuropatía periférica y neutropenia usando docetaxel	57

4.1.1.	Toxicidad del docetaxel	57
4.1.2.	Neuropatía periférica	61
	Presión en pata	62
	Presión en cola	63
	Placa caliente	65
4.1.3.	Neutropenia	67
4.2.	Tratamiento de protección con dimetilfumarato	69
4.2.1.	Protección del dimetilfumarato frente a la toxicidad inducida por el docetaxel.....	69
4.2.2.	Neutropenia	70
4.2.3.	Química sanguínea.....	73
4.3.	Pruebas nociceptivas.....	74
4.3.1.	Presión en pata.....	75
4.3.2.	Presión en cola	76
4.3.3.	Placa caliente.....	78
4.4.	Determinación de proteínas y marcadores de estrés oxidante.....	79
4.4.1.	Peroxidación lipídica	80
4.4.2.	GSH total	81
4.4.3.	Catalasa	83
4.4.4.	Superóxido dismutasa (SOD)	84
5	Discusión.....	84
6	Conclusiones	93
7	Recomendaciones	95
	Referencias bibliográficas.....	96

Lista de Tablas**Pág.**

Tabla 1. <i>Curva de TMPO para análisis de malondialdehído</i>	49
Tabla 2. <i>Cantidades para preparación de soluciones en la determinación de malondialdehído</i>	50
Tabla 3. <i>Recuento de neutrófilos y hemograma completo en ratas Wistar tratadas con docetaxel y/o dimetilfumarato</i>	72
Tabla 4. <i>Marcadores plasmáticos de toxicidad en ratas Wistar tratadas con docetaxel y/o dimetilfumarato</i>	74
Tabla 5. <i>Concentración de proteínas totales obtenidas por el método de Bradford</i>	79
Tabla 6. <i>Resultados pruebas para marcadores de estrés oxidante en homogenados de nervio ciático de ratas Wistar tratadas con docetaxel y/o dimetilfumarato</i>	80

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Regulación y efectos biológicos de las especies reactivas de oxígeno..	26
Figura 2. Regulación de la vía Nrf2 en células neuronales.	34
Figura 3. Fases metodológicas del proyecto	36
Figura 4. Esquemas de administración de docetaxel evaluados para inducción conjunta de neuropatía periférica y neutropenia..	40
Figura 5. Reacciones involucradas en la determinación de la actividad de la creatina quinasa.. 45	45
Figura 6. Reacciones involucradas en la determinación de la actividad de la AST	45
Figura 7. Reacciones involucradas en la determinación de la actividad de la ALT	46
Figura 8. Reacciones involucradas en la determinación de la actividad de la ALP	46
Figura 9. Reacción involucrada en la determinación de creatinina	47
Figura 10. Reacciones involucradas en la determinación de urea	47
Figura 11. Reacción de obtención de MDA a partir de TMPO	49
Figura 12. Principio químico de la metodología de reciclaje enzimático de GSH a partir de GSSG por glutatión reductasa..	52
Figura 13. Sistema generador de superóxido a partir del sistema xantina-xantina oxidasa para la determinación de formazán a partir de NBT.....	55
Figura 14. Cambio de peso corporal en ratas Wistar a lo largo del tratamiento con cuatro esquemas de administración de docetaxel para la inducción simultánea de neuropatía periférica y neutropenia	58
Figura 15. Comparación de peso final del grupo tratamiento (DT) comparado con el grupo control (CT) al final de cada esquema de tratamiento.	60

Figura 16. Ganancia o pérdida de peso del grupo tratamiento (DT) comparado con el grupo control (CT) al final de cada esquema de tratamiento.....	61
Figura 17. Uso de analgesímetros de presión y placa caliente.	62
Figura 18. Valores del umbral de presión en pata (g) en ratas Wistar tratadas con docetaxel (DT) versus control (CT) para cada uno de los esquemas de administración..	63
Figura 19. Valores del umbral de presión en cola (g) en ratas Wistar tratadas con docetaxel (DT) versus control (CT) para cada uno de los esquemas de administración..	64
Figura 20. Valores de tiempo (s) de latencia en placa caliente ($50^{\circ}\text{C}\pm 0.1$) en ratas Wistar tratadas con docetaxel (DT) versus control (CT) para cada uno de los esquemas de administración..	66
Figura 21. Recuento de neutrófilos en ratas de cuatro esquemas de administración de docetaxel para la inducción simultánea de neuropatía periférica y neutropenia.	68
Figura 22. Cambio de peso corporal en ratas Wistar a lo largo del tratamiento con docetaxel y/o dimetilfumarato.....	70
Figura 23. Conteo de neutrófilos en ratas Wistar tratadas con docetaxel y/o dimetilfumarato... ..	71
Figura 24. Valores de umbral de presión en pata (g) en ratas Wistar tratadas con docetaxel y/o dimetilfumarato.....	76
Figura 25. Valores de umbral presión en cola (g) en ratas Wistar tratadas con docetaxel y/o dimetilfumarato.....	77
Figura 26. Valores de tiempo (s) de latencia en placa caliente ($50^{\circ}\text{C}\pm 0.1$) en ratas Wistar tratadas con docetaxel y/o dimetilfumarato.....	78
Figura 27. Curva de calibración estándar de albumina sérica bovina (ABS) para la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford	79

- Figura 28.** Curva de calibración estándar de TMPO para la determinación de malondialdehído en homogenados de nervio ciático de ratas Wistar tratadas con docetaxel y/o dimetilfumarato 81
- Figura 29.** Curvas de velocidad para los estándares de GSH 82
- Figura 30.** Curva de concentración de estándares de GSH vs pendiente (velocidad k) 83

Siglas y abreviaturas

1M2F: 1-metil-2-fenilindol

ALP: fosfatasa alcalina

ALT: alanina amino transferasa

ASB: Albúmina sérica bovina

AST: aspartato amino transferasa

ANOVA: análisis de varianza

CAT: catalasa

CK-MB: creatina quinasa

CREA: creatinina

CT: grupo control

DF: grupo tratamiento con dimetilfumarato

DT: grupo tratamiento con docetaxel

DT+DF: grupo tratamiento conjunto de docetaxel con dimetilfumarato

EMA: European Medicines Agency (Agencia Europea de Medicamentos)

ERO: especies reactivas de oxígeno

ESMO: European Society for Medical Oncology (Sociedad Europea de Oncología Médica)

FDA: Food and Drug Administration (Administración de Drogas y Alimentos)

GPX: glutatión peroxidasa

GR: glutatión reductasa

GRD: ganglios de la raíz dorsal

GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

GST: glutatión s-transferasa

MDA: malondialdehído

MMF: monometilfumarato

NBT: azul de nitrotratazolio (del inglés nitroblue tetrazolium)

NP: neuropatía periférica

NPIF: neuropatía periférica inducida por fármacos

Nrf2: factor 2 relacionado con el factor eritroide nuclear

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

PRX: peroxiredoxina

SOD: superóxido dismutasa

TMPO: tetrametoxipropano

XOD: xantina oxidasa

Resumen

Título: Estudio del efecto del dimetilfumarato en la neutropenia y neuropatía periférica inducidas por el docetaxel en un modelo experimental *in vivo*.

Introducción: El docetaxel es un taxano usado para tratar diferentes tipos de cáncer. Su efectividad se limita principalmente por la mielotoxicidad y la neuropatía periférica, efectos adversos que a menudo conducen a la interrupción del tratamiento. El dimetilfumarato se propuso como alternativa terapéutica de combinación con el docetaxel dadas sus propiedades antioxidantes y citoprotectoras.

Objetivo: Evaluar el efecto protector del dimetilfumarato contra la neuropatía periférica y la neutropenia inducida por el docetaxel en un modelo experimental *in vivo*.

Metodología: Se evaluaron cuatro esquemas de administración de docetaxel en ratas Wistar para establecer el modelo de daño más confiable. En el esquema 1 se administró una dosis única de 15 mg/kg de docetaxel (10 mg/mL). El esquema 2 consistió de dos dosis de 15 mg/kg de docetaxel separadas por tres semanas. El esquema 3 tuvo 6 dosis de 5 mg/kg de docetaxel administradas semanalmente. Para el esquema 4, se administraron tres dosis de docetaxel de 15 mg/kg, una cada 3 semanas. Cuatro días después de la última dosis en cada esquema, se ejecutaron pruebas sensoriales y se obtuvo sangre para evaluar neutropenia. Tras establecer el modelo de daño, se administró dimetilfumarato oral (100 mg/kg/semana) 4 días previo y el mismo día de cada administración de docetaxel para evaluar su efecto protector.

Resultados: El esquema 3 fue el que mejor representó los dos tipos de daño. El dimetilfumarato atenuó la hiperalgesia inducida por docetaxel en las pruebas de presión en pata ($P < 0.05$) y cola ($P < 0.02$). Se observó una tendencia aparente de atenuación de la neutropenia, pero sin significancia estadística. Se reportaron otros marcadores de toxicidad que llevaron a revisar y discutir sobre otros potenciales efectos del docetaxel. Los marcadores de estrés oxidante en los nervios ciáticos de los animales bajo estudio no mostraron diferencias significativas entre los grupos.

Conclusión: El modelo experimental de daño por docetaxel establecido demostró ser útil y confiable para la evaluación de agentes protectores como el dimetilfumarato. Este atenuó la hiperalgesia inducida por el docetaxel, pero no la neutropenia. Dado que no se evidenció que el estrés oxidante mediara el daño en nervio periférico, se proponen futuros experimentos para la dilucidación de estos mecanismos.

Palabras Clave: docetaxel, neuropatía periférica, mielotoxicidad, neutropenia, dimetilfumarato.

Abstract

Title: Study of the effect of dimethyl fumarate on docetaxel-induced neutropenia and peripheral neuropathy in an *in vivo* experimental model.

Introduction: Docetaxel is a taxane used to treat different types of cancer. Its efficacy is mainly limited by myelotoxicity and peripheral neuropathy, adverse effects that often lead to treatment discontinuation. Dimethyl fumarate has been proposed as a potential combination therapy with docetaxel due to its antioxidant and cytoprotective properties.

Objective: To evaluate the protective effect of dimethyl fumarate against docetaxel-induced peripheral neuropathy and neutropenia in an *in vivo* experimental model.

Methodology: Four docetaxel administration schemes were evaluated in Wistar rats to establish the most reliable damage model. In scheme 1, a single dose of 15 mg/kg docetaxel (10 mg/mL) was administered. Scheme 2 consisted of two doses of 15 mg/kg docetaxel separated by three weeks. Scheme 3 had 6 doses of 5 mg/kg docetaxel administered weekly. For scheme 4, three doses of 15 mg/kg docetaxel were administered, one every 3 weeks. Four days after the last dose in each schedule, sensory testing was performed and blood was obtained to assess neutropenia. After establishing the damage model, oral dimethyl fumarate (100 mg/kg/week) was administered 4 days before and on the same day of each docetaxel administration to assess its protective effect.

Results: Scheme 3 showed the best representation of the two types of damage. Dimethyl fumarate attenuated docetaxel-induced hyperalgesia in paw ($P < 0.05$) and tail ($P < 0.02$) pressure tests. An apparent trend of attenuation of neutropenia was observed, but without statistical significance. Other markers of toxicity were reported leading to review and discussion of other potential effects of docetaxel. Oxidative stress markers in the sciatic nerves of the animals under study showed no significant differences between groups.

Conclusion: The experimental model of docetaxel damage established proved to be useful and reliable for the evaluation of protective agents such as dimethyl fumarate. It attenuated docetaxel-induced hyperalgesia, but not neutropenia. Since oxidative stress was not shown to mediate peripheral nerve damage, future experiments are proposed to elucidate these mechanisms.

Keywords: docetaxel, peripheral neuropathy, myelotoxicity, neutropenia, dimethyl fumarate.

Introducción

El cáncer es una enfermedad o un conjunto de enfermedades desconcertantes y aterradoras, que se pueden originar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando células anormales crecen de forma descontrolada, sobrepasan sus límites habituales e invaden partes adyacentes del cuerpo y/o se propagan a otros órganos (Organización Mundial de la salud, 2025). Siendo de las enfermedades más temidas mundialmente, han afectado a los seres vivos multicelulares durante más de 200 millones de años (Hausman, 2019). El cáncer, considerado como la segunda causa de muerte en el mundo, se caracteriza por la proliferación incontrolada de células anormales y un reconocimiento aberrante del sistema inmunitario. Según un informe de la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es responsable de unos 9,6 millones de muertes en todo el mundo en 2018 (Yin et al., 2021). En Colombia, el cáncer fue la segunda causa de muerte durante el periodo 2007-2013, con aproximadamente 33.538 defunciones anuales, representando el 17.1% de la mortalidad del país. El Ministerio de Salud y Protección Social define al cáncer como una de las enfermedades ruinosas y catastróficas y de los eventos de interés en salud pública directamente relacionados con el alto costo (Dirección de Epidemiología y Demografía, 2021), lo cual justifica el gran interés que ha despertado para la investigación biomédica nacional y de la región.

La quimioterapia antitumoral es un tratamiento farmacológico con sustancias químicas que destruyen las células cancerosas, de crecimiento y multiplicación más rápida que la mayoría de las células del cuerpo. El uso de la quimioterapia ha aumentado desde la década de 1950. Esto se debe en gran medida a la mejora en la supervivencia del cáncer. El tratamiento y la supervivencia del cáncer han sido revolucionados por la quimioterapia, considerándose uno de los tratamientos más eficaces y ampliamente utilizados en la mayoría de los tipos de neoplasias malignas (Patel & Hotaling, 2020) . Uno de los principales mecanismos de acción de los quimioterapéuticos se basa

en su actividad citotóxica causada parcialmente por la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Sin embargo, los tratamientos quimioterapéuticos no atacan específicamente sólo a las células cancerosas, sino también a células normales, lo que provoca efectos secundarios dependientes de la dosis, como fatiga, náuseas, pérdida de cabello y vómitos, entre otros; incluso puede ocurrir la muerte en casos severos. La Administración de Drogas y Alimentos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) de los EE. UU. aprobó un total de 132 medicamentos de quimioterapia contra el cáncer, de los cuales se ha informado que 56 medicamentos causan estrés oxidante (Aslam et al., 2014). De hecho, muchos medicamentos contra el cáncer aprobados por la FDA eliminan eficazmente las células cancerosas al aumentar la producción de ERO (Jiang et al., 2023).

El docetaxel es un taxano semisintético, análogo del paclitaxel, aprobado por la FDA para el cáncer de mama, ovario, pulmón y próstata, entre otros (New et al., 1996; Zehua et al., 2022). Su actividad se basa en la unión específica a las subunidades beta-tubulina de los microtúbulos, inhibiendo la despolimerización de la tubulina y, por tanto, estabilizando los microtúbulos. En consecuencia, el ciclo celular se detiene en mitosis, lo que conduce a la muerte celular (Cortes & Pazdur, 1995; Zajaczkowską et al., 2019). Además, el docetaxel también es capaz de conducir a las células cancerosas a la apoptosis intrínseca mediante la inhibición de la expresión de los genes antiapoptóticos BCL-2 y BCL-X y de detener el crecimiento del cáncer mediante la regulación a la baja de la vía de señalización del receptor de andrógenos (Schweizer & Antonarakis, 2014). La muerte de las células cancerosas depende de la concentración del fármaco y del tiempo de exposición. Sin embargo, el docetaxel puede producir reacciones adversas como neuropatía periférica, neutropenia febril, reacciones a la infusión, fatiga, retención de líquidos, neumonitis y complicaciones gastrointestinales (Ho & Mackey, 2014).

El dimetilfumarato, un éster del ácido fumárico (éster de ácido carboxílico α , β -insaturado), es un fármaco aprobado por la FDA y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, del inglés *European Medicines Agency*), que es eficaz en el tratamiento de la esclerosis múltiple remitente/recurrente y se considera un tipo de antioxidante indirecto, ya que promueve la activación y estabilización del factor nuclear eritroide 2-relacionado con el factor 2 (Nrf2, del inglés Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) (Jiahe et al., 2020; Sangineto et al., 2020) . El dimetilfumarato entra en el organismo por vía oral y se disocia a monometilfumarato en el intestino, donde posteriormente interactúa con las células inmunitarias en la circulación sanguínea y atraviesa la barrera hematoencefálica hasta llegar al sistema nervioso central (Al-Jaderi & Maghazachi, 2016). Existen diferentes trabajos sobre hepatoprotección, neuroprotección y protección antiartrítica utilizando dosis orales diarias de entre 25 y 100 mg/kg de dimetilfumarato durante varias semanas, que muestran un efecto citoprotector mediado por Nrf2 en ratas Wistar (Dwivedi & Jena, 2020).

Aunque la neuropatía periférica y la neutropenia son efectos adversos inducidos por la quimioterapia ampliamente descritos, la reducción de la dosis o la interrupción del tratamiento sigue siendo la alternativa más eficaz para combatir estos efectos. Se requiere más investigación preclínica sobre estrategias para inhibir o atenuar la neuropatía periférica y la neutropenia inducidas por docetaxel sin afectar su eficacia terapéutica, garantizando la calidad de los datos y reduciendo éticamente el número de animales de experimentación. Debido a las características citoprotectoras del dimetilfumarato reportadas previamente en diferentes modelos experimentales, se estableció como objetivo de este trabajo el evaluar el efecto protector del dimetilfumarato contra la neuropatía periférica y la neutropenia inducidas por el docetaxel en ratas Wistar.

La primera fase de este proyecto fue el establecimiento de un modelo de rata para la inducción simultánea de mielotoxicidad y neuropatía periférica por docetaxel, útil para estudiar alternativas terapéuticas protectoras y que permitiera evaluar ambos efectos en el mismo animal. Se probaron cuatro esquemas de administración diferentes basados en información clínica y modelos experimentales. Se realizaron pruebas sensoriales para evaluar la neuropatía periférica y se obtuvo sangre para determinar la neutropenia. Se eligió el esquema que representaba mejor los cambios tanto en los umbrales nociceptivos (neuropatía periférica) como en la neutropenia (mielotoxicidad).

Utilizando el modelo de toxicidad experimental de docetaxel resultante, se implementó la segunda fase de este proyecto utilizando el dimetilfumarato como alternativa protectora contra el daño inducido por docetaxel. Al igual que en la primera fase, se realizaron pruebas sensoriales para analizar los cambios en los umbrales nociceptivos y se obtuvo sangre para conteo celular completo y bioquímica sanguínea. Además, se extrajo nervio ciático para estudio de marcadores de estrés y daño oxidante.

Con los nervios extraídos, se dio paso a la fase 3, utilizando un homogenado del tejido para el estudio de marcadores de estrés oxidante, específicamente la peroxidación lipídica, glutatión total y la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa (SOD). Con parte de la sangre extraída se obtuvo plasma sanguíneo para la determinación de creatinina, urea y las actividades de fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y creatina quinasa (CK-MB) para evaluar toxicidad o disfunción en otros sistemas o tejidos (función renal, hepática o muscular).

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que, a las dosis administradas, el dimetilfumarato es un agente protector potencial contra la neuropatía periférica inducida por

docetaxel. Sin embargo, con el esquema de administración usado no se observó protección del dimetilfumarato contra la neutropenia. Se requieren más estudios con otras dosis o esquemas de administración de dimetilfumarato para determinar si puede ser un potencial agente protector ante ambos efectos adversos.

1 Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar el efecto protector del dimetilfumarato contra la neuropatía periférica y la neutropenia inducida por el docetaxel en un modelo experimental *in vivo*.

1.2 Objetivos Específicos

Establecer un modelo experimental *in vivo* de neuropatía periférica y neutropenia inducidas simultáneamente por docetaxel en ratas Wistar.

Evaluar el efecto protector del dimetilfumarato contra las alteraciones sensoriales y neutropenia inducidas por el docetaxel en ratas Wistar.

Determinar el papel del daño oxidante y el estado redox celular en la neurotoxicidad inducida por el docetaxel y los mecanismos de protección del dimetilfumarato.

2 Marco teórico y estado del arte

Una de las enfermedades más temidas a nivel mundial es el cáncer, debido a su gran incidencia y mortalidad, la cual ha aumentado en las últimas dos décadas, probablemente debido a nuestro estilo de vida, hábitos cambiantes y una mayor esperanza de vida (Roy & Saikia, 2016). El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por presentar un crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo. Se desarrolla cuando el material genético de una célula cambia, provocando que las células crezcan fuera de control, se dividan demasiado rápido y evadan la muerte celular programada. Se puede presentar en casi cualquier órgano o tejido, dando lugar a muchos tipos de cáncer como de pulmón, colon, senos, piel, huesos o el tejido nervioso, entre otros (Sánchez, 2013) .

En Colombia, el cáncer es considerado un problema importante de salud pública. Las zonas de mayor riesgo de incidencia de cáncer en general están concentradas en el Eje Cafetero, Antioquia, Valle del Cauca, Santander y Norte de Santander, Bogotá y Meta (Instituto Nacional de Cancerología, 2022). En 2022, de acuerdo con estimaciones reportadas por la Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), se presentaron 117.620 nuevos casos de cáncer y 56.719 muertes asociadas a cáncer en Colombia, siendo los cánceres de próstata y seno los de mayor incidencia y los de estómago y pulmón los más mortales (Global Cáncer Observatory, 2022).

2.1 Quimioterapia

Existen diversos tratamientos contra el cáncer, entre los que se encuentran la cirugía de extirpación, la quimioterapia, la radioterapia, la inmunoterapia, la terapia hormonal y la terapia fotodinámica, entre otras (Instituto Nacional del Cáncer - NIH, 2022). La quimioterapia es una

estrategia usada para el tratamiento de distintas afecciones. En términos generales, la quimioterapia se refiere al uso de sustancias químicas para inhibir células malignas o agentes infecciosos de una enfermedad, como microorganismos, sin afectar demasiado a las células huésped (Alam et al., 2018). La quimioterapia se usa principalmente para tratar enfermedades sistémicas en lugar de lesiones localizadas que son susceptibles de cirugía o radiación. Con respecto al cáncer, la quimioterapia utiliza agentes antineoplásicos en un intento de destruir las células tumorales al interferir con la función celular, incluida la replicación. Los fármacos quimioterapéuticos suelen tener mecanismos de acción que involucran una lesión letal en el ADN, lo que conduce además a la muerte de células malignas por apoptosis. Esto es particularmente importante en el tratamiento contra el cáncer, ya que las células cancerosas crecen y se multiplican mucho más rápido que la mayoría de las células del cuerpo. El modo de acción de ciertos agentes quimioterapéuticos involucra también la generación de radicales libres causando daño celular y necrosis en las células malignas (K. Singh et al., 2018). Dado que otras células del cuerpo pueden ser blanco de los mecanismos de acción de los antineoplásicos, por ejemplo, aquellas con una tasa de proliferación similar a las tumorales, la quimioterapia acarrea el riesgo de que se presenten efectos secundarios derivados de su toxicidad, como la mielosupresión, la caída del cabello y la mucositis, limitando así su efectividad (Conklin, 2004).

2.2 Toxicidad sistémica inducida por quimioterapia

Una de las causas de la alta mortalidad del cáncer se basa principalmente en la resistencia que estos presentan frente a los diversos tratamientos. Más específicamente, el fracaso de la quimioterapia en el tratamiento del cáncer se debe sobre todo al desarrollo de resistencia a los fármacos, además de que todos los fármacos contra el cáncer son citotóxicos tanto para las células

cancerosas como para las normales (Alam et al., 2018). La gama de efectos secundarios no deseados referentes a su uso es muy amplia, llegando en algunos casos a ser potencialmente mortales o gravemente debilitantes. Se conocen un gran número de efectos adversos asociados al tratamiento del cáncer por quimioterapia, tales como daño cardíaco, toxicidad renal, toxicidad pulmonar e incluso problemas de fertilidad, los cuales son leves y pueden tratarse (Lundqvist et al., 2015). No obstante, los efectos adversos más comunes son el daño a la médula ósea, el cual se caracteriza principalmente por neutropenia (K. Singh et al., 2018), y la neuropatía periférica, que se caracteriza por síntomas de dolor y fatiga causadas por daño en los nervios periféricos (Jones et al., 2019). La quimioterapia induce neuropatía periférica dañando los nervios que controlan la sensibilidad y, ocasionalmente, los que controlan la movilidad. Sin embargo, no está claro por qué se da esta afección, como actúa, ni cuándo (Julie Munch, 2017). La neuropatía se puede dar en pacientes desde la primera dosis o experimentarla hasta etapas avanzadas del tratamiento, incluso algunos pacientes pueden continuar con la neuropatía bastante tiempo después de terminado el tratamiento, y en otros simplemente desaparecer finalizado el tratamiento. Generalmente, la neuropatía periférica se clasifica como un síndrome de dolor; sin embargo, los pacientes pueden tener una variedad de síntomas que, en algunos casos, se interpretan o expresan como dolor, pero en otros como sensaciones extrañas tales como hormigueo o pérdida de sensibilidad (Julie Munch, 2017). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha mostrado resultados estadísticos donde la prevalencia del dolor en pacientes con cáncer oscila entre el 40% y 60% y que dicho síntoma explica la mitad de las causas de hospitalización en esta población. Varios estudios realizados en Estados Unidos determinaron que cerca del 1,5% de las personas presentan algún grado de dolor neuropático, que, a su vez, causa entre el 25% y 40% de las visitas a clínicas especializadas (Cardona et al., 2010).

2.3 Estrés oxidante y especies reactivas de oxígeno (ERO)

Los organismos aeróbicos están expuestos constantemente a diversos agentes oxidantes generados intencionalmente o como subproductos. En general, estos oxidantes son de dos tipos: las ERO y las especies reactivas de nitrógeno (ERN). Ambos tipos tienen funciones biológicas esenciales para el desarrollo celular normal (Carvajal, 2019). El estrés oxidante es el resultado de un desequilibrio entre las ERO y las defensas antioxidantes. Este estrés oxidante desregula una serie de funciones celulares y conduce a diversas condiciones patológicas en las que las ERO superan las defensas antioxidantes del organismo, lo que lleva a la modificación oxidante de macromoléculas biológicas, la lesión tisular y a la muerte celular acelerada, provocando alteraciones en la función celular que se relacionan con varias afecciones, como la inflamación crónica, el asma, las enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, la senescencia y el cáncer (Gulcin, 2020). Las ERO son especies químicas intracelulares que contienen oxígeno y son reactivas frente a lípidos, proteínas y ADN. Las ERO incluyen el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), así como los radicales hidroxilo (OH^{\bullet}). Los diferentes tipos de ERO tienen diferentes propiedades químicas intrínsecas que dictan su reactividad y objetivos biológicos preferidos (Glasauer & Chandel, 2014).

Las ERO tienen funciones contradictorias en la oncogénesis, lo que tiene implicaciones importantes para el desarrollo de posibles terapias contra el cáncer que involucran modular los niveles redox celulares. Las dos fuentes principales de ERO son las mitocondrias y la familia de NADPH oxidasas (NOX) ([Figura 1](#)). Las mitocondrias pueden liberar $O_2^{\bullet-}$ o H_2O_2 . En el citosol, la superóxido dismutasa 1 (SOD1) convierte el $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . Las NADPH oxidasas también pueden generar $O_2^{\bullet-}$ en el citosol. Por otro lado, la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPX) y las

peroxiredoxinas (PRX) pueden convertir el H_2O_2 en agua (Lambeth, 2004). Al reaccionar con iones ferrosos o cuprosos, el H_2O_2 forma radicales $OH\bullet$ que pueden dañar el ADN, las proteínas y los lípidos. El H_2O_2 controla la señalización celular mediante la oxidación de los tioles de las proteínas. Diferentes niveles de H_2O_2 conducen a diferentes resultados celulares. Las concentraciones normales intracelulares de H_2O_2 son importantes porque proporcionan un entorno oxidante permisivo para la señalización celular que es ideal para mantener la homeostasis (por ejemplo, diferenciación y proliferación) y para adaptarse al estrés (por ejemplo, el metabólico). Los niveles de H_2O_2 por debajo de este rango óptimo conducen a una alteración de la señalización celular que provoca la pérdida de la homeostasis. Por otra parte, los niveles de H_2O_2 por encima del rango óptimo causan daño oxidante y una señalización celular aberrante que dan lugar a patologías como el cáncer, o términos extremos como la muerte celular, cuando los niveles de H_2O_2 son muy elevados (Glasauer & Chandel, 2014).

Los niveles altos de ERO pueden estar ligados al dolor neuropático periférico. Las ERO elevadas en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (GRD) y en las células inmunitarias y de la glía promueven la hiperexcitabilidad de las neuronas de los GRD a través de varios mecanismos, incluida la alteración de la bioenergética mitocondrial, lo cual perjudica la producción de energía y la homeostasis iónica, conduciendo a la actividad espontánea y la degeneración de los nociceptores. Estas especies reactivas también inducen indirectamente la hiperexcitabilidad neuronal mediante la promoción de la expresión de mediadores neuroinflamatorios como el factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de las células B activadas (NF κ B). Por lo tanto, restaurar el equilibrio redox tiene el potencial de resolver múltiples mecanismos de dolor (Jiahe et al., 2020).

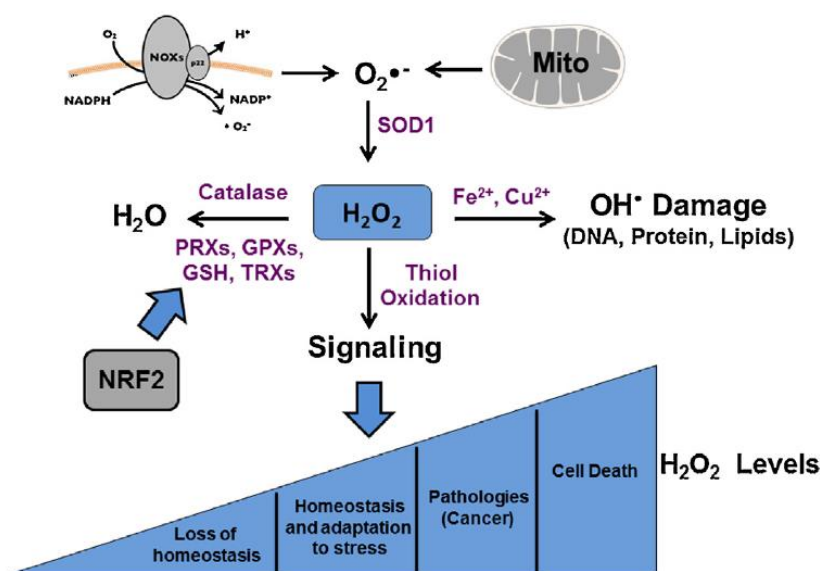


Figura 1. Regulación y efectos biológicos de las especies reactivas de oxígeno. Tomado de: (Glasauer & Chandel, 2014).

2.4 Toxicidad del docetaxel

Ciertos medicamentos han sido implicados en el desarrollo iatrogénico de la neuropatía periférica inducida por fármacos (NPIF) e incluyen agentes quimioterapéuticos, antimicrobianos, fármacos cardiovasculares, psicotrópicos, anticonvulsivos, entre otros (Jones et al., 2019). La mielosupresión, caracterizada por neutropenia, anemia y trombocitopenia, entre otras, también es un efecto adverso importante de la quimioterapia que aumenta la morbilidad/mortalidad y los costes sanitarios. En la práctica clínica, el 30% de los pacientes experimentan neutropenia grave/febril durante la quimioterapia, a los dos tercios del primer ciclo (Xu et al., 2018).

El docetaxel es un antineoplásico semisintético, análogo del paclitaxel, aprobado por la FDA contra el cáncer de mama, ovario, pulmón, próstata y otros tipos de cáncer (New et al., 1996; Zehua et al., 2022). Su actividad se basa en el ligamiento específico a las subunidades de beta tubulina de los microtúbulos, promoviendo su ensamblaje e inhibición de la despolimerización de

la tubulina; por ello, estabiliza los microtúbulos (Cortes & Pazdur, 1995). El equilibrio entre los heterodímeros de la tubulina y los microtúbulos está controlado por unas proteínas denominadas MAPS (del inglés *microtubule assembly proteins*). El docetaxel se une a los microtúbulos en sitios específicos de las MAPS sin alterar el número de heterodímeros, pero estabiliza la tubulina en condiciones en que la polimerización tiene lugar normalmente. Al impedir los procesos normales de formación-despolimerización de los microtúbulos, el docetaxel provoca la muerte celular. Los efectos citotóxicos se deben a que el docetaxel bloquea algunos de componentes críticos en la fase S de la división celular que son esenciales para la mitosis. Igualmente, el docetaxel afecta la organización del centrosoma en la fase S, lo que ocasiona una mitosis incompleta y la muerte de la célula. El docetaxel actúa únicamente sobre las células en mitosis y afecta solo parcialmente las células en la fase G1 (Instituto Químico Biológico, 2009). Además, el docetaxel también es capaz de inhibir la expresión de genes antiapoptóticos como BCL-2 y BCL-X_L, favoreciendo la liberación del citocromo c mitocondrial mediada por la proteína pro-apoptótica Bax. De este modo se activa la caspasa-9, la cual lleva a la ejecución de la apoptosis intrínseca, también llamada apoptosis mitocondrial (M. T. Schweizer et al., 2016). La destrucción celular depende de la concentración del fármaco y del tiempo de exposición. Pero así mismo, como es común en algunos tratamientos quimioterapéuticos, el docetaxel puede producir efectos citotóxicos y reacciones adversas como neuropatía periférica, reacciones a la infusión, neutropenia febril, fatiga, retención de fluidos, neumonitis y complicaciones gastrointestinales (Ho & Mackey, 2014). La neurotoxicidad periférica asociada al docetaxel es un síndrome de dolor agudo que consiste en dolor muscular difuso, principalmente en piernas, caderas y espalda baja, aunque se puede extender, dando lugar a mialgia y/o artralgia (Velasco & Bruna, 2015). La polineuropatía

asociada al docetaxel puede ser de tipo sensitiva, sensitiva axonal y motora (Sepúlveda Sánchez, 2019).

Los tratamientos disponibles para el dolor neuropático tienen una eficacia modesta y efectos adversos significativos, incluido el potencial de abuso. El dolor neuropático, causado por lesión o enfermedad del sistema nervioso, tiene una prevalencia estimada de 7 a 10% en la población general y es una enorme carga para la economía y la calidad de vida del paciente (Jiahe et al., 2020). El mecanismo patofisiológico exacto de la neurotoxicidad periférica inducida por taxanos aún no está completamente descrito, sin embargo, se cuenta con alguna información importante. Las neuronas son células quiescentes, pero los microtúbulos intactos son requeridos para el transporte axonal anterógrado y retrógrado, del cual dependen la función y supervivencia neuronal. Los taxanos inducen una reconfiguración polar aumentada que estabiliza los microtúbulos y que puede alterar el transporte axonal de diferentes sustancias y mitocondrias. Esta estabilidad microtubular conduce a una pérdida de la integridad axonal o a su degeneración, lo que, a su vez, se traduce en una fisiología nerviosa anormal (Velasco & Bruna, 2015). Se ha demostrado que las mitocondrias en axones de neuronas sensoriales son susceptibles a la toxicidad por taxanos dada la liberación de calcio, lo cual conduce a disfunción mitocondrial y, por tanto, a un déficit energético crónico. Específicamente, se ha propuesto el daño mitocondrial y de fibra fina como mecanismo de toxicidad del paclitaxel, produciendo una toxicidad inmediata y aguda, incluso desde la primera dosis (Sepúlveda Sánchez, 2019). Además, existe información de que los taxanos desencadenan la formación de ERO en las células cancerosas. Una concentración excesiva de ERO puede provocar la activación de la apoptosis también en las neuronas, contribuyendo a la toxicidad de los taxanos. Se ha demostrado que el paclitaxel induce alteraciones en la membrana mitocondrial que afectan la liberación de citocromo C conduciendo a la apoptosis

(Rizzo, 2021). Normalmente, el daño y la disfunción mitocondrial se asocian con generación descontrolada de ERO, bajos niveles de antioxidantes celulares y estrés oxidante en general (Orrenius, 2007). Los pacientes sometidos a tratamiento con taxanos pueden presentar dos tipos de neurotoxicidades periféricas: agudas transitorias y subagudas de larga duración. El paclitaxel y el docetaxel se asocian a un síndrome de dolor agudo en hasta el 70% de los pacientes, consistente en un dolor muscular difuso, con mayor frecuencia en piernas, caderas y región lumbar, aunque puede ser generalizado (Velasco & Bruna, 2015).

Según las directrices de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (del inglés *American Society for Clinical Oncology*) y la Sociedad Europea de Oncología Médica, no existen agentes recomendados o eficaces para prevenir la neuropatía periférica inducida por la quimioterapia. Los ensayos clínicos han demostrado que el tratamiento con duloxetina reduce los síntomas de dolor, entumecimiento y hormigueo, pero sólo en un grado moderado, con un mejor efecto protector en el tratamiento de la neuropatía periférica debida a fármacos basados en el platino que a otras terapias como los taxanos (Desforges et al., 2022). Se han explorado otras opciones, como los antidepresivos tricíclicos o los fármacos anticonvulsivantes, pero los ensayos muestran resultados dispares (Jordan et al., 2020; Loprinzi et al., 2020).

Por otra parte, la neutropenia sigue siendo una afección que no tiene más tratamiento que la prevención frente a posibles infecciones una vez adquirida. La neutropenia grave suele requerir la modificación del régimen de quimioterapia y puede comprometer la eficacia anticancerosa. La prevención de la neutropenia es un beneficio importante para el paciente por razones de seguridad, eficacia del tratamiento y rentabilidad (Blayney et al., 2022). Existen directrices recientes basadas en la evidencia para la prevención de las infecciones asociadas a la neutropenia inducida por la quimioterapia (Dale, 2016). Sin embargo, los antibióticos son el tratamiento estándar para la

neutropenia febril y se utilizan cada vez más para la profilaxis en pacientes con bajo riesgo de neutropenia febril (Dale, 2009). Los factores estimulantes de colonias de granulocitos (G-CSF) estimulan la producción y el desarrollo de neutrófilos, los cuales son necesarios para combatir las infecciones. Algunos G-CSF como el pegfilgrastim y el filgrastim se han utilizado para el tratamiento de la neutropenia febril causada por quimioterápicos (Lee et al., 2018). Por otro lado, la plinabulina, un agente inmunomodulador de unión a microtúbulos no selectivo al G-CSF que posee propiedades protectoras de las células madre hematopoyéticas y beneficios anticancerígenos (Blayney et al., 2022), se ha administrado previamente en animales, donde se observó una mejora de la neutropenia inducida por diversas quimioterapias, como docetaxel, clorhidrato de doxorubicina y ciclofosfamida, a través de un mecanismo distinto al G-CSF (Tonra et al., 2020).

2.5 Antioxidantes

Cuando nos referimos a una sustancia o molécula antioxidante, se habla de compuestos capaces de retrasar o incluso prevenir el daño oxidante irreversible de otras sustancias/macromoléculas debido a la reactividad de algunos metabolitos presentes en un sistema vivo. Se promueven así beneficios para la salud, ya que el estrés oxidante es la raíz de varios procesos fisiopatológicos (Mendonça et al., 2022). El aporte de antioxidantes actúa neutralizando las ERO que se producen en el sistema durante los procesos fisiológicos (Harasym & Oledzki, 2014). Esta capacidad los hace útiles para mantener la correcta función de las proteínas, ya que las ERO en exceso llevan a la oxidación de proteínas y a la interacción de los carbonilos derivados de los lípidos con las proteínas, lo que conduce a una alteración de la función de las mismas (Sindhi et al., 2013). Las frutas se consideran una fuente sustancial de antioxidantes, el consumo de éstas ayuda en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Los antioxidantes también se

consideran como posibles tratamientos para enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral. Se ha informado que los antioxidantes desempeñan un papel específico en el tratamiento de varias condiciones patológicas tales como artritis reumatoide, trastornos cardiovasculares, ulcerogénesis y enfermedades de inmunodeficiencia adquirida, que son causadas por el daño oxidante excesivo a las células (Sindhi et al., 2013).

2.6 Efectos de antioxidantes sobre la toxicidad de fármacos antineoplásicos

El efecto tóxico de un fármaco se refiere a la generación de daño a células y tejidos que provoca alteraciones patológicas, a menudo observadas cuando se usan dosis mayores a las recomendadas. En el caso de los antineoplásicos, se refiere al daño local o sistémico en células no afectadas por el cáncer; se le llama también efecto secundario o efecto adverso del tratamiento. Los fármacos antineoplásicos usados en el tratamiento contra el cáncer presentan reacciones adversas que a menudo están relacionados con daño oxidante (Guerrero et al., 2016). Debido al papel causal de las ERO en la promoción del cáncer y al hecho de que varios fármacos induzcan en su tratamiento un aumento en el estrés oxidante, la investigación se ha centrado en tratamientos antioxidantes para amortiguar los niveles de ERO como estrategias terapéuticas contra la oncogénesis y/o como protectores contra el daño oxidante en diferentes tratamientos antitumorales (Gulcin, 2020). Los tratamientos antioxidantes incluyen la suplementación de eliminadores naturales de ERO, el tratamiento con antioxidantes exógenos y también otras estrategias que disminuyen el estrés oxidante como la interrupción de la cadena de transporte de electrones mitocondrial productora de ERO (Weinberg et al., 2010).

El estrés y el daño oxidante pueden disminuirse al administrar antioxidantes antes o durante el tratamiento con antineoplásicos. Se ha demostrado en ensayos *in vivo* que antioxidantes como el escualeno evitó la disminución de la actividad enzimática de SOD, GPX, catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR) y glutatión s-transferasa (GST) y de la concentración de vitamina C, vitamina E y ceruloplasmina en plasma provocado por ciclofosfamida (Senthilkumar et al., 2006). El licopeno ha tenido actividad en la disminución de la nefrotoxicidad durante el tratamiento con cisplatino (Atessahin et al., 2005), mientras que la N-acetilcisteína, un antioxidante y precursor del glutatión (GSH) impidió la producción de ERO inducida por metotrexato y el aumento de la permeabilidad paracelular (Maeda et al., 2010). Kim et al. estudiaron la fosfatidilcolina en la atenuación de la neurotoxicidad periférica inducida por docetaxel en ratas, donde disminuyó el estrés oxidante en el nervio ciático al aumentar los niveles de antioxidantes (actividad de GSH, GPX y SOD) (Kim et al., 2018). Los resultados *in vivo* sugieren que el uso de antioxidantes no disminuye la eficacia de los antineoplásicos; por el contrario, en algunos casos potencian su actividad, además de contribuir a la disminución del daño provocado por estos fármacos (Guerrero et al., 2016). Esta capacidad se puede observar en el sulforafano, el cual actúa en sinergia con el cisplatino ayudando a disminuir la citotoxicidad producida por este, y a su vez potencia su actividad antitumoral (Khan et al., 2018).

2.7 Factor Nrf2

El factor Nrf2 es un factor transcripcional codificado por el gen NFE2L2 relacionado con la familia de factores de transcripción *Cap'n'collar* que regula la expresión basal e inducible por estrés de más de 250 genes que contienen la secuencia ARE (secuencia consenso: (A/G) TGA (G/C) TCAGCA) en sus promotores (Kobayashi et al., 2016). La activación del factor Nrf2

aumenta la expresión de enzimas antioxidantes como la NAD(P)H deshidrogenasa quinona 1 (NQO1), la hemooxigenasa 1 (HO-1) y otras (Negrette-Guzmán et al., 2013) . En consecuencia, estas acciones mejoran la función mitocondrial y la síntesis de ATP y previenen el daño oxidante (Negrette-Guzmán et al., 2013; Villavicencio & Quintanilla, 2021). La regulación de Nrf2 ocurre principalmente por dos mecanismos específicos: la proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (Keap1) y la participación de b-TrCP con la glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK)-3 β ([Figura 2](#)). En las células normales, Keap1 y el adaptador de sustrato de ubiquitina ligasa E3 regulan los niveles de proteína Nrf2 de manera redox-dependiente. La proteína Keap1 forma un homodímero responsable de secuestrar a Nrf2 en el citosol y hacerlo inactivo (Yamamoto et al., 2018). Keap1 también se une a Cullin 3 (Cul3), el cual forma un núcleo con el complejo de ubiquitina ligasa E3 a través de una asociación con la proteína Ring-box1 (Rbx1, también llamada Roc1). En condiciones homeostáticas, el complejo Keap1-Cul3-Rbx1 puede ubiquitinar Nrf2 y orientarlo para su degradación en el proteosoma. En respuesta a electrófilos y oxidantes, que identifican y modifican químicamente residuos de cisteína específicos de Keap1, se inhibe la ubiquitinación de Nrf2 (Mcmahon et al., 2010).

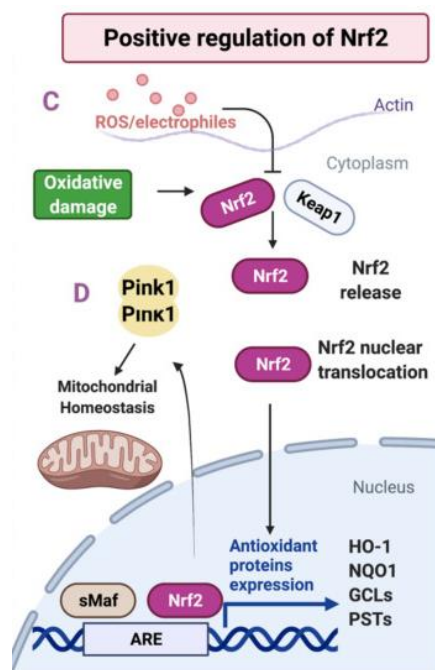


Figura 2. Regulación de la vía Nrf2 en células neuronales. Tomado de: (Villavicencio & Quintanilla, 2021).

2.8 Dimetilfumarato

El dimetilfumarato, un éster de ácido fumárico (éster de ácido carboxílico α , β -insaturado), es un medicamento aprobado por la FDA y la EMA, el cual es eficaz en el tratamiento de la esclerosis múltiple recurrente/remitente, ya que disocia el complejo Nrf2-Keap1 a través de la modificación directa de grupos tiol en Keap1, promoviendo así la activación y estabilización de Nrf2 (Jiahe et al., 2020). Este medicamento se utilizó por primera vez para tratar enfermedades inflamatorias de la piel, como la psoriasis. Los efectos beneficiosos de este medicamento se corroboraron con la regulación de la diferenciación de células CD4 + Th1. El mecanismo de acción no se conoce completamente. Después de la ingesta oral, el dimetilfumarato se disocia a monometilfumarato en el intestino delgado y pasa casi por completo a la circulación sistémica en

esta forma, excretándose solo pequeñas cantidades de dimetilfumarato en las heces y la orina. El dimetilfumarato posee una vida media corta de ~12 min dentro del cuerpo, mientras que el monometilfumarato tiene una vida media corta de 36 h. Esta molécula interactúa con las células inmunitarias en la circulación sanguínea y atraviesa la barrera hematoencefálica hacia el sistema nervioso central (Al-Jaderi & Maghazachi, 2016). En ensayos clínicos, mostró beneficios positivos para los pacientes con esclerosis múltiple al reducir el riesgo de recaída y reducir la cantidad de lesiones cerebrales (Al-Jaderi & Maghazachi, 2016). El monometilfumarato interactúa con Keap1 activando el factor Nrf2 para ejercer una respuesta antiinflamatoria y antioxidante (Sanginetto et al., 2020). La estabilización y fosforilación de Nrf2 facilita su importación nuclear, formando heterodímeros con MAFG, regulando posteriormente genes citoprotectores e inhibiendo la translocación nuclear de NF- κ B, disminuyendo así la expresión de citocinas inflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión dependientes de NF- κ B (Iniaghe et al., 2015). Previamente se ha relacionado el uso del dimetilfumarato en la búsqueda del tratamiento del dolor neuropático (Cobos del Moral, 2020). Jiahe y colaboradores usaron dimetilfumarato en ratas Sprague Dawley macho, reportando un incremento del factor Nrf2, lo cual se tradujo en el incremento de la expresión de superóxido dismutasa y de glutatión, potenciando la defensa antioxidante y promoviendo la disminución de citoquinas antiinflamatorias tras la sección parcial del nervio ciático (Jiahe et al., 2020). Existen diferentes trabajos que involucran hepatoprotección, neuroprotección y protección anti-artritis usando dosis orales diarias entre 25 y 100 mg/kg de dimetilfumarato, de 6 a 8 semanas, mostrando un efecto citoprotector mediado por Nrf2 en ratas Wistar (Dwivedi & Jena, 2020).

3 Metodología

La metodología de investigación en este proyecto se dividió en tres fases representadas en la [Figura 3](#). La primera fase consistió en la estandarización del modelo de daño, la inducción conjunta de neuropatía periférica y neutropenia, por medio de la evaluación de 4 diferentes esquemas de administración intravenosa de docetaxel usando pruebas nociceptivas y hemogramas. La segunda fase consistió en la administración del tratamiento protector contra el esquema de docetaxel que mejor representó el daño, usando dimetilfumarato oral y analizando nuevamente por medio de pruebas nociceptivas y hemogramas. Se realizó la extracción de nervio ciático y se prepararon homogenados para dar paso a la fase 3, la cual consistió en el análisis de enzimas y de moléculas de bajo peso molecular asociadas al estrés y el daño oxidante.

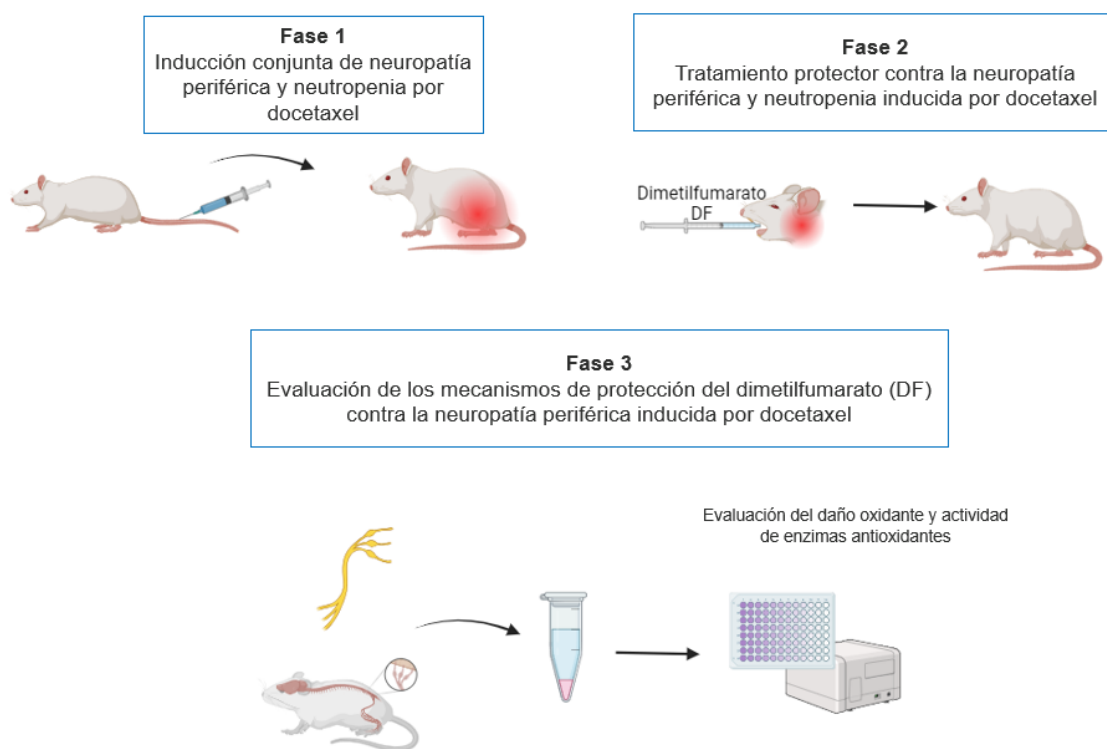


Figura 3. Fases metodológicas del proyecto.

3.1 Establecimiento del modelo experimental animal en la inducción conjunta de la neuropatía periférica y neutropenia (Fase 1)

3.1.1 Reactivos

El docetaxel inyectable se adquirió de BLAÛ Farmacéutica (Brasil), su presentación constaba de dos ampollas para mezcla: 1 ampolla de compuesto concentrado (docetaxel) y 1 ampolla de solvente (etanol 13% p/v en agua). Se preparó el docetaxel siguiendo las instrucciones del fabricante, haciendo una mezcla en proporción 1:3 del compuesto concentrado y el solvente, obteniendo una concentración final de 10 mg/mL. Todo esto fue realizado en cabina de flujo laminar para evitar contaminación del medicamento. La preparación se hacía instantes previos a la administración para evitar la cristalización, la cual ocurría un día después de preparada la solución. El dimetilfumarato (97%) se adquirió de Sigma-Aldrich (St Loius, MI, EE.UU.) y se resuspendió en carboximetilcelulosa (CMC, Sigma-Aldrich, St Loius, MI, EE.UU.), la cual se preparó al 1% p/v diluyendo en agua destilada.

3.1.2 Animales

Se usaron ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar, machos, con un peso de 180 ± 10 g al inicio de los tratamientos. Los animales se alojaron, mantuvieron, cuidaron y usaron de acuerdo a lo dispuesto en la ley 84 de 1989, por la cual el Congreso de la República adoptó el Estatuto Nacional de Protección de los Animales en el país; el título V de la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; y siguiendo los lineamientos descritos en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Academia Nacional de Ciencias de los

Estados Unidos (National Research Council (U.S.), 2011). Los animales nacieron y fueron mantenidos en el Bioterio de la Universidad Industrial de Santander (UIS) ubicado en la sede UIS-Guatigará a una temperatura de 21°C – 24 °C, humedad relativa del 55-70%, fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad con agua estéril y alimento especializado *ad libitum*. Se usaron en total 88 animales para este estudio. Este proyecto contó con el aval del Comité de Ética en Investigación Científica (CEINCI) de la Universidad Industrial de Santander, registrado en el Acta N° 12 del día 30 de abril del 2024.

3.1.3 Tratamiento con docetaxel para inducción conjunta de neuropatía periférica y neutropenia *in vivo*.

Se probaron 4 diferentes esquemas de administración de docetaxel usando información obtenida de la literatura que asegurara neutropenia o neuropatía periférica. Se usó información clínica haciendo la conversión a mg/kg mediante la relación $\text{mg/kg} = (\text{mg/m}^2)/k_m$, donde k_m (coeficiente de conversión alométrica) tiene un valor de 6 para ratas (U.S. Department of Health and Human Services et al., 2005). Se tuvo en cuenta un esquema similar al usado en humanos, donde el estándar del tratamiento fue una dosis de 75 a 100 mg/m² administrada una vez cada tres semanas (Taberner et al., 2004); aplicando la conversión, se determinó el rango de dosis equivalente en ratas con valores de 12.5 a 16.6 mg/kg. Se tuvo en cuenta también un esquema de administración con docetaxel implementado por Zhao et al., donde obtuvieron una disminución significativa en el conteo de leucocitos con una dosis de 14.4 mg/kg cada 3 semanas por seis semanas (Zhao et al., 2010). Igualmente, Branda et al. obtuvieron una leucopenia significativa en ratas con una dosis única de docetaxel (15 mg/kg) (Branda et al., 2006). Por otro lado, se encontró un esquema en ratas donde se administra docetaxel en una dosis semanal de 5 mg/kg por 4 semanas

(Kim et al., 2018) para evaluación de la neurotoxicidad periférica. Además, también se usó como referencia un esquema que encontró síntomas de neuropatía periférica en pacientes de 2 a 3 días después de administración de una dosis estándar única, manifestándose hasta por 7 días (Velasco & Bruna, 2015). Por último, se tuvo en cuenta un esquema alternativo propuesto y evaluado en humanos usando dosis más bajas (33 a 40 mg/m², equivalente a 5.5 a 6.7 mg/kg en ratas) administradas semanalmente, donde se encontró neutropenia, sin disminuir la eficacia antitumoral (Taberero et al., 2004; Bria et al., 2006).

Con base en la información anterior, los esquemas ensayados fueron los siguientes ([Figura 4](#)):

- Esquema 1: una dosis única intravenosa (i.v.) de docetaxel 15 mg/kg.
- Esquema 2: dos dosis, una primera dosis i.v. de docetaxel 15 mg/kg y una igual 3 semanas después.
- Esquema 3: seis dosis, una dosis i.v. de docetaxel 5 mg/kg cada semana por seis semanas.
- Esquema 4: tres dosis, una dosis i.v. de docetaxel 15 mg/kg cada 3 semanas.

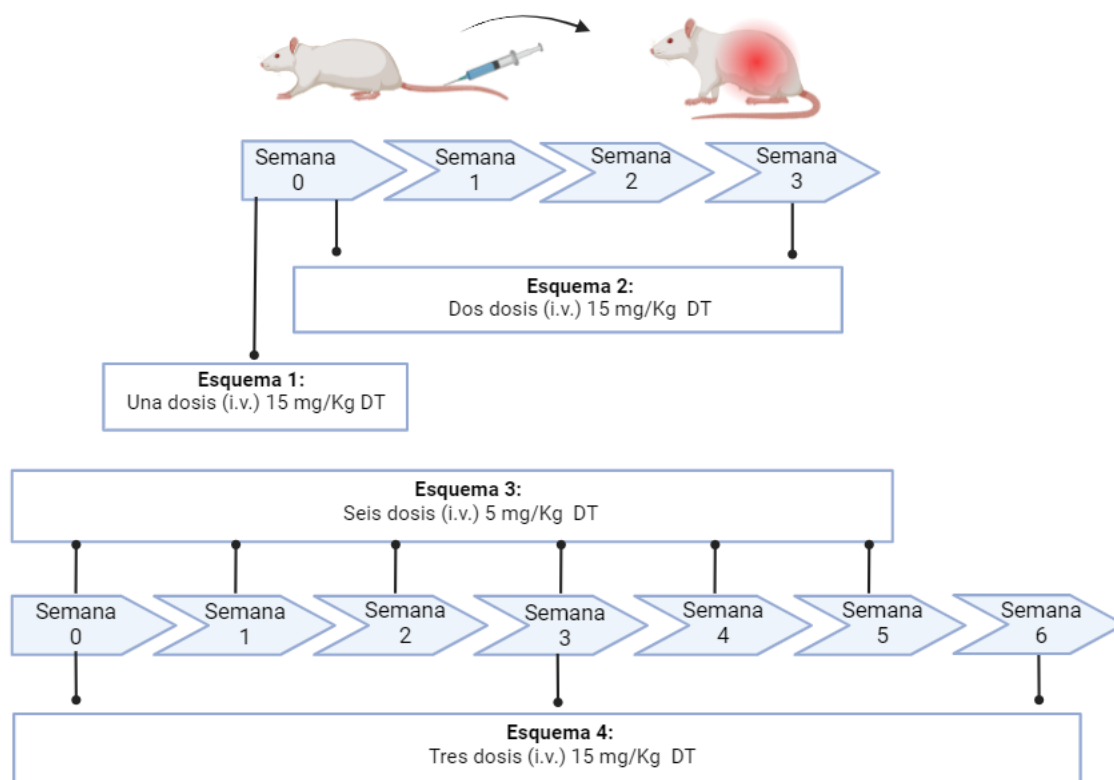


Figura 4. Esquemas de administración de docetaxel evaluados para inducción conjunta de neuropatía periférica y neutropenia.

Los animales fueron pesados en balanza electrónica de precisión usando un recipiente para mantenerlos restringidos durante el pesaje. Se tomó el dato de peso cada día de tratamiento antes de la aplicación del mismo, con el fin de determinar la dosis y registrar el aumento o reducción de peso en cada animal. El docetaxel (10 mg/mL) se administró por la vena de la cola en volúmenes dependientes del peso del animal. En total, para cada esquema se trataron dos grupos experimentales: el grupo control (CT, $n = 8$), al cual se le administra solución salina isotónica (SSI) vía i.v., y el tratamiento con docetaxel (DT, $n = 8$). Se usaron para esta primera fase un total de 64 animales (8 por cada grupo en los 4 esquemas), a los cuales se les realizaron posteriormente

las mismas pruebas sensoriales y los diferentes análisis sanguíneos. Los animales se asignaron de manera aleatoria para cada uno de los grupos antes de iniciar el tratamiento.

3.1.4 Pruebas comportamentales sensoriales y eutanasia

Al final de los tratamientos, 4 días después de la última administración en cada esquema, se llevaron a cabo pruebas comportamentales sensoriales de presión en pata y en cola y el método de placa caliente (Kim et al., 2018) para determinar posible daño neuropático, usando el analgesímetro tipo Randall-Selitto PANLAB modelo LE7306 y el analgesímetro tipo Placa caliente PANLAB modelo LE7406 (Panlab, S.L.U., Barcelona, España), respectivamente. Los ensayos nociceptivos se basaron en indicadores físicos de malestar, como reflejos de retirada, lamidos y vocalizaciones (Carter & Shieh, 2010). Se realizaron las mediciones por triplicado, con duración de 10 minutos entre cada replica, y se expresaron los datos como el valor de la media \pm DE. Para las pruebas de presión en pata y cola, se ubicó la extremidad sobre la base del equipo tipo Randall-Selitto y se aplicó presión en aumento hasta lograr el estímulo esperado en el animal, que se tradujo como vocalización o retirada de la pata o cola. Se tomaron como resultados los valores de los umbrales de presión que se obtuvieron una vez logrado el estímulo. Para la prueba de placa caliente, se realizaron, al igual que en las pruebas de presión, mediciones por triplicado y se expresaron los datos como el valor de la media \pm DE. Se usó un rango de temperatura de $50\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ y se tomó el tiempo hasta que el animal hiciera una lamida de pata como respuesta al estímulo de calor. La secuencia de análisis sensoriales se realizó midiendo primero presión en pata, seguido de placa caliente y por último presión en cola. Para garantizar un tratamiento ético para los animales, se ajustaron valores máximos de corte de presión en pata/cola max 650 g y hasta 30 s de latencia en placa caliente con una temperatura de $50\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ (Carter & Shieh, 2010; Suckow Mark et al.,

2019). Concluidas las pruebas, las ratas se anestesiaron con ketamina (90 mg/kg) + xilacina (15 mg/kg) vía intraperitoneal (i.p.), y se realizó exanguinación como método de eutanasia.

3.1.5 Neutropenia

La neutropenia se evaluó por conteo diferencial de neutrófilos y se obtuvo un hemograma completo para analizar otros marcadores. Para esto, se usó el equipo de hematología automatizada Genvet VH50, el cual realizó conteo por citometría de flujo usando sangre completa el día de la eutanasia por punción en el ventrículo izquierdo del animal y almacenada en tubos con EDTA a 4°C hasta su utilización en un tiempo no mayor a 4 días.

De los cuatro esquemas de tratamiento propuestos, se seleccionó aquel en el que se indujo neutropenia significativa y en donde se observaron disminuciones significativas en los umbrales nociceptivos, simultáneamente y de manera consistente y confiable.

3.2 Evaluación del efecto protector del dimetilfumarato (Fase 2)

3.2.1 Tratamiento protector usando dimetilfumarato

Una vez seleccionado el mejor esquema de tratamiento que aseguró neutropenia y neurotoxicidad periférica, se incorporó a este el tratamiento con el antioxidante dimetilfumarato como potencial sustancia protectora. Considerando estudios previos, se propuso un esquema protector que constó de los siguientes grupos experimentales:

- *Control (CT, n=6)*: como vehículo del dimetilfumarato, se administró CMC 1% p/v oral (sonda intragástrica), cuatro días previo y el mismo día de la administración i.v. de solución salina isotónica (SSI) como vehículo del docetaxel.

- *Docetaxel (DT, n=6)*: se administró CMC 1% p/v oral, cuatro días previo y el mismo día de la administración del docetaxel, el cual se administró durante 6 semanas aplicando una dosis semanalmente vía i.v., de acuerdo al esquema seleccionado.
- *Dimetilfumarato (DF, n=6)*: se administró dimetilfumarato oral 100 mg/kg/día cuatro días previo y el mismo día de la administración i.v. de SSI como vehículo del docetaxel de acuerdo al esquema seleccionado.
- *DF+DT (n=6)*: se administró dimetilfumarato oral en dosis de 100 mg/kg/día cuatro días previo y el mismo día de la administración i.v. del docetaxel de acuerdo al esquema seleccionado.

Al igual que en la fase 1, los animales fueron pesados cada día de tratamiento antes de las administraciones con el fin de determinar la dosis y registrar el aumento o reducción de peso en cada animal. El tratamiento con dimetilfumarato previo al docetaxel se llevó a cabo para inducir un ambiente antioxidante en los tejidos del animal antes de la exposición al docetaxel. Como se mencionó anteriormente, el dimetilfumarato es un antioxidante indirecto que induce la expresión de enzimas citoprotectoras y antioxidantes mediante la activación de Nrf2 (Dwivedi & Jena, 2020). Se escogió un periodo de 4 días de pretratamiento con dimetilfumarato buscando asegurar un mayor nivel de estas enzimas.

En total, para esta fase se usaron 24 animales ($n = 6$ para cada uno de los 4 grupos). Al igual que en el apartado anterior, cuatro días después de finalizar el tratamiento, los animales fueron sometidos a las pruebas comportamentales sensoriales, tomando de igual manera valores de umbrales de presión para las pruebas de presión en pata y cola, y tiempo de latencia para la prueba de placa caliente, realizando mediciones por triplicado cada 10 minutos. Posteriormente,

los animales se eutanasiaron, obteniéndose sangre por punción en el ventrículo izquierdo, almacenándola en tubos con EDTA para hemogramas y en tubos con heparina para pruebas de bioquímica sanguínea. En este caso, también se obtuvo un nervio ciático de cada rata para estudios de los mecanismos de daño y/o protección.

3.2.2 Evaluación de la neutropenia y química sanguínea

Neutropenia

La neutropenia, al igual que en el apartado anterior, se evaluó en los 4 grupos por conteo diferencial de neutrófilos y hemograma usando el equipo de hematología automatizada Genvet VH50.

Química sanguínea

Al igual que para la determinación de neutropenia, se extrajo sangre del ventrículo izquierdo de los animales en los 4 grupos tratados usando tubos de heparina. La sangre se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos justo después de su obtención, se extrajo el plasma y se almacenó a -20°C hasta su utilización en un tiempo no mayor a 2 semanas. Para las determinaciones, se usaron kits obtenidos comercialmente, siguiendo las instrucciones del fabricante (LabTest Diagnóstica S.A., Minas Gerais, Brasil). Se determinó la actividad de creatina quinasa (CK-MB. Ref. 118), aspartato aminotransferasa (AST, Ref. 109), alanina aminotransferasa (ALT, Ref. 1008) y fosfatasa alcalina (Ref. 79), así como la concentración plasmática de creatinina K (Re. 96) y urea (Ref. 104). Estas pruebas se realizaron con el fin de obtener información adicional sobre el estado funcional de órganos clave como el corazón, el hígado y los riñones, estimando posibles daños tisulares o alteraciones metabólicas debido a la toxicidad del docetaxel.

Creatina quinasa (CK-MB)

Se determinó cuantitativamente la actividad de la isoenzima MB de la CK-MB en modo cinético incubando el plasma y la mezcla de reacción a 37°C y leyendo el NADH formado a 340 nm a los 0 y 5 minutos, de acuerdo a las siguientes reacciones:

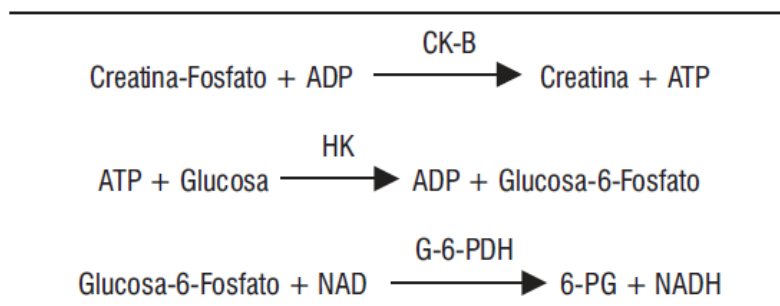


Figura 5. Reacciones involucradas en la determinación de la actividad de la creatina quinasa. Tomado de (Labtest Diagnóstica S.A., 2011a).

Aspartato aminotransferasa (AST)

Se midió la reducción de la absorbancia resultante de la oxidación del NADH a 37°C cada minuto por dos minutos a 340 nm, la cual es directamente proporcional a la actividad de la AST en la muestra, según las siguientes ecuaciones:

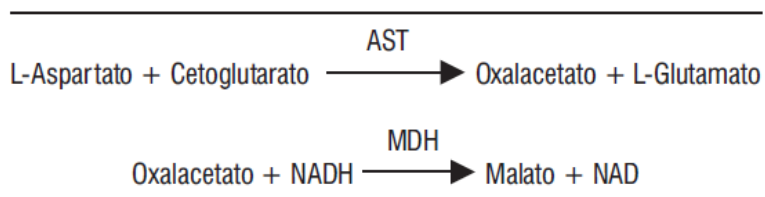


Figura 6. Reacciones involucradas en la determinación de la actividad de la AST. Tomado de (Labtest Diagnóstica S.A., 2013)

Alanina aminotransferasa (ALT)

Se midió la reducción de la absorbancia resultante de la oxidación del NADH a 37°C cada minuto por dos minutos a 340 nm, la cual es directamente proporcional a la actividad de la ALT en la muestra:

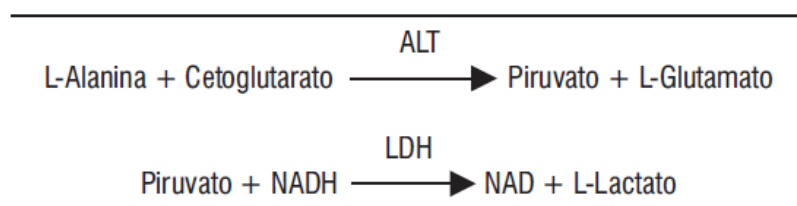


Figura 7. Reacciones involucradas en la determinación de la actividad de la ALT. Tomado de (Labtest Diagnóstica S.A., 2012a).

Fosfatasa alcalina (ALP)

Se midió fotométricamente a 405 nm, 37°C, a los 0 y 2 minutos, la cantidad producida de p-nitrofenol, la cual es directamente proporcional a la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina en la muestra:



Figura 8. Reacciones involucradas en la determinación de la actividad de la ALP. Tomado de (Labtest Diagnóstica S.A., 2011b)

Creatinina

Se determinó por medio de una reacción cinética de 2 puntos, leyendo a 510 nm a los 30 y 90 segundos a una temperatura de 37°C. Se midió el cambio de coloración del picrato de creatinina:

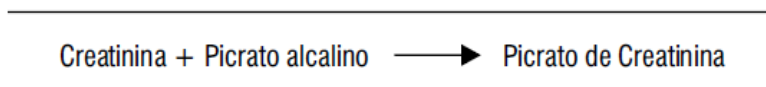


Figura 9. Reacción involucrada en la determinación de creatinina. Tomado de (Labtest Diagnóstica S.A., 2012b)

Urea

Se utilizó el sistema enzimático por fotometría UV usando cinética de dos puntos (tiempo fijo), incubado a 37°C durante 1 minuto y leyendo posteriormente a 340 nm a los 30 y 90 segundos. La consecuente reducción de la absorbancia debida al NADH es proporcional a la concentración de urea en la muestra, según las siguientes ecuaciones:

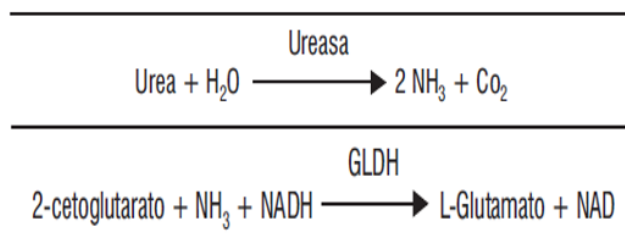


Figura 10. Reacciones involucradas en la determinación de urea. Tomado de (Labtest Diagnóstica S.A., 2011c)

3.3 Evaluación de los mecanismos de protección del dimetilfumarato contra la neuropatía periférica inducida por el docetaxel (Fase 3).

Uno de los nervios ciáticos de cada animal fue extraído y usado para evaluación del daño y el estrés oxidante. Para esto, cada nervio ciático fue aislado, lavado con SSI y homogenizado en un amortiguador con inhibidor de proteasas. Se usó una pastilla comprimida (SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets S8820) que contenía AEBSF 2 mM, EDTA 1 mM, bestatina 130 μ M, E-64 14 μ M, leupeptina 1 μ M y aprotinina 0,3 μ M, la cual se disolvió en 100 mL de PBS 50 mM + 100 μ L de Triton X-100. El tejido extraído se cortó en partes pequeñas para facilitar su ruptura en el sonicador, se pasó a un vial y se agregó un volumen del amortiguador siguiendo la relación de 1 mL de solución de amortiguador por cada 100 mg de tejido. Los viales de nervio con solución de amortiguador se mantuvieron en hielo por una hora y se sonicaron posteriormente a 40% con pulsaciones de 5 segundos durante 1 min con intervalos de 5 segundos entre cada pulsación en el homogenizador ultrasónico Pulse 650 (Benchmark Scientific, USA). El material resultante se centrifugó a 13,000 g por 15 min a 4°C y el sobrenadante fue almacenado a -80°C para la realización de ensayos posteriores. Se obtuvieron en total 24 homogenados de nervio ciático, uno para cada animal usado en esta fase,

3.3.1. Evaluación de marcadores de daño y estrés oxidante.

A todos los homogenados obtenidos se les realizó determinación de proteínas totales usando el método de Bradford, a partir de una curva de albumina sérica bovina (ASB) y reportando los valores como mg/mL. Se implementaron métodos para la determinación de malondialdehído (MDA) como marcador de peroxidación lipídica, las actividades enzimáticas de catalasa y superóxido dismutasa (SOD) y la cantidad de GSH total en los homogenados de nervio ciático.

1	0.7386	10 µl	990 µl
2	1.4772	20 µl	980 µl
3	2.9544	40 µl	960 µl
4	5.9088	80 µl	920 µl
5	11.8176	160 µl	840 µl
6	23.6352	320 µl	680 µl

La solución de 1M2F 15.4 mM se preparó en acetonitrilo:metanol relación 3:1 (16 mg de 1M2F en 5 mL de acetonitrilo:metanol 3:1). La solución de acetonitrilo:metanol 3:1 se usó también como blanco de la prueba. Se pasaron las muestras a analizar junto con cada estándar de TMPO. Se prepararon todas las soluciones en viales aparte siguiendo las cantidades mostradas en la [Tabla 2](#) y se incubaron a 45°C durante 40 min. Posteriormente, se centrifugaron a 3,000 g por 5 minutos, se extrajo 150 uL del sobrenadante de cada tubo y se depositaron en una placa de 96 pozos. Se leyó la absorbancia a 586 nm versus la curva estándar de TMPO en una placa de 96. Por último, se realizaron los cálculos para determinar la cantidad de MDA relacionando con la cantidad de proteínas totales previamente determinada por la prueba de Bradford.

Tabla 2. *Cantidades para preparación de soluciones en la determinación de malondialdehído.*

	Blanco	Estándares (curva TMPO)	Muestra	Blanco de muestra
Buffer fosfato 50 mM pH 7.4	50 µL	--	--	--
Estándares de MDA (CURVA TMPO)	--	50 µL	--	--
Muestra	--	--	50 µL	50 µL

Sol. de 1M2F (en acetonitrilo:metanol; 3:1)	162.5 μ L	162.5 μ L	162.5 μ L	--
HCl concentrado 37% Sol.	37.5 μ L	37.5 μ L	37.5 μ L	37.5 μ L
acetonitrilo:metanol (3:1)	--	--	--	162.5 μ L
VOLUMEN TOTAL	250 μ L	250 μ L	250 μ L	250 μ L

Determinación de glutatión total

El glutatión es el antioxidante endógeno de bajo peso molecular más importante y el tiol intracelular más abundante. Puede encontrarse en la forma de glutatión reducido (GSH) o en su forma oxidada (GSSG). Para la determinación del nivel total de glutatión se usaron los homogenados del nervio extraído con ácido sulfosalicílico añadido a una concentración final de 6 mg/mL. Se siguió la metodología planteada por Rahman y colaboradores (Rahman et al., 2006). La prueba se basó en la reacción del GSH con el 5,5'-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) para formar el cromóforo amarillo ácido 5'-tio-2-nitrobenzoico (TNB), el cual tiene una absorbancia máxima a 412 nm, y el aducto oxidado glutatión-TNB (GS-TNB). La velocidad de formación de TNB, medida a 412 nm, es proporcional a la concentración de GSH en la muestra. El producto disulfuro (GS-TNB) es entonces reducido por la enzima la glutatión reductasa (GR) en presencia de NADPH, reciclando el GSH de nuevo en la reacción ([Figura 12](#)). La tasa de cambio en la absorbancia ($\Delta A_{412} \text{ nm min}^{-1}$) se hace lineal para la conveniencia y consistencia de la medición y es linealmente proporcional a la concentración total de GSH. La concentración de una

muestra desconocida se determina calculando a partir de la ecuación lineal o de la curva de regresión generada a partir de varios estándares de GSH.

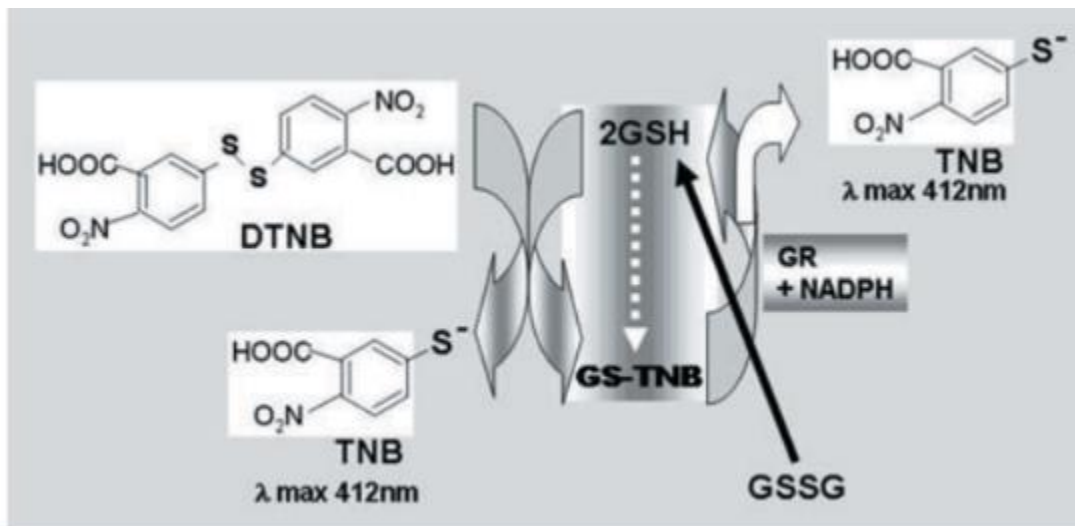


Figura 12. Principio químico de la metodología de reciclaje enzimático de GSH a partir de GSSG por glutatión reductasa. El GSH reacciona con el DTNB [ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico)] para formar TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzoico) y GS-TNB (aducto de glutatión del GSH). El GS-TNB se reduce entonces a GSH afín al GSSG por GR y NADPH (reciclado). El TNB formado puede cuantificarse a 412 nm. DTNB, 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico). Figura tomada de (Rahman et al., 2006).

Se prepararon inicialmente los estándares de GSH. Para esto, se usó una solución madre de GSH disolviendo 1 mg de GSH en 1 mL de KPE (Buffer fosfato de potasio 0,1M con sal disódica EDTA 5 mM, pH 7,5). Se hizo una dilución 1:100 con KPE para obtener una solución de trabajo de 10 µg/mL. Se tomaron 800 µl de la solución de trabajo con 200 µl de KPE para hacer la concentración estándar superior (26,4 µM) y luego hacer diluciones seriadas dobles para una serie de estándares con concentraciones más bajas y poder realizar una cinética de la velocidad de formación de TNB usando cada uno de los estándares.

Para la determinación de GSH, se usaron placas de 96 pozos, en las cuales se añadieron 20 μ l de KPE como blanco, 20 μ l de cada estándar y 20 μ l de la muestra de homogenado de nervio ciático. Se preparó DTNB (2 mg de DTNB en 3 ml de KPE) y GR (9 uL GR 500U en 3 mL de KPE). Se mezclaron volúmenes iguales de soluciones DTNB y GR recién preparadas y se añadieron 120 μ l a cada pocillo. Se dejaron transcurrir 30 s para la conversión de GSSG en GSH y, a continuación, se añadieron 60 μ l de solución de β -NADPH (2 mg de β -NADPH en 3 ml de KPE). Posteriormente se leyó la absorbancia a 412 nm en un lector de microplacas cada 30 s durante 2 min (5 lecturas en total de 0-120 s). Por último, se calculó la velocidad de formación del ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (cambio de absorbancia/min) y se determinó la concentración total real de GSH en las muestras utilizando la regresión lineal para calcular los valores obtenidos a partir de la curva patrón estándar. Los valores de concentración total de GSH se expresaron nmol/mg proteína.

Actividad de enzimas antioxidantes

Para la determinación de la actividad de las enzimas catalasa y SOD se usaron los homogenados de nervio ciático extraído preparados inicialmente.

Catalasa

La determinación de la actividad de la catalasa se llevó a cabo midiendo la degradación de H_2O_2 en el tiempo. La descomposición enzimática de H_2O_2 es una reacción de primer orden, cuya velocidad siempre es proporcional a la concentración de peróxido presente. El ensayo de determinación de catalasa es un ensayo riguroso debido a que la inactivación de la enzima se produce rápidamente (alrededor de 30 segundos) y una alta concentración del H_2O_2 puede provocar burbujas que introducen ruido en la determinación. Por lo anterior fue necesario utilizar H_2O_2 30

mM en el ensayo, una concentración relativamente baja (Aebi, 1984). La actividad de la catalasa se determinó a partir del cambio de la absorbancia debido a la descomposición del H₂O₂. Para este ensayo se tomaron 20 uL de los homogenados en dilución 1:5 con KPE y se mezclaron con 200 uL de H₂O₂ 30 mM (150 µL de H₂O₂ al 30% en 50 mL de buffer de fosfatos 10 mM) y se midió la absorbancia en una placa de 96 pozos transparente a ultravioleta. Se midió la reducción en la absorbancia a 240 nm en lector de microplacas (Varioskan LUX, ThermoFisher) con un bucle cinético de 3 mediciones a los 0, 15 y 30 seg. De acuerdo a Aebi, se usó la constante de reacción de primer orden (κ) como la unidad de actividad de la catalasa, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula (Aebi, 1984):

$$\kappa = (1/\Delta t)(2.3 \times \log [A_1]/[A_2])$$

Donde:

t = intervalo de tiempo medido

[A₁] y [A₂] son las absorbancias del H₂O₂ en los tiempos t₁ y t₂.

Para el intervalo de 30 seg se aplicó la fórmula:

$$k = 0.033 \times \ln [A_1]/[A_2]$$

Para el intervalo de 15 segundos se aplicó la siguiente fórmula:

$$k = 0.0667 \times \ln [A_1]/[A_2]$$

Finalmente se calculó la actividad específica al dividir el valor de k entre los mg de proteína adicionados al ensayo, obtenido previamente por el método de Bradford.

Superóxido dismutasa

La actividad de la SOD se mide por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por los aniones $O_2^{\bullet-}$ generados por el sistema de la xantina-xantina oxidasa (XOD). La oxidación de la xantina puede producir $O_2^{\bullet-}$ como se muestra en la [Figura 13](#).

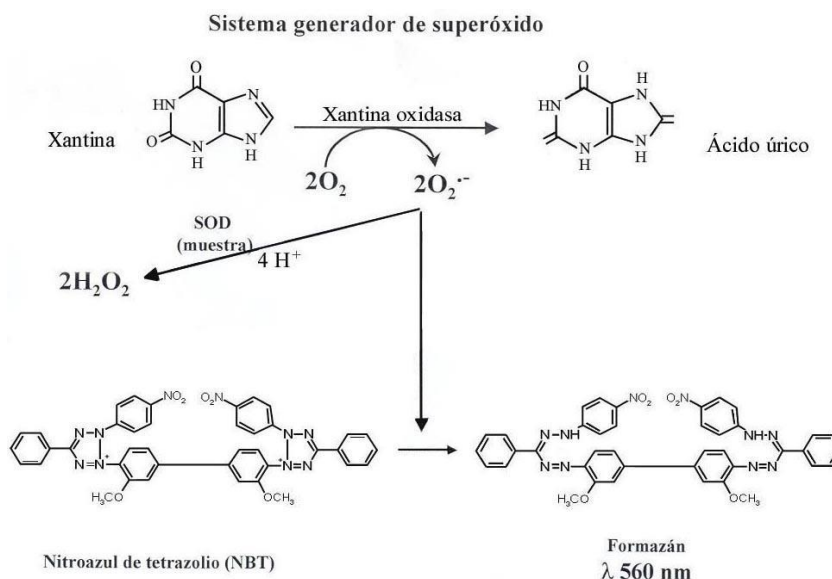


Figura 13. Sistema generador de superóxido a partir del sistema xantina-xantina oxidasa para la determinación de formazán a partir de NBT.

Para la determinación de la actividad SOD en los homogenados, se midió espectrofotométricamente a 560 nm el formazán resultante de la reducción del NBT por el $O_2^{\bullet-}$ generado; la SOD presente evitará y así disminuirá la formación de formazán (Oberley, 1984). Para esto se preparó una mezcla de reacción que contenía 5 mL de xantina (3 mM disuelta HEPES 5 mM), 1.5 mL de EDTA (0.6 mM), 450 uL de albúmina sérica bovina (ASB 0.1%), 1.5 mL de NBT (600 uM) y 900 uL de Na_2CO_3 (400 mM) a pH 10,2. La XOD se preparó tomando 10 uL de XOD 8400 U/L y diluyéndola a 80 uL en sulfato de amonio 2M. Con esto se obtiene una concentración de 1050 U/L para llevarse a una concentración final de 262,5 U/L, la cual fue la que

mejor actividad de la enzima presentó. Para la medición, se adicionaron en una placa de 96 pozos 166 μl de la mezcla de reacción + 33 μl de homogenado + 10 μl de XOD 262,5 U/L. En el caso del blanco, se cambió el homogenado por amortiguador de fosfatos y, en el caso del blanco de muestra, no se añadió XOD sino sulfato de amonio 2M. Se incubó a 27°C durante 15 min, posteriormente se agregaron 66 μl de CuCl_2 0.8 mM para detener la reacción y finalmente se leyó a 560 nm.

3.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en cada fase fueron expresados como el promedio \pm DE (desviación estándar) de las observaciones. El procesamiento de los datos para la fase 1 se realizó inicialmente analizando valores extremos, quitando valores atípicos y determinando la normalidad de los mismos por el test de Shapiro-Wilk. Los datos obtenidos para todas las pruebas fueron datos independientes, una vez determinada la normalidad, se hicieron análisis de comparación de los grupos DT vs CT por medio de prueba t no pareada para datos con distribución normal y Mann-Whitney no pareada para distribuciones no normales. Para las fases 2 y 3, se realizó el procesamiento de datos igualmente usando Shapiro-Wilk para determinar normalidad y se hizo la comparación entre los grupos por medio de análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por un test de comparaciones múltiples de Bonferroni para datos con distribución normal y Kruskal-Wallis para distribuciones no normales, teniendo en cuenta la búsqueda de la hipótesis alterna de que los grupos son diferentes y rechazando la hipótesis nula de que los datos son similares entre sí. La significancia estadística se determinó a valores $P \leq 0.05$.

4 Resultados

En una primera parte se muestran resultados de la validación del mejor modelo de daño por docetaxel, asegurando neuropatía periférica y neutropenia. Posteriormente se muestran los resultados obtenidos del tratamiento protector con dimetilfumarato contra el daño producido por docetaxel. Por último, los resultados obtenidos de las determinaciones realizadas con homogenado de nervio ciático extraído para el análisis de daño y protección.

4.1. Inducción conjunta de neuropatía periférica y neutropenia usando docetaxel

De los cuatro esquemas de tratamiento propuestos, se tuvo en cuenta, además de aquel donde se observaron en conjunto disminuciones significativas del conteo de neutrófilos y los umbrales nociceptivos en los grupos DT, comparados con los grupos CT, aquel que tuviera menor número de dosis, tiempo e intervenciones para el animal.

4.1.1. Toxicidad del docetaxel

La toxicidad del docetaxel fue visible durante todo el tratamiento representado por el comportamiento animal y los hábitos alimenticios y de convivencia. Los animales tratados con el medicamento (DT) mostraron una disminución significativa de peso a lo largo del tratamiento, el cual fue más evidente en los esquemas 3 y 4. Se realizó una prueba t comparando el grupo DT versus el grupo CT de cada esquema de administración, para determinar las diferencias significativas entre los datos. En la [Figura 14](#) se puede observar un diagrama de control de peso en cada día de tratamiento para los 4 esquemas. El diagrama muestra una diferenciación en el peso de los animales entre el grupo DT vs CT para cada uno de los tratamientos. En todos los

tratamientos se puede ver una disminución del peso corporal en los grupos DT, mientras que los grupos CT muestran un aumento normal. Los esquemas 1 y 2 mostraron diferencias significativas sólo hasta la finalización del tratamiento, mientras que los esquemas 3 y 4 mostraron diferencias significativas en la disminución del peso corporal desde la segunda y tercera dosis, respectivamente.

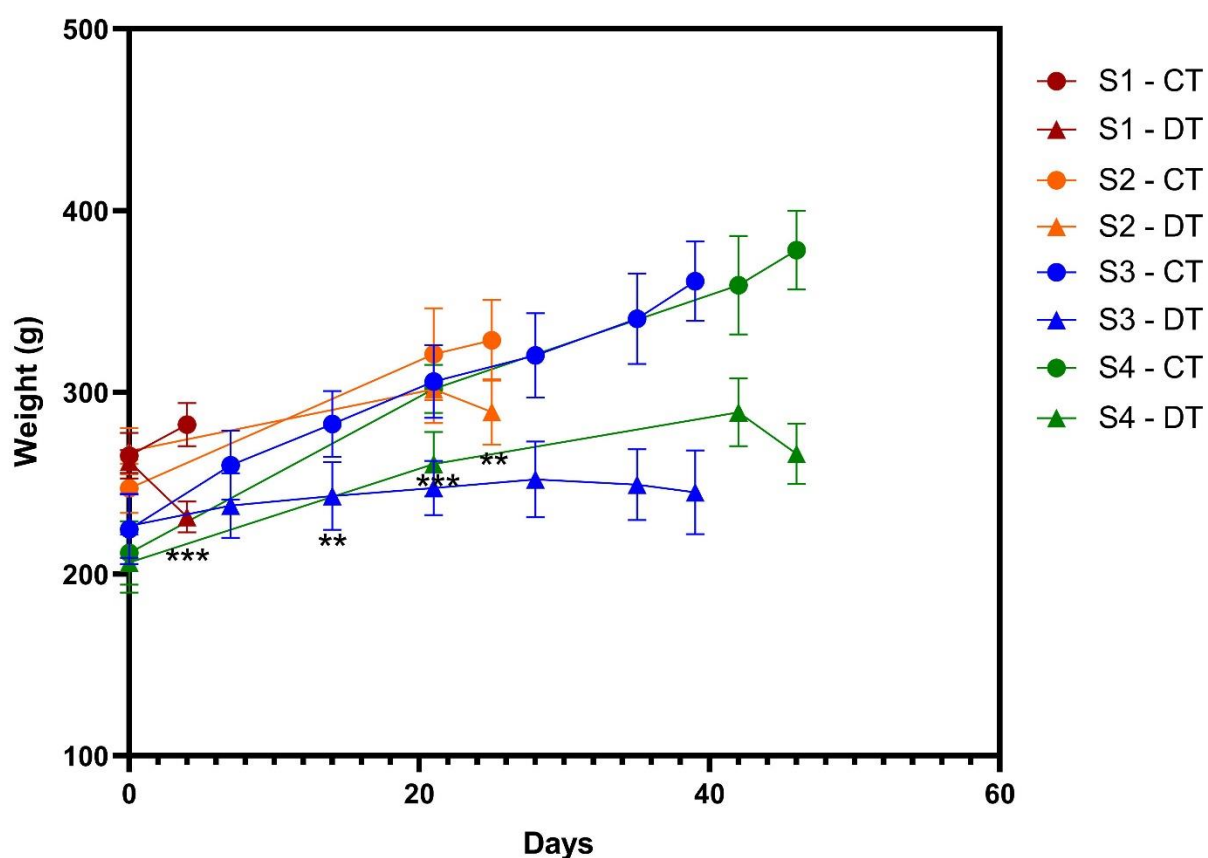


Figura 14. Cambio de peso corporal en ratas Wistar a lo largo del tratamiento con cuatro esquemas de administración de docetaxel para la inducción simultánea de neuropatía periférica y neutropenia. El peso corporal se midió en los días de administración de docetaxel para los esquemas 1 a 4 (S1, S2, S3 y S4) y el día de la eutanasia. DT: grupo docetaxel; CT: grupo control.

Los datos se expresan como media \pm SD y se analizaron mediante la prueba t, n = 8. **P<0.02, ***P<0.001 vs CT.

En la [Figura 15](#) se observa que los grupos tratados con docetaxel en cada esquema presentaron una disminución significativa del peso al final del tratamiento en comparación con los grupos CT, siendo evidente la influencia del medicamento en los hábitos alimenticios de los animales tratados. Adicional a estos datos, en la [Figura 16](#) se muestra una diferencia de ganancia o pérdida de peso al final del tratamiento para los grupos tratados (DT) y su control (CT). Se graficó usando el peso de las ratas al inicio del tratamiento (g) – el peso al final del tratamiento (g). En el esquema 1 se observa que el peso al final del tratamiento se ve reducido en el grupo DT por debajo de los valores iniciales. En los demás esquemas los valores no están por debajo del peso inicial; sin embargo, se ve una evidente diferencia en la ganancia de peso comparando los grupos DT y CT, mostrando al grupo DT muy por debajo del grupo CT, presentando diferencias significativas en todos los esquemas.

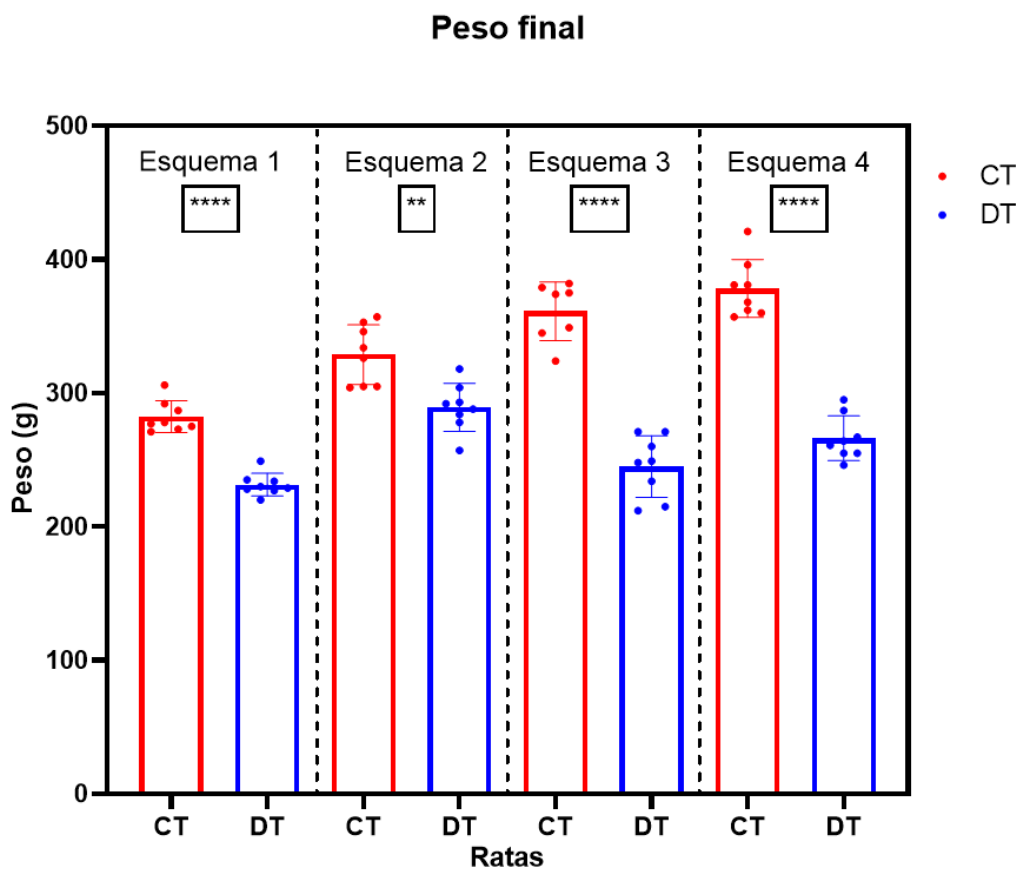


Figura 15. Comparación de peso final del grupo tratamiento (DT) con el grupo control (CT) al final de cada esquema de tratamiento. Los datos se expresan como media \pm DE y se analizaron mediante la prueba t con respecto a CT, n = 8. **P<0.02, ***P<0.001, ****P<0.0001 vs CT.

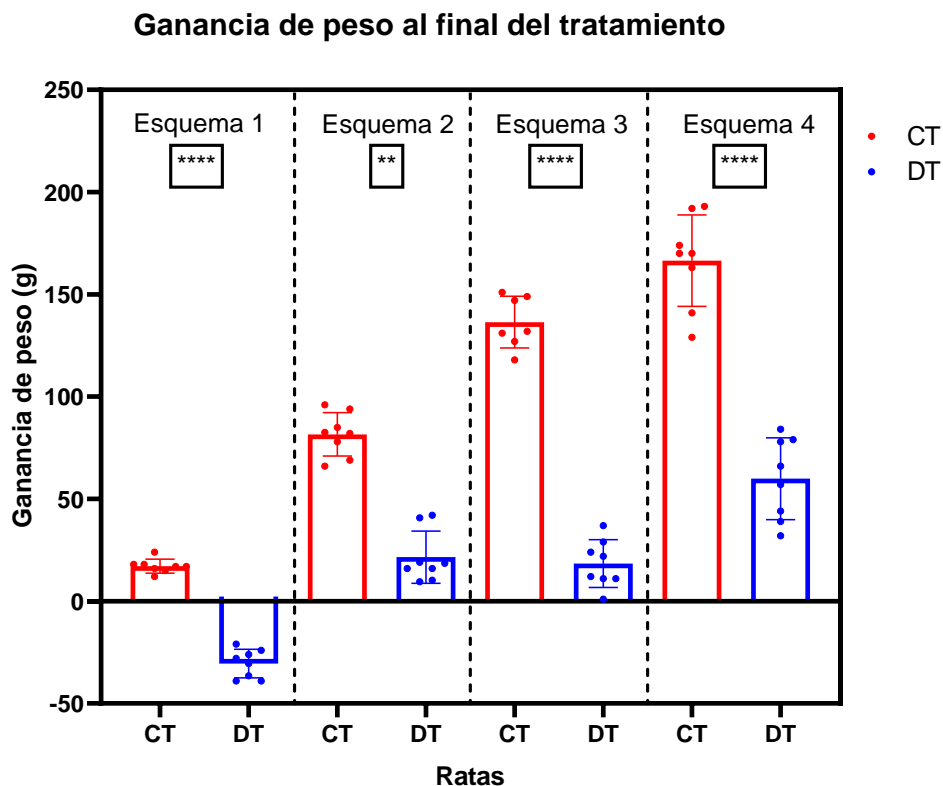


Figura 16. Ganancia o pérdida de peso del grupo tratamiento (DT) comparado con el grupo control (CT) al final de cada esquema de tratamiento. Los datos se expresan como media \pm DE y se analizaron mediante la prueba t con respecto a CT, n = 8. **P<0.02, ****P<0.0001 vs CT.

4.1.2. Neuropatía periférica

La neuropatía periférica fue evaluada 4 días después de la finalización de cada uno de los esquemas por medio de analgesímetros de presión en pata y cola y placa caliente. En la [Figura 17](#) se muestra el uso de los analgesímetros para las pruebas nociceptivas de presión en pata y cola y la prueba de placa caliente. Todas las pruebas fueron grabadas para confirmar los valores registrados por los analgesímetros al momento del experimento.



Figura 17. Uso de analgesímetros de presión y placa caliente.

Presión en pata

Los datos obtenidos para las pruebas comportamentales sensoriales de presión en pata para cada uno de los esquemas se muestran en la [Figura 18](#). Se realizó una prueba t para distribuciones normales o Mann-Whitney para distribuciones no normales, comparando el grupo DT versus el grupo CT, para observar diferencias significativas entre los datos. Los esquemas 1, 3 y 4 mostraron diferencias entre los grupos en la prueba de presión de la pata. El docetaxel indujo un aumento del umbral nociceptivo en el esquema 1 ($P < 0,05$ vs CT), contrario a lo observado en los demás esquemas. El umbral de dolor medio de las ratas del grupo DT en el esquema 3 fue casi un tercio el del grupo CT ($P < 0,0001$). A pesar de que la dosis total en el esquema 2 era el doble de la dosis en el esquema 1, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en el esquema 2.

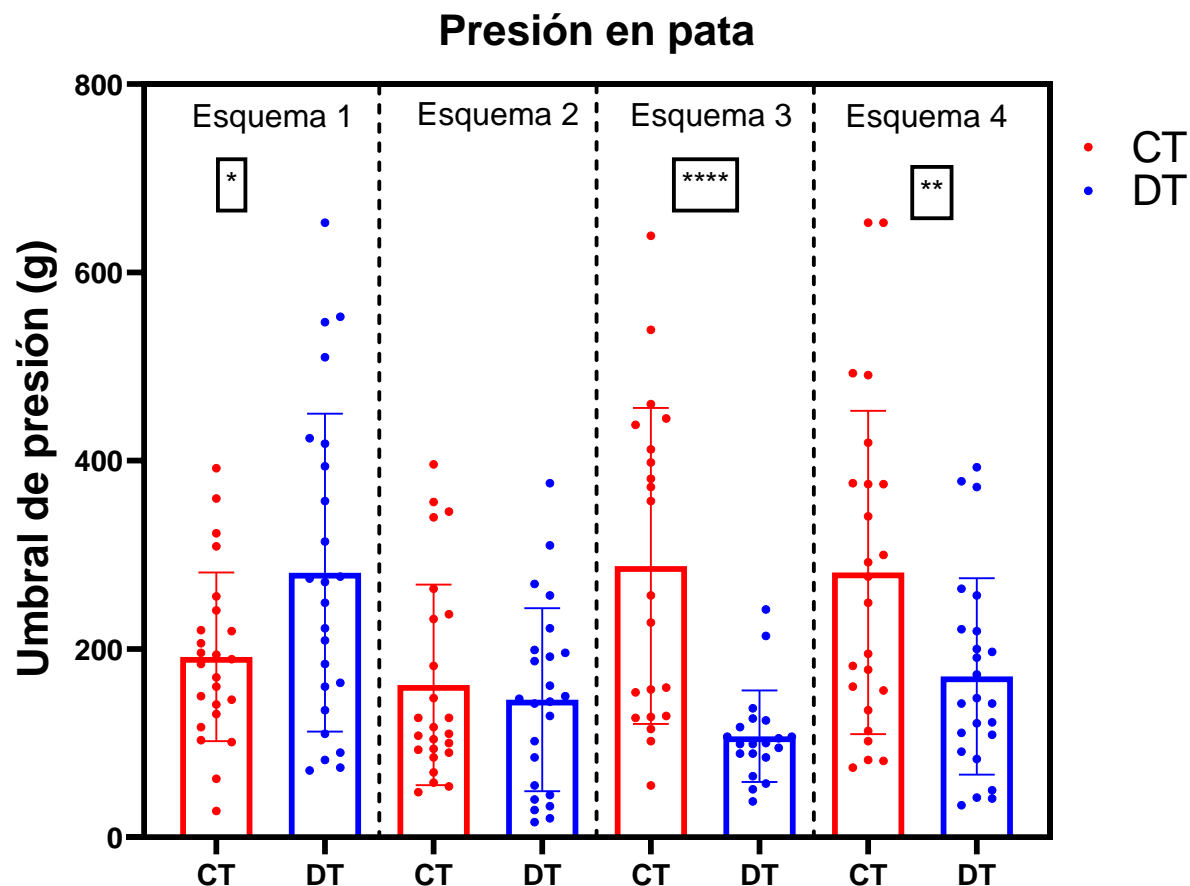


Figura 18. Valores del umbral de presión en pata (g) en ratas Wistar tratadas con docetaxel (DT) versus control (CT) para cada uno de los esquemas de administración. Los datos se expresan como media \pm DE y se analizaron mediante la prueba t con respecto a CT para los esquemas 1 y 4 (distribución normal) y Mann-Whitney para los esquemas 2 y 3 (distribución no normal), n = 8. *P<0.05, **P<0.02, ****P<0.0001 vs CT.

Presión en cola

En la prueba de presión en cola ([Figura 19](#)), se realizó un análisis de t-test comparando el grupo DT versus el grupo CT, para observar diferencias significativas entre los datos. El grupo DT de los esquemas 2, 3 y 4 presentó descensos significativos en los umbrales nociceptivos en

comparación con el grupo control. El esquema 1 no mostró diferencias entre grupos para esta prueba.

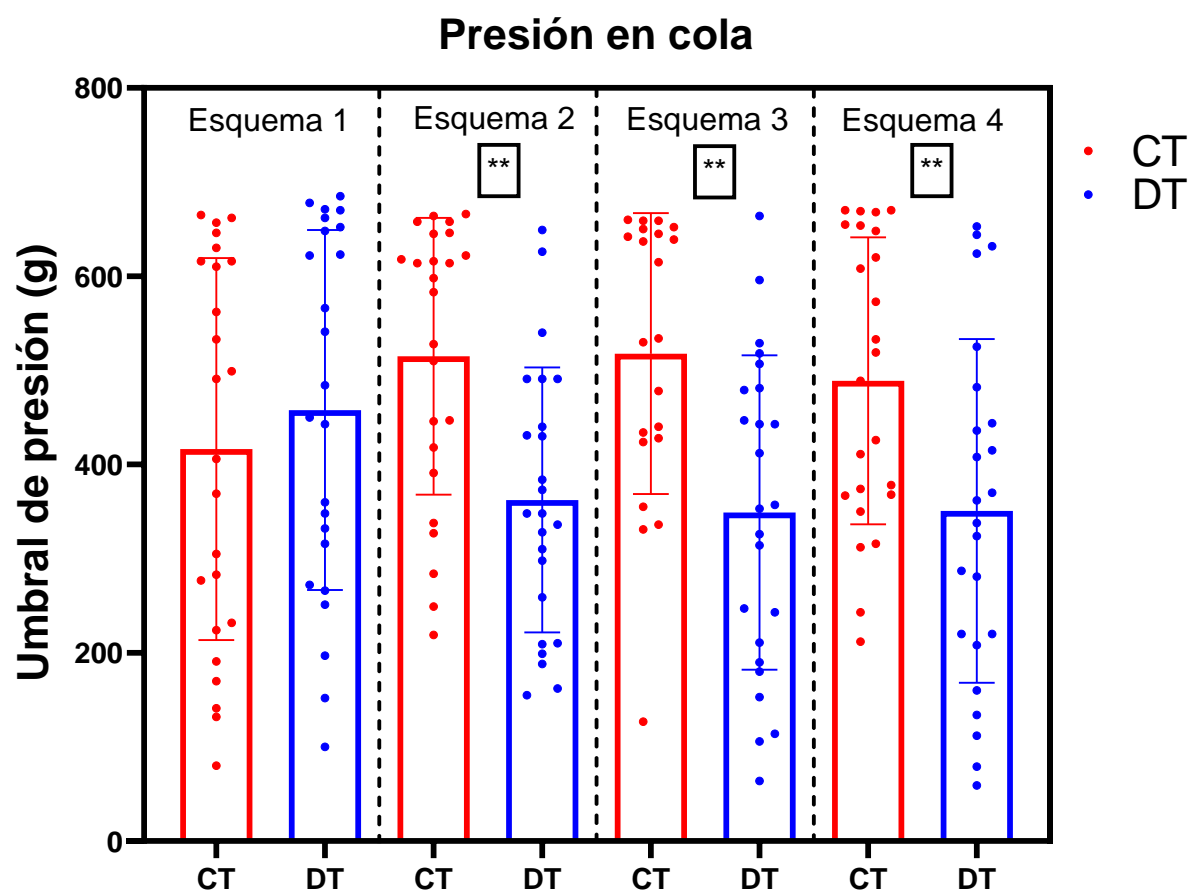


Figura 19. Valores del umbral de presión en cola (g) en ratas Wistar tratadas con docetaxel (DT) versus control (CT) para cada uno de los esquemas de administración. Los datos se expresan como media \pm DE y se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney con respecto a CT, n = 8. **P<0.02 vs CT.

Placa caliente

Para la prueba de placa caliente se realizó un análisis de t-test para los esquemas 1 y 4 y un análisis de Mann Whitney para los esquemas 2 y 3 (basados en las pruebas de normalidad), en ambos casos comparando el grupo DT versus el grupo CT, para observar diferencias significativas entre los datos en los 4 esquemas administrados. Sólo el esquema 4 mostró una alteración en la prueba de la placa caliente ([Figura 20](#), $P < 0,05$ vs CT). Sin embargo, esta alteración, al igual que en la prueba de presión en pata del esquema 1, tuvo una tendencia creciente en el umbral nociceptivo, lo que no es frecuente en este tipo de estudios. Ninguno de los tratamientos con docetaxel (esquemas 1-3) dio una respuesta significativa en comparación con el grupo CT en la prueba de la placa caliente ([Figura 20](#)). Únicamente el esquema 4 presentó diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratamiento.

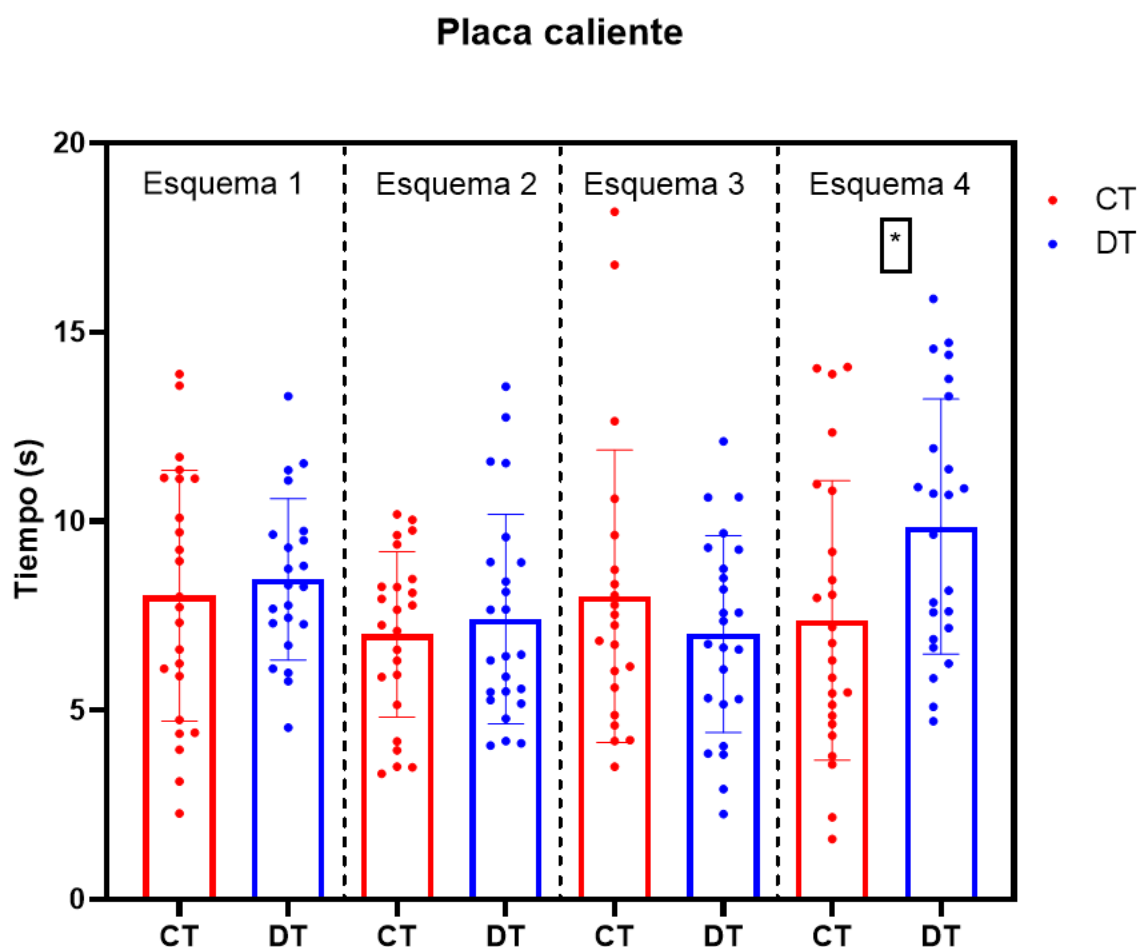


Figura 20. Valores de tiempo (s) de latencia en placa caliente ($50^{\circ}\text{C}\pm 0.1$) en ratas Wistar tratadas con docetaxel (DT) versus control (CT) para cada uno de los esquemas de administración. Los datos se expresan como media \pm DE y se analizaron mediante la prueba t con respecto a CT para los esquemas 1 y 4 (distribución normal) y Mann-Whitney para los esquemas 2 y 3 (distribución no normal), $n = 8$. * $P < 0.05$ vs CT.

4.1.3. Neutropenia.

Una vez finalizadas las pruebas nociceptivas, se llevó a cabo la eutanasia y se extrajo sangre para el recuento diferencial de neutrófilos y hemograma. Como se muestra en la [Figura 21](#), todos los esquemas de administración de docetaxel indujeron neutropenia ($< 1.0 \times 10^9$ neutrófilos /L), con descensos del recuento de neutrófilos del 49% para el esquema 1 ($P < 0,05$ vs CT), del 75% para el esquema 2 ($P < 0,0001$ vs CT), del 80% para el esquema 3 ($P < 0,001$ vs CT) y del 100% para el esquema 4 ($P < 0,001$ vs CT). Los esquemas 2, 3 y 4 mostraron una característica de neutropenia grave, esto es, recuentos $< 0,5 \times 10^9$ neutrófilos/L. Sin embargo, los recuentos de neutrófilos nulos o no detectables obtenidos en el esquema 4 lo convirtieron en un esquema poco atractivo experimentalmente para futuros ensayos.

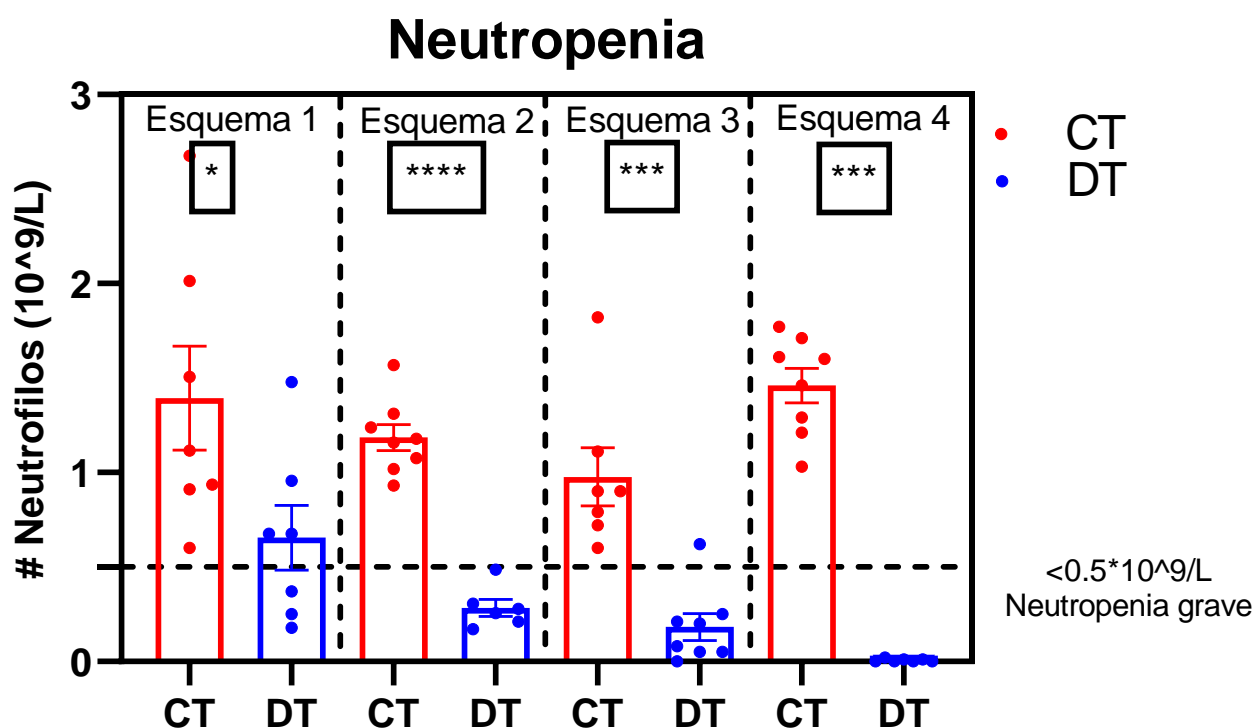


Figura 21. Recuento de neutrófilos en ratas de cuatro esquemas de administración de docetaxel para la inducción simultánea de neuropatía periférica y neutropenia. DT: grupo docetaxel; CT: grupo control. Los datos se expresan como media \pm DE y se analizaron mediante prueba t con respecto a CT, n = 8. *P<0.05, ***P<0.001, ****P<0.0001 vs CT.

Los resultados mostrados de neutropenia y ensayos nociceptivos, permitieron determinar que el esquema 3 fue el que reunió la mayoría de las características deseables para el modelo experimental de inducción simultánea. En primer lugar, se observaron disminuciones de los umbrales de presión de la pata y la cola (dos de las tres pruebas nociceptivas evaluadas) y de los recuentos de neutrófilos con buena significancia estadística, lo que valida y da confianza al modelo. Aunque el esquema 4 mostró características similares, el recuento indetectable de neutrófilos dificultaría la evaluación de posibles agentes mieloprotectores. Además, esta neutropenia grave con recuentos nulos de células en el esquema 4 no es el resultado clínico más observado. Los esquemas 1 y 2 sólo mostraron respuestas en una de las pruebas nociceptivas ejecutadas. Aunque el esquema 3 implica el mayor número de dosis durante un largo periodo, sus resultados demostraron que es el esquema más completo y fiable para evaluar potenciales quimioterapéuticos neuro y mieloprotectores. Los siguientes resultados se obtuvieron aplicando el esquema 3 como modelo de inducción simultánea de neurotoxicidad periférica y mielotoxicidad por docetaxel.

4.2. Tratamiento de protección con dimetilfumarato.

Se administró docetaxel en dosis de 5 mg/kg acorde a los resultados previos, junto con 100 mg/kg de dimetilfumarato en CMC (1%p/v).

4.2.1. Protección del dimetilfumarato frente a la toxicidad inducida por el docetaxel.

Inicialmente, el comportamiento animal y los hábitos alimenticios alterados en los animales, al igual que en la fase 1, sugirieron un efecto tóxico del docetaxel. Los animales del grupo DT mostraron una disminución significativa de peso a lo largo del tratamiento [Figura 22](#), junto con comportamientos de estrés, lo cual pudo repercutir en sus hábitos alimenticios. Algo similar se vio en el tratamiento conjunto de dimetilfumarato y docetaxel (DT+DF). Por otra parte, el grupo CT y DF no exhibieron una gran disminución de peso al final del tratamiento. En la [Figura 22](#) se observó que los grupos tratados con docetaxel (tanto el DT como DT+DF) presentaron una disminución significativa en cuanto al peso en comparación con los grupos control CT y DF desde la segunda dosis hasta el final del tratamiento ($P < 0.02$), lo cual indica que el dimetilfumarato por sí solo no muestra toxicidad alguna reflejada en la pérdida de peso, pero tampoco ayuda en gran medida a mejorar la toxicidad inducida por el docetaxel.

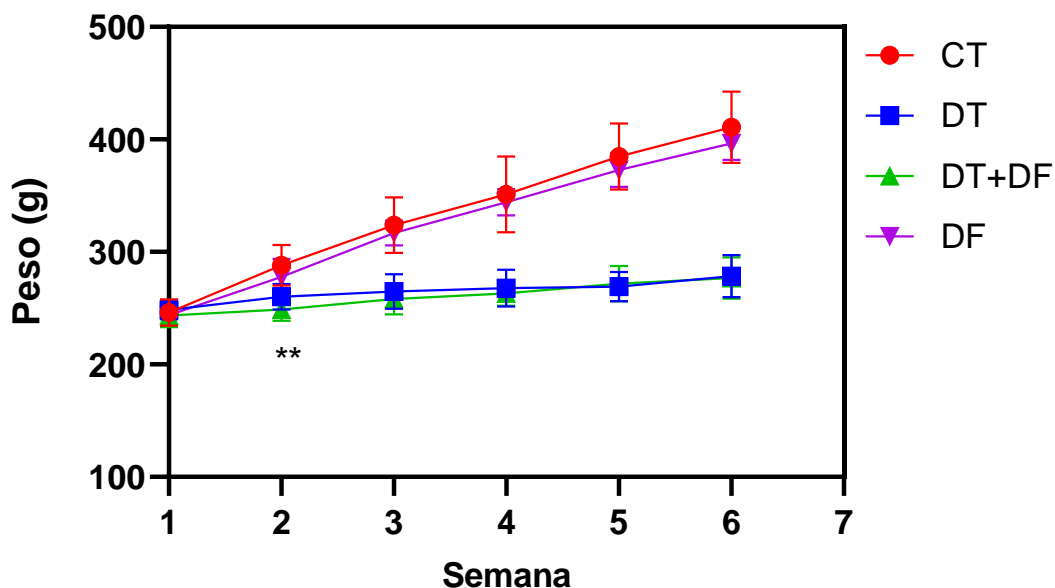


Figura 22. Cambio de peso corporal en ratas Wistar a lo largo del tratamiento con docetaxel y/o dimetilfumarato. El peso corporal se midió en los días de administración de docetaxel y dimetilfumarato conjuntamente (una vez a la semana) para cada uno de los grupos. CT: grupo control, DT: grupo docetaxel; DT+DF: grupo dimetilfumarato + docetaxel y DF: grupo de dimetilfumarato. Los datos se expresan como media \pm DE y se analizaron mediante ANOVA de una vía y prueba de Bonferroni, $n = 6$. ** $P < 0.02$ vs CT.

4.2.2. Neutropenia.

Se graficó el número de neutrófilos en sangre y se analizó por medio de ANOVA de una vía y la prueba de Bonferroni para análisis entre grupos ([Figura 23](#)). Se encontró significancia estadística en la comparación entre el grupo DT y el grupo CT ($P < 0,0001$), situando a DT con valores inferiores a los reportados en neutropenia grave, replicando los resultados obtenidos en la fase 1 para el esquema 3. Por otro lado, la comparación entre el grupo DT+DF vs DT no presentó

significancia alguna, a pesar de que se observa una aparente tendencia al aumento en el número de neutrófilos para el grupo DT+ DF (Figura 23). Lo anterior indica que el tratamiento con dimetilfumrato en la posología empleada no pudo revertir la neutropenia.

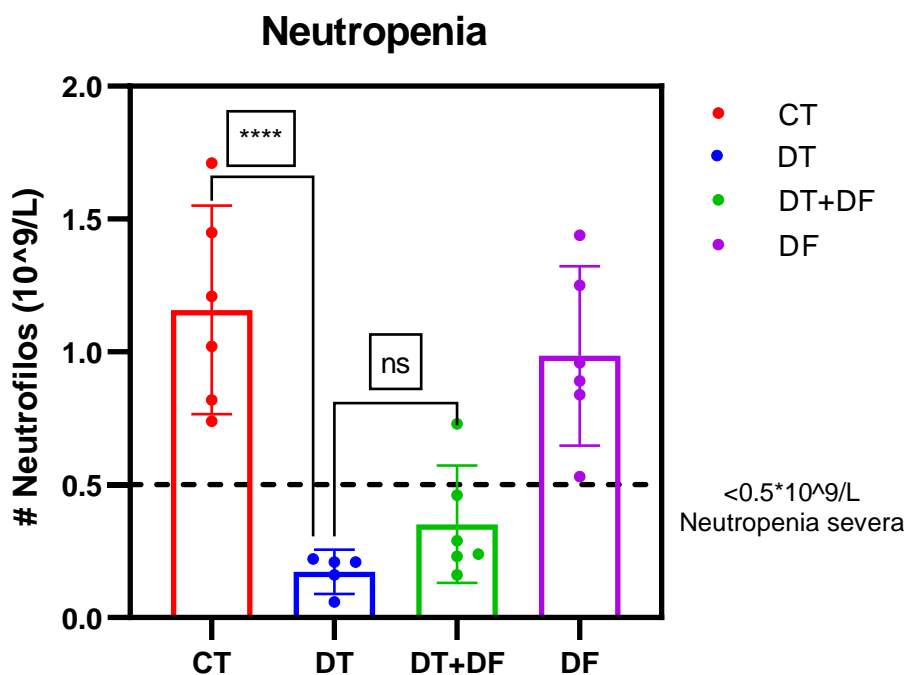


Figura 23. Conteo de neutrófilos en ratas Wistar tratadas con docetaxel y/o dimetilfumrato. Control (CT), docetaxel (DT), docetaxel + dimetilfumrato (DT+DF) y dimetilfumrato (DF). Los datos se expresan como media \pm DE comparados entre sí usando ANOVA de una vía y prueba de Bonferroni, $n = 6$. **** $P < 0.0001$ vs CT; ns: no significativo.

En la [Tabla 3](#) se muestran los datos restantes de los hemogramas para analizar los cambios en otros recuentos celulares para cada uno de los tratamientos. El grupo DT presentó recuentos disminuidos en glóbulos blancos (WBC, leucopenia) y glóbulos rojos (RBC, eritropenia) en

comparación con el grupo CT. De hecho, se observaron recuentos inferiores en todas las células sanguíneas excepto en los basófilos (#BAS). Además, los niveles de hemoglobina (HGB) también fueron inferiores con la administración de docetaxel. El tratamiento con dimetilfumarato no recuperó los valores normales ni atenuó estos descensos en ninguno de los casos, pero el tratamiento sólo con dimetilfumarato (grupo DF) tampoco afectó los recuentos en comparación con el control.

Tabla 3. Recuento de neutrófilos y hemograma completo en ratas Wistar tratadas con docetaxel y/o dimetilfumarato.

Test	Unidad	GRUPOS				Valores normales
		CT	DT	DT+DF	DF	
WBC	10 ⁹ /L	5.893±1.376	1.745±0.384 ****	2.775±0.954	5.548± 2.051	1.96 – 8.25
#NEU	10 ⁹ /L	1.158±0.374	0.210± 0.111 ****	0.352±0.211	0.985±0.321	0.22 - 1.57
#LYM	10 ⁹ /L	4.328±1.133	1.438±0.293 ***	2.302±0.751	4.152±1.607	1.41 – 7.11
#MON	10 ⁹ /L	0.362±0.031	0.077±0.051 ****	0.097±0.056	0.367±0.166	0.03 - 0.18
#EOS	10 ⁹ /L	0.038±0.010	0.015±0.005 **	0.018±0.008	0.037±0.014	0.01 -0.16

#BAS	10 ⁹ /L	0.007± 0.005	0.005±0.005	0.007 ±0.005	0.008±0.004	0 - 0.005
RBC	10 ¹² /L	7.808± 0.326	4.518± 0.546 ****	5.010 ±0.378	7.225±0.437	7.27 – 9.65
HGB	g/dL	16.150±0.57 2	10.772± 1.024****	11.850 ±0.635	15.100±0.90 1	13,7 – 17.6

Nota: WBC: recuento de glóbulos blancos; #NEU: recuento de neutrófilos; #LYM: recuento de linfocitos; #MON: recuento de monocitos; #EOS: recuento de eosinófilos; #BAS: recuento de basófilos; RBC: recuento de glóbulos rojos; HGB: hemoglobina; CT: grupo control; DT: grupo docetaxel; DT+DF: grupo coadministrado; DF: grupo dimetilfumarato. Los datos se expresan como media ±DE y se analizaron con ANOVA de una vía seguido de pruebas de comparación múltiple de Bonferroni, n = 6. **P<0.02, ****P<0.0001 vs CT. Los valores normales se obtuvieron a partir de (León Goñi et al., 2011).

4.2.3. Química sanguínea.

Se realizaron las pruebas de actividad de CK-MB, AST, ALT, ALP y determinación de creatinina y urea usando plasma sanguíneo de las ratas bajo estudio. En la [Tabla 4](#) se muestran los parámetros bioquímicos obtenidos en el estudio para cada uno de los grupos de tratamiento, junto con los valores normales encontrados en literatura para cada una de las pruebas realizadas. Se encontraron disminuciones significativas en el nivel de creatinina y en las actividades de ALP, AST y ALT del grupo DT con respecto al grupo CT, así como en las actividades de ALP, ALT y CK-MB del grupo DF vs CT. Las demás comparaciones entre grupos no presentaron diferencias significativas.

Tabla 4. Marcadores plasmáticos de toxicidad en ratas Wistar tratadas con docetaxel y/o dimetilfumarato.

Test	Unidad	GRUPO				Valores normales
		CT	DT	DT+DF	DF	
Crea	mg/dL	0.733±0.142	0.568±0.041*	0.528±0.030	0.757±0.101	0.46 – 0.88
ALP	U/L	78.670±19.512	28.711±2.669***	29.592±4.751	55.211±8.620++	85.4 – 311.7
AST	U/L	75.613±18.870	50.940±9.319*	62.496±14.107	69.851±32.688	65.8 – 266.2
ALT	U/L	29.682±6.569	19.337±3928*	20.679±5.096	20.341±5.369+	26.3 – 68.5
Urea	mg/dL	31.899±7.722	30.411±6.424	29.620±6.996	36.139±8.608	19,62 – 23,02
CK-MB	U/L	2473.161±815.85	1989.088±784.76	1741.884±435.27	1394.350±449.37++	233 – 4367

Nota. La tabla muestra los promedios de los valores encontrados de los parámetros bioquímicos para cada uno de los grupos: Control (CT), Docetaxel (DT), Docetaxel + dimetilfumarato (DT+DF) y dimetilfumarato (DF) comparados; relacionados con valores normales encontrados en la literatura para ratas Wistar macho. Crea: creatinina; ALP: fosfatasa alcalina; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; CK-MB: creatina cinasa; CT: grupo control; DT: grupo docetaxel; DT+DF: grupo coadministrado; DF: grupo dimetil fumarato. Los datos se expresan como media ±DE y se analizaron con ANOVA de una vía seguido de pruebas de comparación múltiple de Bonferroni, n = 8. *P<0.05, ***P<0.001 vs CT; +P<0.05, ++P<0.02 vs CT. Los valores normales se obtuvieron a partir de (León Goñi et al., 2011).

4.3.Pruebas nociceptivas.

Se realizaron pruebas nociceptivas de presión en pata y cola y prueba de placa caliente como se muestra en la [Figura 17](#) para los 4 grupos del modelo experimental (CT, DT, DT+DF y DF), tomando datos por triplicado.

4.3.1. Presión en pata.

Los valores de presión en pata para los grupos tratados no presentaron normalidad debido a su dispersión. Se realizó análisis entre grupos usando Kruskal-Wallis. Los grupos mostraron replicación en el modelo obtenido de daño de acuerdo a lo obtenido en la fase 1, presentando una disminución significativa para el grupo DT comparado con el CT ($P < 0.0001$), como se puede observar en la [Figura 24](#). Se presentó disminución para los dos grupos tratados con docetaxel en comparación con el grupo control. Sin embargo, el grupo de tratamiento conjunto de docetaxel con dimetilfumurato (DT+DF) presentó diferencias significativas comparado con el grupo DT ($P = 0.0188$), mostrando un aumento significativo en la resistencia a la presión. Por su parte, el grupo DF se mantuvo en valores similares a los valores del grupo CT.

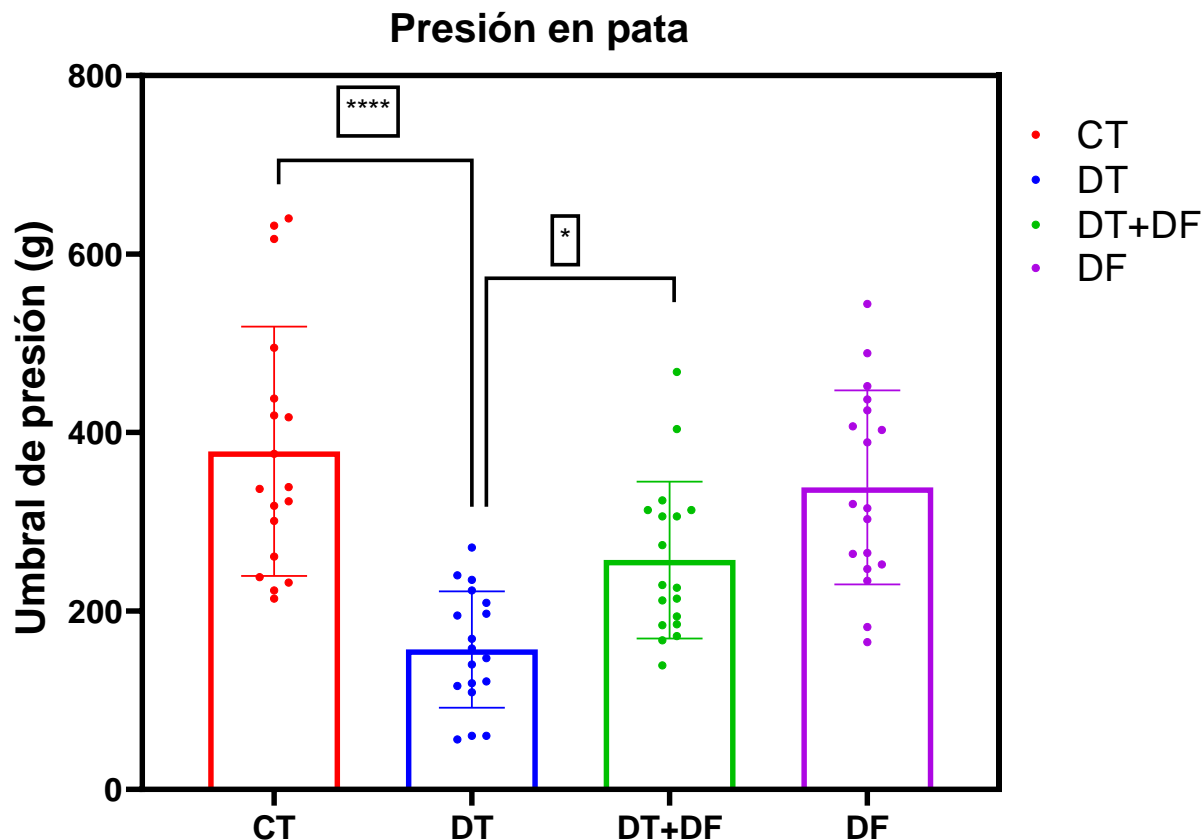


Figura 24. Valores de umbral de presión en pata (g) en ratas Wistar tratadas con docetaxel y/o dimetilfumarato. Los datos se expresan como media \pm DE comparados entre sí usando Kruskal-Wallis, $n = 6$. Control (CT), docetaxel (DT), docetaxel + dimetilfumarato (DT+DF), dimetilfumarato (DF). **** $P < 0.0001$ vs CT; * $P < 0.05$ vs DT.

4.3.2. Presión en cola

Los valores de presión en cola para los grupos tratados no presentaron normalidad debido a su dispersión. Se hizo un análisis entre grupos usando Kruskal-Wallis. Los datos mostraron replicación en el modelo obtenido de daño de acuerdo a lo obtenido en la fase 1, presentando una disminución significativa para el grupo DT comparado con el CT ($P = 0.0005$), como se puede

observar en la Figura 25. No se observó disminución para el grupo de tratamiento conjunto de docetaxel con dimetilfumarato (DT+DF) comparado con el grupo control. Por otro lado, la comparación entre DT+DF con el grupo DT presentó diferencias significativas con un valor de $P = 0.0099$, mostrando un aumento significativo en la resistencia a la presión. Por su parte, el grupo DF se mantuvo en valores similares a los valores del grupo CT.

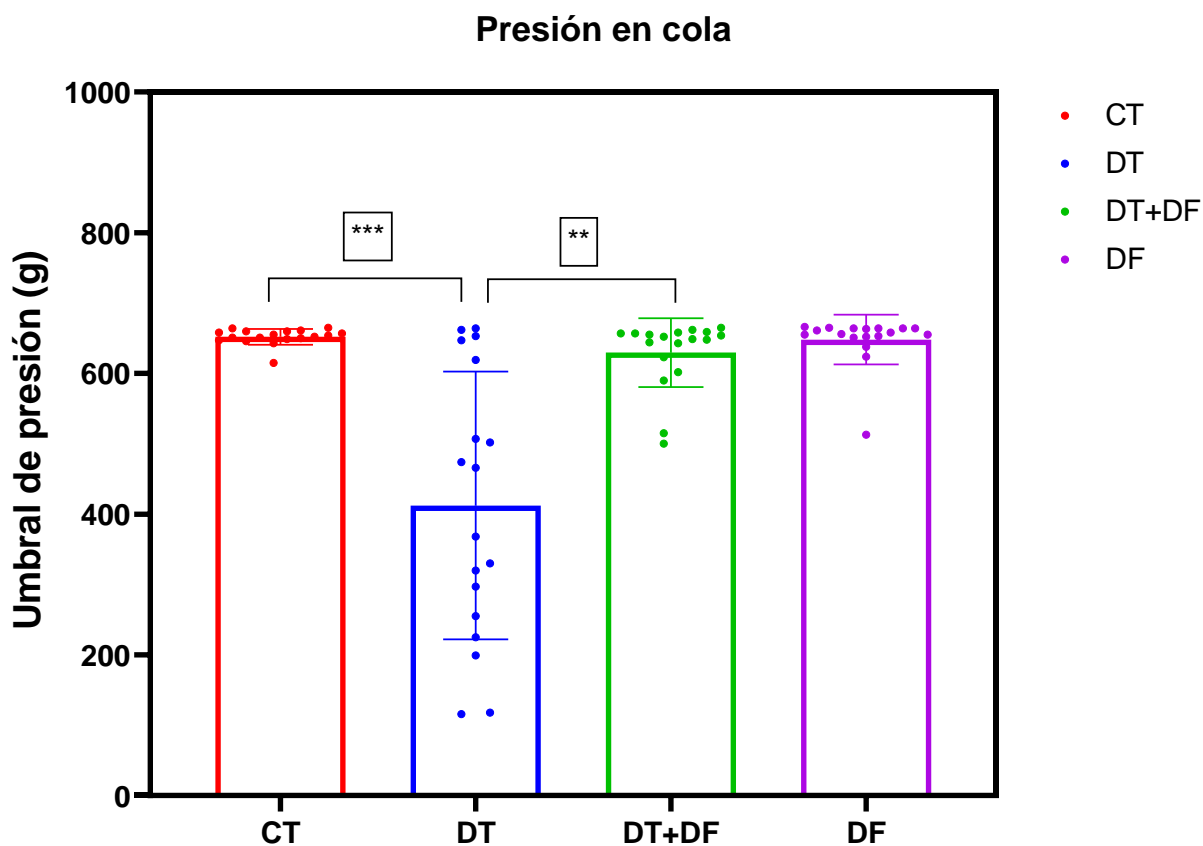


Figura 25. Valores de umbral presión en cola (g) en ratas Wistar tratadas con docetaxel y/o dimetilfumarato. Se realizó un análisis de comparación entre grupos usando Kruskal-Wallis, $n = 6$. Control (CT), docetaxel (DT), docetaxel + dimetilfumarato (DT+DF), dimetilfumarato (DF). *** $P < 0.001$ vs CT; ** $P < 0.02$ vs DT.

4.3.3. Placa caliente.

Los valores promedios de tiempo de latencia sobre la placa caliente obtenidos para el grupo CT fue de 13.557, para el grupo DT de 17.546, para el grupo DT+DF de 16.614 y para el grupo DF de 14.881. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la comparación entre grupos ([Figura 26](#)).

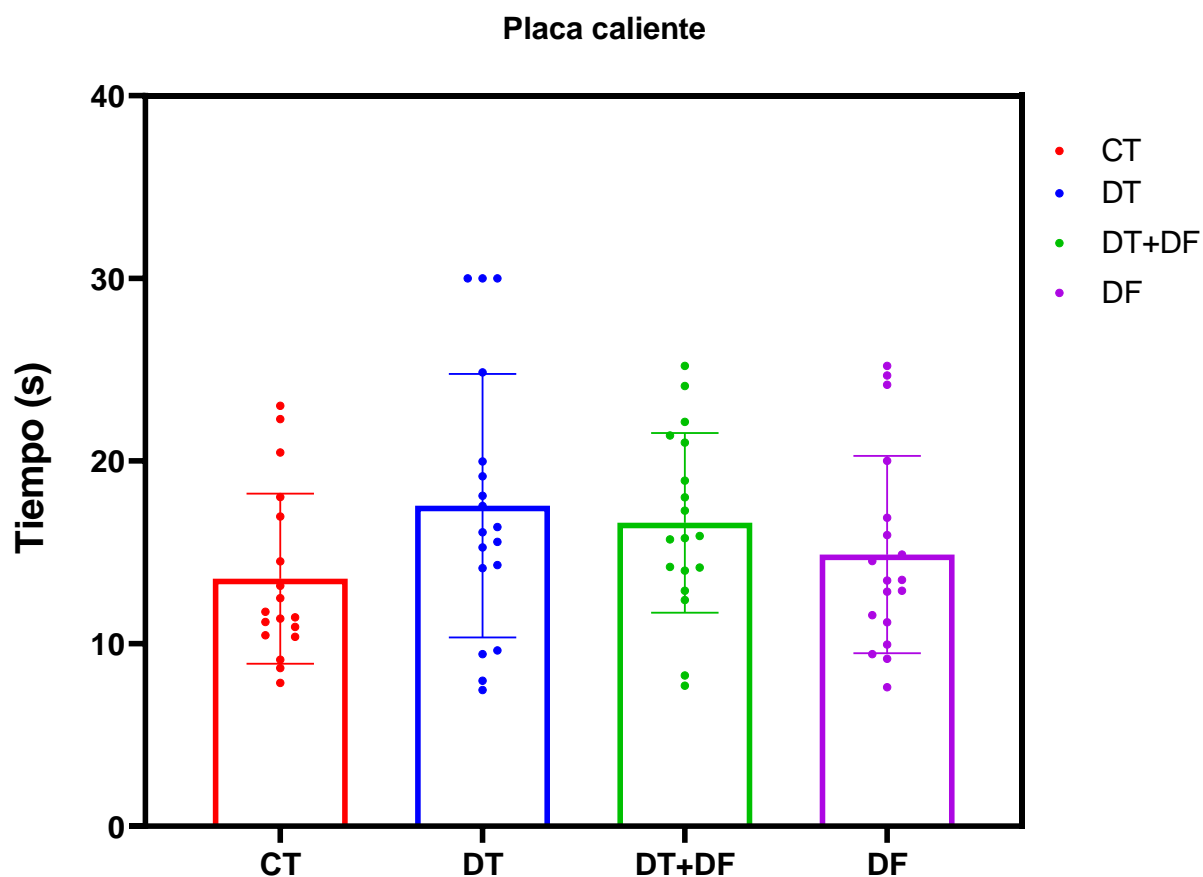


Figura 26. Valores de tiempo (s) de latencia en placa caliente ($50^{\circ}\text{C}\pm 0.1$) en ratas Wistar tratadas con docetaxel y/o dimetilfumarato. Se realizó un análisis de comparación entre grupos usando el Kruskal-Wallis. Control (CT), docetaxel (DT), docetaxel + dimetilfumarato (DT+DF), dimetilfumarato (DF).

4.4. Determinación de proteínas y marcadores de estrés oxidante.

Las determinaciones de marcadores de estrés oxidante fueron realizadas usando los homogenados de nervios ciáticos extraídos de cada una de las ratas de los diferentes grupos (un homogenado por animal). El volumen promedio de los homogenados obtenidos fue de 500 uL.

A todos los homogenados se les realizó determinación de niveles de proteínas totales por medio de la técnica de Bradford, usando ASB para la curva estándar [Figura 27](#), con concentraciones que van de 0-3 mg/mL. La proteína total en mg/mL obtenida para cada homogenado se observa en la [Tabla 5](#).

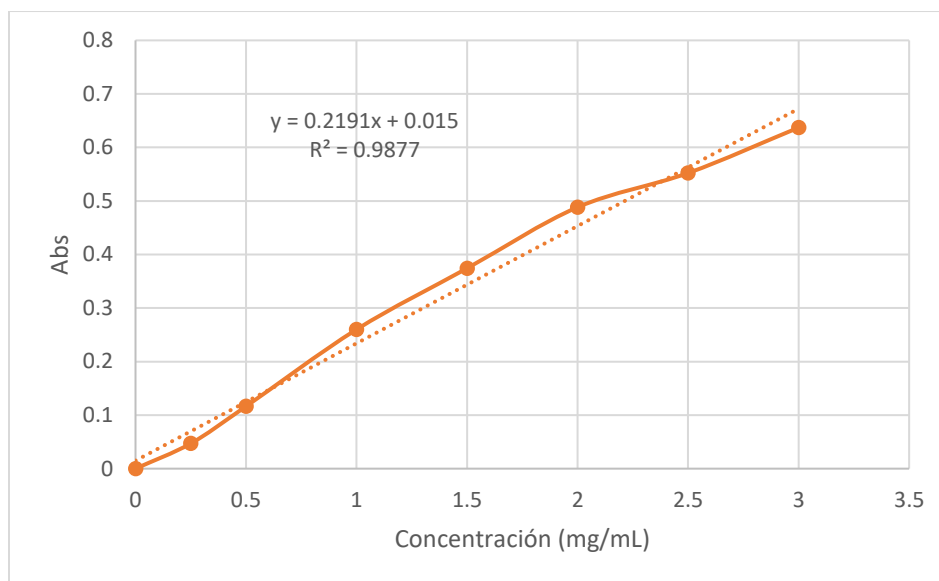


Figura 27. Curva de calibración estándar de albumina sérica bovina (ASB) para la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.

Tabla 5. Concentración de proteínas totales obtenidas por el método de Bradford.

Concentración de proteínas total (mg/mL)			
CT	DT	DT-DF	DF

RATA	Proteína	RATA	Proteína	RATA	Proteína	RATA	Proteína
R1	2.331	R2	2.213	R3	2.213	R4	1.938
R5	2.662	R6	2.878	R7	2.469	R8	2.126
R9	3.026	R10	2.560	R11	2.491	R12	3.308
R13	2.317	R14	2.780	R15	2.734	R16	2.500
R17	2.918	R18	2.591	R19	2.947	R20	1.783
R21	3.255	R22	2.359	R23	2.922	R24	3.284

Nota. Datos de concentración de proteínas totales obtenido por el método de Bradford para el tratamiento con docetaxel y/o dimetilfumarato en cada uno de los grupos, n=6. CT: control, DT: docetaxel, DT+DF: docetaxel + dimetilfumarato, DF: dimetilfumarato.

Tabla 6. Resultados de pruebas para marcadores de estrés oxidante en homogenados de nervio ciático de ratas Wistar tratadas con docetaxel y/o dimetilfumarato.

GRUPO	MDA	GSH total	Actividad catalasa			Actividad SOD
	nmol/mg proteína	nmol/mg proteína	k (0-15)	k (15-30)	k (0-30)	U/mg proteína
CT	1.139 ± 0.713	0.301 ± 0.186	0.00181 ± 0.0012	0.00140 ± 0.0007	0.00159 ± 0.0005	7.817 ± 5.267
DT	1.059 ± 0.626	0.370 ± 0.123	0.00219 ± 0.0017	0.00131 ± 0.0010	0.00173 ± 0.0010	11.546 ± 6.842
DT+DF	1.108 ± 0.451	0.340 ± 0.067	0.00164 ± 0.0015	0.00223 ± 0.0014	0.00191 ± 0.0010	9.307 ± 3.677
DF	0.510 ± 0.459	0.413 ± 0.122	0.00340 ± 0.0017	0.00214 ± 0.0005	0.00274 ± 0.0009	13.099 ± 7.993

Nota. Resultados promedio ± DE de pruebas de marcadores de estrés oxidante, n = 6 por grupo. Se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de comparación múltiple de Bonferroni. CT: control, DT: docetaxel, DT+DF: docetaxel + dimetilfumarato, DF: dimetilfumarato. MDA: malondialdehído, SOD: superóxido dismutasa, GSH: glutatión total.

4.4.1. Peroxidación lipídica

Se determinó la cantidad de MDA para determinar peroxidación lipídica en cada uno de las muestras de homogenado. Se realizó una curva de TMPO con un rango de concentraciones entre 0 y 23 μ M como se vio en la [Tabla 1](#), la cual se usó para determinar la concentración de MDA en los homogenados ([Figura 28](#)).

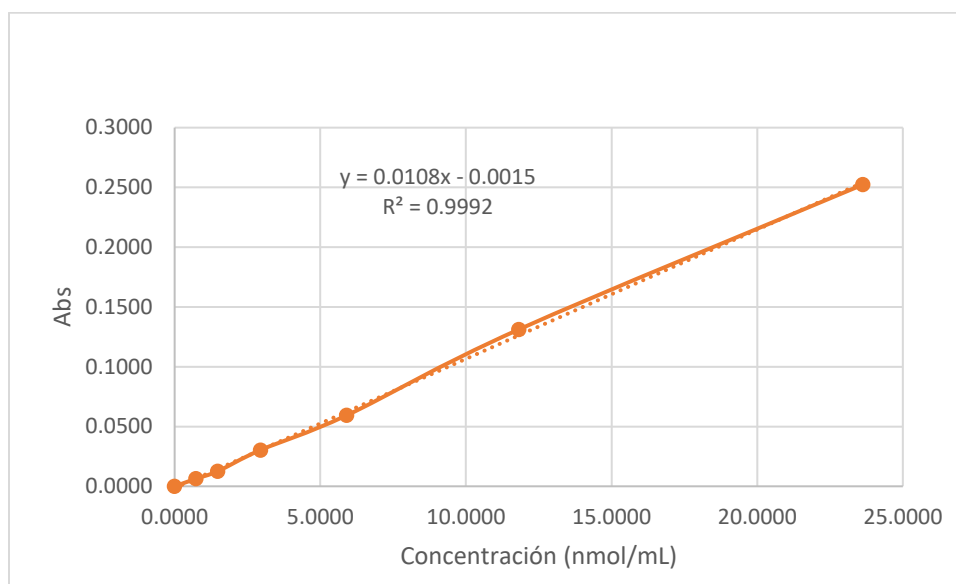


Figura 28. Curva de calibración estándar de TMPO para la determinación de malondialdehído en homogenados de nervio ciático de ratas Wistar tratadas con docetaxel y/o dimetilfumarato.

Los valores de MDA obtenidos para los homogenados se observan en la [Tabla 6](#). Los datos mantuvieron valores similares entre los grupos, con una aparente disminución en el grupo DF en comparación con los demás grupos. Se realizaron análisis usando ANOVA de una vía y comparando entre grupos con la prueba de Bonferroni. Los datos no muestran diferencias significativas entre los grupos CT vs DT ($P > 0.9999$) ni en DT vs DT+DF, ($P > 0.9999$). Por otro lado, el grupo DF tampoco presenta diferencias significativas comparado con el grupo DT+DF ($P = 0.5935$).

4.4.2. GSH total

Se realizaron curvas de velocidad (absorbancia vs tiempo) para cada uno de los estándares de E1 (26.4 μM) a E8 (0.206 μM) ([Figura 29](#)), de las cuales se tomaron las pendientes de los

estándares con tendencia completamente lineal para elaborar una curva de calibración (pendiente de la curva de velocidad vs concentración de cada estándar) ([Figura 30](#)). Con esta última, se determinó la concentración de GSH total en cada una de las muestras, asociando los valores de velocidad a la concentración de cada uno de los estándares. Los valores obtenidos de concentración de GSH total en mg de proteína se muestran en la [Tabla 6](#). Los datos muestran una similitud entre los grupos en cuanto a la cantidad de GSH total. Se realizó un análisis de comparación entre grupos usando Kruskal-Wallis, ya que no se observó normalidad en los datos obtenidos. Los datos no muestran diferencias significativas entre los grupos CT vs DT ($P > 0.9999$) ni en DT vs DT+DF, ($P > 0.9999$). Tampoco se presentaron diferencias en la comparación del grupo DF con DT+DF ($P > 0.9999$).

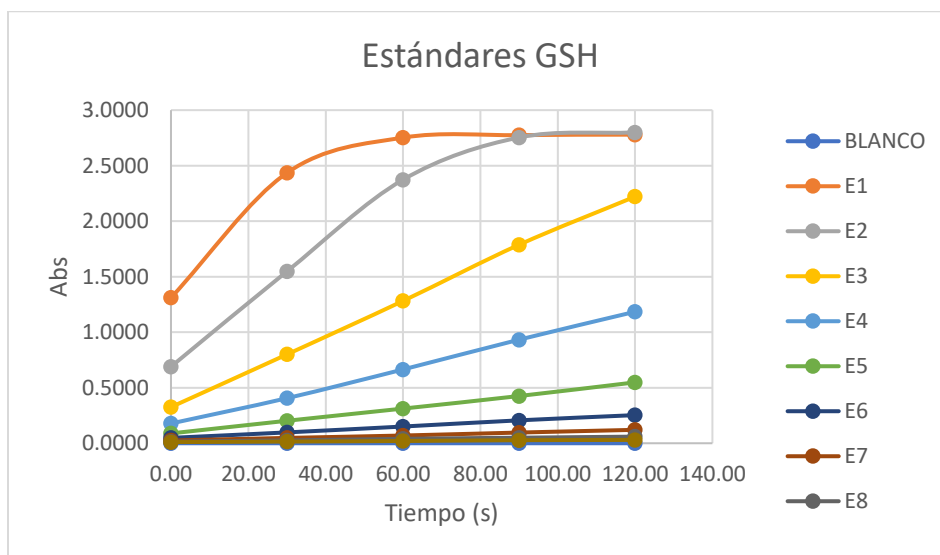


Figura 29. Curvas de velocidad para los estándares de GSH.

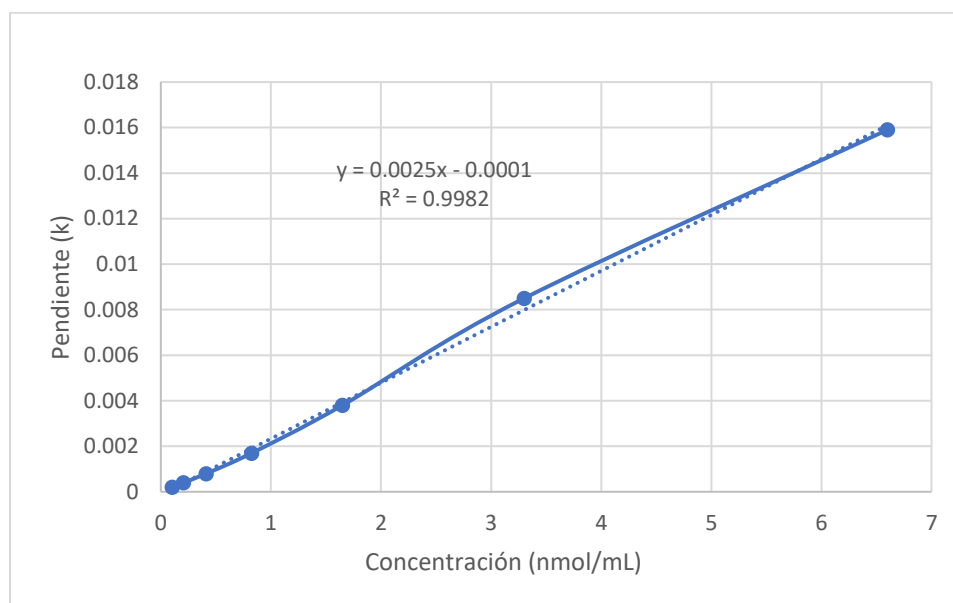


Figura 30. Curva de concentración de estándares de GSH vs pendiente (velocidad k).

4.4.3. Catalasa

Se calculó la actividad específica usando la fórmula mencionada anteriormente y posteriormente dividiendo el valor de k entre los mg de proteína adicionados al ensayo (obtenidos previamente por Bradford, [Tabla 5](#)). Para obtener la cantidad de proteína en el ensayo se dividió entre 30, valor resultado de la cantidad de muestra en el volumen total del ensayo (1.5 mL de volumen total / 0.05 mL de muestra aplicados al ensayo). Los valores de la actividad de catalasa se observan en la [Tabla 6](#). Se tuvo en cuenta el valor de k_1 debido a que es el primer rango de diferencia entre absorbancias, por lo tanto, es el rango en el que se observa mejor la actividad de la catalasa, debido a su poco tiempo de actividad. Los datos obtenidos muestran valores similares entre los grupos, siendo el grupo DF el que presenta mayor valor; sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la comparación del grupo CT vs DT ($P = 0.9910$) ni en DT vs DT+DF ($P > 0.9999$). Tampoco se encontró diferencia entre el grupo DF vs DT+DF ($P > 0.9999$). Todos

los análisis se hicieron por medio de ANOVA de una vía y comparación entre grupos por el método de Bonferroni.

4.4.4. Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la SOD se midió por la capacidad de esta enzima (proveniente de los homogenados de nervio ciático) de inhibir la reducción del azul de NBT por los aniones superóxido generados por el sistema de la xantina-xantina oxidasa. Para el análisis de los resultados fue necesario usar un control positivo, donde se observó el 100% de reducción del NBT a formazán, para poder aplicar la fórmula:

$$U = (100\% - X) / (0.5)100\%$$

Donde X= absorbancia de la muestra (homogenado) – blanco de muestra, y el 100% corresponde al valor de la absorbancia del 100% de reducción del NBT.

El valor de U fue posteriormente dividido en los miligramos de proteína utilizados en el ensayo, los cuales dieron valores que se pueden observar en la [Tabla 6](#). Se realizó un análisis ANOVA de una vía y haciendo la comparación con el test de Bonferroni. Los datos no muestran diferencias significativas entre los grupos CT vs DT ($P > 0.9999$) ni en DT vs DT+DF ($P > 0.9999$). Tampoco se observaron diferencias significativas en la comparación entre DF vs DT+DF ($P = 0.8684$).

5 Discusión

El tratamiento con docetaxel, como era de esperarse, mostró toxicidad asociada, la cual inicialmente se vio reflejada en el control de peso de los animales en todos los esquemas de tratamiento, observándose diferencias significativas para todos los esquemas en los grupos tratados con docetaxel (DT), en comparación con los no tratados (CT) (Figuras 15 y 16). El tratamiento con docetaxel mostró toxicidad independiente del número de dosis y tiempo de tratamiento, como se pudo evidenciar desde una única dosis (esquema 1), hasta el esquema de seis dosis (esquema 3), como reportaron previamente Branda y colaboradores (Branda et al., 2006) y Kim y colaboradores (Kim et al., 2018). La toxicidad del docetaxel expresada como neutropenia se ha reportado con anterioridad (Frederiks et al., 2015) y se han propuesto modelos de rata para estudiarla (Branda et al., 2006; Tonra et al., 2020). Todos los esquemas establecidos en este trabajo presentaron disminuciones significativas en el número de neutrófilos debido al tratamiento con docetaxel en comparación con el control ([Figura 21](#)). Sin embargo, los esquemas 2, 3 y 4 dieron recuentos caracterizados como neutropenia grave ($< 0,5 \times 10^9/L$). El esquema 4 fue descartado como elegible para la evaluación de neutropenia ya que el recuento de neutrófilos fue cero o indetectable, lo que dificultaría la evaluación de agentes protectores contra la mielotoxicidad inducida por docetaxel. Por lo anterior, los elegibles para neutropenia inducida por docetaxel fueron los esquemas 2 y 3.

Las pruebas de placa caliente no arrojaron diferencias significativas en ningún otro esquema para la fase 1 ([Figura 20](#)). Debido a esto, sólo las pruebas nociceptivas mecánicas (pruebas de presión) se consideraron fiables como parte del modelo experimental de daño, ya que la prueba de placa caliente no mostraría datos diferentes en su réplica para la fase 2 del estudio, es decir, no mostraría diferencias significativas para este análisis. En los esquemas 1 y 2 se presentaron diferencias significativas únicamente en una de las pruebas evaluadas, presión en pata

y presión en cola, respectivamente; por lo cual, estos esquemas fueron descartados como elegibles. De este modo, sólo los esquemas 3 y 4 mostraron disminuciones significativas en los umbrales nociceptivos tanto para presión en pata como presión en cola ([Figuras 18](#) y [19](#), respectivamente), evidenciando hiperalgesia mecánica que, con un volumen o número de dosis mayor, existe mayor tendencia a reflejar daño en los nervios periféricos. Sin embargo, como se mencionó antes, los síntomas de neuropatía periférica en pacientes pueden aparecer de 2 a 3 días después de la administración de una dosis estándar única, manifestándose hasta por 7 días (Velasco & Bruna, 2015); esto podría darnos una respuesta del por qué en los esquemas 1 y 2 hubo significancia en algunas pruebas. Como la nocicepción describe la respuesta neuronal periférica a estímulos nocivos potencialmente dañinos para los tejidos, podemos considerar que estos resultados apoyan un modelo de neuropatía periférica (Deuis et al., 2017). Las menores dosis de docetaxel empleadas en el esquema 3 permitieron una administración de volúmenes de solución inyectable más pequeños y así una mejor manipulación de los animales. Estas condiciones de administración de docetaxel fueron clave para la determinación del mejor esquema de tratamiento. Nuestros datos fueron acordes a los de Kim y colaboradores, los cuales implementaron un esquema similar al esquema 3 para evaluación de la neurotoxicidad periférica, donde administraron una dosis de docetaxel semanal de 5 mg/kg por 4 semanas (Kim et al., 2018). Sin embargo, sus resultados no reportan neutropenia, lo cual le da a nuestro modelo un valor agregado para futuros ensayos en los que se quiera determinar una protección conjunta contra el daño neuropático y a la neutropenia causados por el docetaxel.

La utilización del esquema 3 como modelo conjunto de neuropatía periférica y mielotoxicidad inducidas por docetaxel nos permitió evaluar por primera vez el dimetilfumarato como agente neuro y mieloprotector, buscando promoverlo como alternativa de combinación para

la quimioterapia del cáncer con docetaxel. Con dosis de 100 mg/kg pre- y co-administradas con docetaxel, el dimetilfumarato atenuó las alteraciones nociceptivas mecánicas, lo que sugiere un papel protector en la exposición de los nervios periféricos al docetaxel ([Figuras 24, 25 y 26](#)). Anteriormente, se ha demostrado que el dimetilfumarato ejerce un papel protector en modelos experimentales de neuropatía periférica en ratas, tanto inducida quirúrgicamente (Jiahe et al., 2020) como por quimioterapéuticos como el oxaliplatino (Miyagi et al., 2019) y el paclitaxel (Singh et al., 2022).

En el esquema de administración con la incorporación del dimetilfumarato, la toxicidad del docetaxel se reprodujo con respecto a los experimentos de la fase 1 del estudio, dada la pérdida de peso ([Figura 22.](#)), la neutropenia ([Figura 23](#)) y las alteraciones nociceptivas observadas en el grupo DT comparado con el grupo CT ([Figuras 24 y 25](#)).

En cuanto a la evaluación del efecto del dimetilfumarato sobre la neutropenia inducida por el docetaxel, a pesar de que se observa un leve aumento en la cantidad de neutrófilos para el grupo de tratamiento conjunto de dimetilfumarato con docetaxel (DT+DF) en comparación con el grupo de daño DT, este no presenta diferencias estadísticamente significativas ([Figura 23](#)).

Es posible que un aumento en la dosis de dimetilfumarato o un cambio en su dosificación induzca un efecto protector significativo. Los neutrófilos pueden ser un arma de doble filo: en presencia de estímulos adecuados, los neutrófilos liberan una cantidad excesiva de ERO que pueden inducir lesiones celulares y tisulares, contribuyendo a patologías como la aterosclerosis y las lesiones cerebrales, pero que también es necesaria para resolver infecciones. Además, las ERO derivadas de los neutrófilos pueden desempeñar una función tanto promotora como supresora de tumores (Morana Jaganjac et al., 2016).

Las [Tablas 3](#) y [4](#) muestran otras características encontradas comúnmente en la práctica clínica con docetaxel, como leucopenia, anemia y linfopenia (Hirata et al., 2021), así como otras no reportadas con frecuencia, como recuentos bajos de monocitos y eosinófilos.

Los bajos niveles de hemoglobina, creatinina y las enzimas plasmáticas ALP, AST, ALT y CK-MB en el grupo DT podrían estar asociados a este déficit nutricional. Zhao et al. (Zhao et al., 2010) también observaron una reducción de los niveles de ALP, AST y ALT, a diferencia de otros autores que informaron del aumento más habitual inducido por la quimioterapia de los niveles plasmáticos de estas enzimas (Feng et al., 2018). Sin embargo, los pacientes de cáncer que reciben docetaxel han experimentado disminuciones de la presión plasmática osmótica coloidal debido a un síndrome de fuga de proteínas capilares aparentemente inducido por el docetaxel (Semb et al., 1998). Un aumento del volumen plasmático también podría explicar este fenómeno. La disminución sistemática observada en los marcadores plasmáticos en el grupo DT ([Tabla 3](#)) también podría explicarse por cualquiera de estas razones. El dimetilfumarato alteró los valores normales de estos marcadores plasmáticos. Los grupos cotratados de docetaxel con dimetilfumarato mantuvieron valores similares o los tratados únicamente con docetaxel. Sin embargo, las ratas tratadas únicamente con dimetilfumarato (grupo DF) también presentaron valores disminuidos en casi todos los marcadores, siendo más evidente en la actividad de CK-MB. Tampoco se observó que el dimetilfumarato pudiera mejorar otros recuentos de células sanguíneas o marcadores de toxicidad (es decir, RBC, ALP, AST, [Tabla 4](#)). Estos, a pesar de que podrían estar relacionados con el déficit nutricional, como se observó para los grupos tratados con docetaxel, no están relacionados con el grupo DF, ya que este grupo no presentó pérdida de peso durante el tratamiento, manteniéndose similar al grupo control ([Figura 22](#)). El dimetilfumarato, al ser un compuesto que tiene propiedades antioxidantes y citoprotectoras, se usa en enfermedades

inflamatorias como esclerosis múltiple y psoriasis, lo que podría reducir el daño celular en el miocardio y músculo esquelético (Thomas et al., 2022). Una disminución de la CK-MB y algunos otros marcadores que se encuentran en los músculos como la ALT o la AST podría reflejar una menor inflamación o daño muscular después del tratamiento. Estas disminuciones en los valores normales de los marcadores plasmáticos después del tratamiento con dimetilfumarato, generalmente no se asocian con un problema, sin embargo, si podía reflejar un menor daño muscular o inflamación. Esto podría estar relacionado con el hecho de ver disminuciones en el grupo DF sin observar un déficit nutricional al final del tratamiento (Thomas et al., 2022).

Los grupos de tratamiento con dimetilfumarato+docetaxel mostraron recuperación únicamente en las alteraciones nociceptivas, particularmente en los ensayos de presión en pata ($P<0.02$) y presión en cola ($P<0.02$). En la prueba de placa caliente a diferencia de las otras pruebas nociceptivas, no se presentó hiperalgesia en los grupos tratados con docetaxel (DT y DT+DF) ([Figura 26](#)). Esto puede deberse al hecho de que existen diferentes fibras nerviosas encargadas de la percepción de diferentes estímulos. Por ende, el hecho de que existan diferencias significativas en unas pruebas de daño nervioso y en otras no, o que el tipo de daño esté representado de manera diferente (analgesia o hiperalgesia), puede deberse al hecho de que sólo se ha presenciado daño en el tipo de fibra nerviosa asociada a la presión (fibras $A\beta$ en mayor medida), que son fibras que tienen alta velocidad de conducción y están conectadas a receptores mecanorreceptores especializados (Caroline et al., 2014). Para el caso de sensación térmica, que está asociada a fibras nerviosas pequeñas del sistema nervioso periférico, más específicamente fibras nerviosas tipo C (fibras nerviosas no mielinizadas) y $A\delta$ (fibras aferentes escasamente mielinizadas), el daño se está presentando de manera diferente (Contijoch Roqueta et al., 2020; Ma Pedrajas Navas & Molino González, 2008).

La cantidad de ERO presente en la célula depende de la actividad tanto de las enzimas que las generan como de las enzimas que las eliminan, es decir, de las enzimas antioxidantes. Los antioxidantes de moléculas pequeñas también desempeñan un papel importante en la inactivación pasiva de ERO (Skrzycki, 2021). Debido a eso, se realizaron diferentes pruebas enzimáticas para determinar la actividad o presencia de ellas en los homogenados de nervio ciático extraído de cada uno de los grupos de tratamiento.

Las pruebas realizadas se han reportado anteriormente en muestras de rata, aunque por lo general se usa en órganos más grandes (hígado, riñón, vaso, pulmón etc.). El uso de nervio ciático para homogenados se ha reportado anteriormente (Eren Ogut et al., 2018). Preparar los homogenados de nervio ciático presentó limitaciones para llevar a cabo todas las determinaciones del estado redox, ya que, al ser tan poco tejido, no se obtuvo gran cantidad de homogenado siguiendo las indicaciones de preparación (100 mg de tejido para 1 mL de coctel inhibidor de proteasas). Se obtuvo un promedio de 500 uL de homogenado para las muestras de nervio ciático, cantidad insuficiente para realizar réplicas adicionales en algunos ensayos. Sin embargo, todas las pruebas fueron llevadas a cabo como se pudo determinar en el apartado anterior. Otra valoración a tener en cuenta fue que, por la poca cantidad de tejido, no fue posible preparar varios homogenados que cumplieran con las características necesarias para cada prueba realizada. En algunas pruebas se hacía necesario agregar agentes para asegurar condiciones óptimas específicas para cada análisis, más allá del coctel inhibidor de proteasas; por ejemplo, el hidroxitolueno butilado para peroxidación lipídica o el ácido sulfosalicílico para la determinación de GSH total. Debido a esto, se preparó un homogenado estándar con las condiciones generales para todas las pruebas y se tomó una alícuota para cada prueba, de tal manera que se pudiera garantizar las condiciones necesarias en las pruebas que así lo requirieran.

Para la prueba de peroxidación lipídica se tomó una alícuota del homogenado estándar y se le agregó hidroxitolueno butilado. La peroxidación lipídica ocurre cuando los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas celulares reaccionan con las ERO. Esto genera radicales libres de lípidos que inician una cascada de reacciones de degradación, produciendo compuestos secundarios reactivos. Uno de los productos finales más prominentes de esta degradación es el malondialdehído MDA (Gérard-Monnier et al., 1998). Esto quiere decir que a niveles altos de MDA se deduce una mayor cantidad de ERO. Los datos obtenidos no presentaron diferencias significativas en los niveles de MDA entre los grupos ([Tabla 6](#)) y no son concluyentes para determinar si la peroxidación lipídica es un mecanismo de daño involucrado en la hiperalgnesia observada en las ratas tratadas con docetaxel. Es posible que el mecanismo no esté involucrado, pero también es posible que estos resultados se deban a limitaciones de la metodología.

La actividad de la catalasa es un indicador importante del estado antioxidante del tejido y su capacidad para manejar el estrés oxidante. Valores altos de actividad catalasa nos pueden indicar mayores niveles de ERO. Los datos obtenidos no mostraron diferencias significativas para ningún rango de tiempo establecido. Los valores de actividad de esta enzima en los grupos tratados con docetaxel (DT y DT+DF) se mantuvieron similares en comparación con el grupo control ([Tabla 6](#)). Los resultados no permitieron identificar actividad catalítica de la catalasa como mecanismo de daño involucrado en la hiperalgnesia observada en las ratas tratadas con docetaxel, ni su relevancia en cuanto al tratamiento con dimetilfumarato. Es posible que el mecanismo no esté involucrado, pero también es posible que estos resultados se deban a limitaciones de la metodología.

El GSH, un tripéptido tiol (γ -glutamil cisteinil glicina), es el antioxidante más abundante en las células aeróbicas, presente en concentraciones micromolares (μM) en los fluidos corporales

y en concentraciones milimolares (mM) en los tejidos. El GSH es fundamental para proteger del estrés oxidante, actuando como un eliminador de radicales libres e inhibidor de la peroxidación lipídica (Owen & Allan Butterfiel, 2010). La principal acción conocida del GSH es su capacidad antioxidante, que ayuda a mantener el ciclo redox de las células. Por ende, la cantidad de GSH presente en los tejidos puede ser un indicativo de estrés oxidante (Rahman et al., 2006). Se determinó GSH total en las muestras de homogenados de nervio ciático. Para esto, se agregó ácido sulfosalicílico a una alícuota de homogenado estándar, ya que este ayuda a evitar la oxidación del GSH durante el procesamiento de la muestra y garantiza una medición más precisa de los niveles de glutatión reducido (Rahman et al., 2006). Los datos obtenidos de GSH total no mostraron diferencias significativas en la comparación entre grupos ([Tabla 6](#)) y no son concluyentes para determinar si la cantidad de GSH total es un mecanismo de daño involucrado en la hiperalgesia observada en las ratas tratadas con docetaxel, ni su relevancia en cuanto al tratamiento con dimetilfumaratol. Es posible que el mecanismo no esté involucrado, pero también es posible que estos resultados se deban a limitaciones de la metodología.

Las superóxido dismutasas son metaloenzimas que catalizan la conversión del anión superóxido para dar oxígeno molecular y H_2O_2 ([Figura 12](#)). Se midió la actividad de la SOD calculando la capacidad de captar del ión $O_2\cdot^-$ del sistema xantina-xantina oxidasa. Los altos niveles de SOD pueden indicar que el tejido está enfrentando un aumento en la producción de radicales superóxido (Oberley, 1984). Se usó una alícuota de homogenado de nervio ciático sin diluir para la determinación de la actividad de la SOD en cada uno de los grupos ([Tabla 6](#)). Los datos obtenidos no mostraron diferencias significativas entre los grupos, por lo tanto, no se pudo identificar si la actividad catalítica de la superóxido dismutasa estaba involucrada en el mecanismo de daño relacionado con la hiperalgesia observada en las ratas tratadas con docetaxel, ni su

relevancia en cuanto al tratamiento con dimetilfumaratol. Es posible que el mecanismo no esté involucrado, pero también es posible que estos resultados se deban a limitaciones de la metodología, al igual que en las demás enzimas evaluadas.

6 Conclusiones

El tratamiento con docetaxel mostró un potente efecto tóxico en las ratas bajo estudio. Se demostró que, en cada uno de los esquemas, el grupo tratado con DT muestra reducciones en el peso final en comparación con los grupos control, demostrando así una toxicidad asociada al tratamiento desde la primera dosis. El esquema de una única dosis de 15 mg/kg de DT (esquema 1) fue el esquema menos favorecido tanto para neuropatía periférica como para neutropenia, lo cual indica que una única dosis no asegura el daño conjunto de neutropenia y neuropatía periférica. A pesar de que el esquema 2 aseguró significancia en el conteo de neutrófilos asociado a neutropenia, no mostró significancia en las dos pruebas nociceptivas evaluadas, por lo que fue un esquema incompleto del daño conjunto buscado. El mejor esquema que representó tanto neuropatía periférica como neutropenia fue el esquema 3 (5 mg/kg), el cual primó sobre el esquema 4 al ser un esquema que representó menor incomodidad y dolor para el animal, en cuanto al abordaje e intervención, y que asegura en igual medida diferencias significativas tanto para neutropenia y neuropatía periférica. Se concluye que efectivamente se encontró un esquema conjunto de daño asociado al tratamiento con docetaxel, el cual fue confirmado al replicarse en la fase 2.

El tratamiento con dimetilfumarato demostró una disminución de la hiperalgesia presentada en los grupos tratado con docetaxel para las pruebas de presión, mientras que para la prueba de placa caliente no se observó cambio alguno en comparación con el grupo DT. En cuanto a la neutropenia, a pesar de que se observaron valores individuales mayores en la cantidad de

neutrófilos en el grupo DT+DF comparado con el DT, no presentó diferencias significativas. Se hace necesario probar con dosis más altas para futuros ensayos buscando encontrar un aumento significativo. Las pruebas de bioquímica sanguínea presentaron bajos niveles de hemoglobina, creatinina y las enzimas plasmáticas ALP, AST, ALT y CK-MB en el grupo DT, lo cual se podría asociar déficit nutricional que presentaron los grupos tratados con docetaxel a lo largo del tratamiento.

Los ensayos para la determinación del estado redox en nervio ciático no fueron concluyentes para la determinación de los mecanismos de daño y protección. Esto pudo deberse a la poca cantidad de homogenado obtenido y a los diferentes modos de preparación de los homogenados para las diferentes técnicas aplicadas, comprometiéndose así la preservación de los homogenados y la calidad analítica de los resultados.

7 Recomendaciones

Deben realizarse más experimentos con dosis más elevadas al esquema de administración de dimetilfumarato antes del tratamiento para que se induzca una respuesta protectora mediada por Nrf2 más alta antes de la exposición al docetaxel. De tal manera que se pueda demostrar un aumento significativo en los niveles de neutrófilos para el grupo de tratamiento conjunto,

Podría ser necesario replicar esquemas de administración independientes de modo que se obtengan homogenados con condiciones de preservación diferentes y propios para cada ensayo de determinación del estado redox. Está claro que no se puede llevar a cabo un alto número de ensayos con un homogenado estándar preparado bajo unas mismas condiciones. Al parecer, esto estaría afectando la calidad analítica de los resultados obtenidos.

Referencias bibliográficas

- Alam, A., Farooq, U., Ruchi Singh, VP Dubey, Shailendra Kumar, Rashmi Kumari, Kamlesh Kumar Naik, BD Tripathi, & KL Dhar. (2018). Chemotherapy Treatment and Strategy Schemes: A Review. *Open Access Journal of Toxicology*, 2(5). <https://doi.org/10.19080/oajt.2018.02.555600>
- Al-Jaderi, Z., & Maghazachi, A. A. (2016). Utilization of dimethyl fumarate and related molecules for treatment of multiple sclerosis, cancer, and other diseases. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 7, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00278>
- Aslam, M. S., Naveed, S., Ahmed, A., Abbas, Z., Gull, I., & Athar, M. A. (2014). Side Effects of Chemotherapy in Cancer Patients and Evaluation of Patients Opinion about Starvation Based Differential Chemotherapy. *Journal of Cancer Therapy*, 05(08), 817–822. <https://doi.org/10.4236/jct.2014.58089>
- Atessahin, A., Yilmaz, S., Karahan, I., Ceribasi, A. O., & Karaoglu, A. (2005). Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology*, 212(2–3), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.04.016>
- Blayney, D. W., Mohanlal, R., Adamchuk, H., Kirtbaya, D. V., Chen, M., Du, L., Ogenstad, S., Ginn, G., Huang, L., & Zhang, Q. (2022). Efficacy of Plinabulin vs Pegfilgrastim for Prevention of Docetaxel-Induced Neutropenia in Patients with Solid Tumors: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Network Open*, 5(1). <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.45446>
- Branda, R. F., Powden, C., Brooks, E. M., Yildirim, Z., Naud, S. J., & McCormack, J. J. (2006). Vitamin E but not St. John's wort mitigates leukopenia caused by cancer chemotherapy in rats. *Translational Research*, 148(6), 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2006.05.007>
- Bria, E., Cuppone, F., Ciccamese, M., Nisticò, C., Facciolo, F., Milella, M., Izzo, F., Terzoli, E., Cognetti, F., & Giannarelli, D. (2006). Weekly docetaxel as second line chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: Meta-analysis of randomized trials. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 32, Issue 8, pp. 583–587). <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2006.07.003>
- Cardona, A., Ortiz, L., Reveiz, L., Becerra, A., Arango, N., Santacruz, J., Otero, J., Carranza, H., Ojeda, K., Rojas, L., Vargas, C., Rodríguez, M., Castro, C., Camacho, M., Serrano, S., Torres, D., & Balañá, C. (2010). Neuropatía inducida por el tratamiento médico del cáncer. *MÉDICAS UIS*, 23(1), 100–119. www.cancer.gov/
- Caroline, M.-K., Bruno, E.-V., Samuel, A.-A., Horacio, S.-M., & Marco Abiel, H.-C. (2014). Fisiología de la vibración. In *Artículo* (Vol. 15, Issue 3).
- Carvajal, C. C. (2019). Revista medicina legal de costa rica especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo reactive oxygen species: training, function and oxidative stress. 36(1Contijoch Roqueta, C., Izquierdo, M. F., & Arrabal Solano, L. (2020). Small fibre neuropathy: A review. In *Semergen* (Vol. 46, Issue 4, pp. 277–282). Ediciones Doyma, S.L. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2019.11.003>
- Carter, M., & Shieh, J. C. (2010). Animal Behavior. In *Guide to Research Techniques in Neuroscience* (pp. 39–71). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374849-2.00002-2>

- Cobos del Moral, E. J. (2020). El dimetilfumarato: de un fármaco antipsoriático a un prometedor antineuropático. *Revista de La Sociedad Española Del Dolor*. <https://doi.org/10.20986/resed.2020.3805/2020>
- Conklin, K. A. (2004). Chemotherapy-associated oxidative stress: Impact on chemotherapeutic effectiveness. In *Integrative Cancer Therapies* (Vol. 3, Issue 4, pp. 294–300). <https://doi.org/10.1177/1534735404270335>
- Contijoch Roqueta, C., Izquierdo, M. F., & Arrabal Solano, L. (2020). Small fibre neuropathy: A review. In *Semergen* (Vol. 46, Issue 4, pp. 277–282). Ediciones Doyma, S.L. <https://doi.org/10.1016/j.semereg.2019.11.003>
- Cortes, J. E., & Pazdur, R., “Docetaxel”, *J Clin Oncol*, 1995, vol. 13, pp. 2643 - 2655
- Dale, D. C. (2009). Advances in the treatment of neutropenia. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 3(3), 207–212. <https://doi.org/10.1097/SPC.0b013e32832ea6ae>
- Dale, D. C. (2016). How i diagnose and treat neutropenia. In *Current Opinion in Hematology* (Vol. 23, Issue 1, pp. 1–4). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000208>
- Desforges, A. D., Hebert, C. M., Spence, A. L., Reid, B., Dhaibar, H. A., Cruz-Topete, D., Cornett, E. M., Kaye, A. D., Urits, I., & Viswanath, O. (2022). Treatment and diagnosis of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: An update. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 147). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112671>
- Deuis, J. R., Dvorakova, L. S., & Vetter, I. (2017). Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00284>
- Dirección de Epidemiología y Demografía. (2021). *Análisis de Situación de Salud (ASIS) Colombia*.
- Dwivedi, D. K., & Jena, G. B. (2020). Diethylnitrosamine and thioacetamide-induced hepatic damage and early carcinogenesis in rats: Role of Nrf2 activator dimethyl fumarate and NLRP3 inhibitor glibenclamide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 522(2), 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.100>
- Eren Ogut, Fatos Yildirim, Levent Sarikcigl, Umutay Aydin, & Necdet Demir. (2018). Neuroprotective Effects of Ozone Therapy After Sciatic Nerve Cut Injury. *Kurume Medical Journal*, 65, 137–144.
- Feng, S.-Q., Wang, G.-J., Zhang, J.-W., Xie, Y., Sun, R.-B., Fei, F., Huang, J.-Q., Wang, Y., Aa, J.-Y., & Zhou, F. (2018). Combined treatment with apatinib and docetaxel in A549 xenograft mice and its cellular pharmacokinetic basis. In *Acta Pharmacologica Sinica* (Vol. 39). www.chinaphar.com
- Frederiks, C. N., Lam, S. W., Guchelaar, H. J., & Boven, E. (2015). Genetic polymorphisms and paclitaxel- or docetaxel-induced toxicities: A systematic review. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 41, Issue 10, pp. 935–950). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.10.010>
- Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J. C., & Chaudière, J. (1998). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4- hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical Research in Toxicology*, 11(10), 1176–1183. <https://doi.org/10.1021/tx9701790>

- Glasauer, A., & Chandel, N. S. (2014). Targeting antioxidants for cancer therapy. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 92, Issue 1, pp. 90–101). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.017>
- Global Cáncer Observatory. (2022). Cancer Today: Colombia. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>, accessed (24032025).
- Guerrero, L., Maldonado Vega, M., & Calderón Salinas, J. V. (2016). La paradoja del uso de antioxidantes durante el tratamiento contra el cáncer: ¿proteger al organismo de los efectos tóxicos de los antineoplásicos disminuiría la eficacia farmacológica para evitar el desarrollo del cáncer?. *Educación Bioquímica* vol. 35, pp. 71–88.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. In *Archives of Toxicology* (Vol. 94, Issue 3, pp. 651–715). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Harasym, J., & Oledzki, R. (2014). Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. In *Nutrition* (Vol. 30, Issue 5, pp. 511–517). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.08.019>
- Hausman, D. M. (2019). What is cancer? *Perspectives in Biology and Medicine*, 62(4), 778–784. <https://doi.org/10.1353/pbm.2019.0046>
- Hirata, T., Ozaki, S., Tabata, M., Iwamoto, T., Hinotsu, S., Hamada, A., Motoki, T., Nogami, T., Shien, T., Taira, N., Matsuoka, J., & Doihara, H. (2021). A multicenter study of docetaxel at a dose of 100 mg/m² in Japanese patients with advanced or recurrent breast cancer. *Internal Medicine*, 60(8), 1183–1190. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.5089-20>
- Ho, M. Y., & Mackey, J. R. (2014). Presentation and management of docetaxel-related adverse effects in patients with breast cancer. In *Cancer Management and Research* (Vol. 6, Issue 1, pp. 253–259). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S40601>
- Iniaghe, L. O., Krafft, P. R., Klebe, D. W., Omogbai, E. K. I., Zhang, J. H., & Tang, J. (2015). Dimethyl fumarate confers neuroprotection by casein kinase 2 phosphorylation of Nrf2 in murine intracerebral hemorrhage. *Neurobiology of Disease*, 82, 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.07.001>
- Instituto Nacional del Cáncer - NIH. (2022). *Tipos de tratamiento - NCI*. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>
- Instituto Químico Biológico. (2009). *Docetaxel. Vandecum*. <https://iqb.es/cbasicas/farma/farma04/d047.htm>
- Jiahe, L., Jiacheng, M., Lacagnina, M. J., Lorca, S., Odem, M. A., Walters, E. T., Kavelaars, A., & Grace, P. M. (2020). Oral dimethyl fumarate reduces peripheral neuropathic pain in rodents via NFe2L2 antioxidant signaling. *Anesthesiology*, 343–356. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000003077>
- Jiang, H., Zuo, J., Li, B., Chen, R., Luo, K., Xiang, X., Lu, S., Huang, C., Liu, L., Tang, J., & Gao, F. (2023). Drug-induced oxidative stress in cancer treatments: Angel or devil? In *Redox Biology* (Vol. 63). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102754>
- Jones, M. R., Urits, I., Wolf, J., Corrigan, D., Colburn, L., Peterson, E., Williamson, A., & Viswanath, O. (2019). Drug-Induced Peripheral Neuropathy: A Narrative Review. *Current Clinical Pharmacology*, 15(1), 38–48. <https://doi.org/10.2174/1574884714666190121154813>
- Jordan, B., Margulies, A., Cardoso, F., Cavaletti, G., Haugnes, H. S., Jahn, P., & Le Rhun, E. (2020). *Systemic anticancer therapy-induced peripheral and central neurotoxicity:*

- ESMOeEONSeEANO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, prevention, treatment and follow-up 5 behalf of the ESMO Guidelines Committee * , the EONS Education Working Group * and the EANO Guideline Committee. 10(9).* <https://doi.org/10.1016/j>
- Julie Munch. (2017). Tratamiento de la neuropatía inducida por la quimioterapia. *Oncolog*, 6(11–12). <https://www.mdanderson.org/es/publicaciones/oncolog/noviembre-diciembre-2017/tratamiento-de-la-neuropatia-inducida-por-la-quimioterapia.html>
- Khan, S.-F., Wang, J., & Sun, G.-X. (2018). Sulforaphane regulates apoptosis- and proliferation-related signaling pathways and synergizes with cisplatin to suppress human Ovarian cancer. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(5), 2447–2458. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3860>
- Kim, S. T., Kyung, E. J., Suh, J. S., Lee, H. S., Lee, J. H., Chae, S. I., Park, E. S., Chung, Y. H., Bae, J., Lee, T. J., Lee, W. M., Sohn, U. D., & Jeong, J. H. (2018). Phosphatidylcholine attenuated docetaxel-induced peripheral neurotoxicity in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 41(4), 476–485. <https://doi.org/10.1080/01480545.2017.1390580>
- Kobayashi, E. H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., Sekine, H., Tanaka, N., Moriguchi, T., Motohashi, H., Nakayama, K., & Yamamoto, M. (2016). Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11624>
- Labtest Diagnóstica S.A. (2011a). *CK-MB Liquiform*. www.labtest.com.br
- Labtest Diagnóstica S.A. (2011b). *Fostasa alcalina - liquiform*. www.labtest.com.br
- Labtest Diagnóstica S.A. (2011c). *Urea UV - liquiform*. www.labtest.com.br
- Labtest Diagnóstica S.A. (2012a). *ALT/GPT - LIQUIFORM*. www.labtest.com.br
- Labtest Diagnóstica S.A. (2012b). *Creatinina K*. www.labtest.com.br
- Labtest Diagnóstica S.A. (2013). *AST/GOT LIQUIFORM*. www.labtest.com.br
- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 4, Issue 3, pp. 181–189). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri1312>
- Lee, J., Lee, J. E., Kim, Z., Han, S. W., Hur, S. M., Kim, S. Y., Lee, M. H., & Lim, C. W. (2018). Pegfilgrastim for primary prophylaxis of febrile neutropenia in breast cancer patients undergoing TAC chemotherapy. *Annals of Surgical Treatment and Research*, 94(5), 223–228. <https://doi.org/10.4174/astr.2018.94.5.223>
- León Goñi, A. C., Blanco, D., Peña, A., Ronda, M., González, B. O., Arteaga, M. E., Bada, A. M., González, Y., & Mancebo, Axel. (2011). Hematological and biochemical parameters in Sprague Dawley laboratory rats breed in CENPALAB, Cenp: SPRD. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 12.
- Loprinzi, C. L., Lacchetti, C., Bleeker, J., Cavaletti, G., Chauhan, C., Hertz, D. L., Kelley, M. R., Lavino, A., Pharm, B., Lustberg, M. B., Paice, J. A., Schneider, B. P., Lavoie Smith, E. M., Lou Smith, M., Smith, T. J., Wagner-Johnston, N., & Hershman, D. L. (2020). Prevention and Management of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in Survivors of Adult Cancers: ASCO Guideline Update. In *J Clin Oncol* (Vol. 38). www.cancer.net
- Lundqvist, E. Å., Fujiwara, K., & Seoud, M. (2015). Principles of chemotherapy. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 131, S146–S149. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.06.011>
- Maeda, T., Miyazono, Y., Ito, K., Hamada, K., Sekine, S., & Horie, T. (2010). Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats.

- Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 65(6), 1117–1123.
<https://doi.org/10.1007/s00280-009-1119-1>
- M^a Pedrajas Navas, J., & Molino González, Á. M. (2008). *Bases neuromédicas del dolor Neuro-medical bases of pain*. 19(3), 277–293.
- McMahon, M., Lamont, D. J., Beattie, K. A., & Hayes, J. D. (2010). Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *PNAS*, 107. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007387107/-/DCSupplemental>
- Mendonça, J. da S., Guimarães, R. de C. A., Zorgetto-Pinheiro, V. A., Fernandes, C. D. Pietro, Marcelino, G., Bogó, D., Freitas, K. de C., Hiane, P. A., Melo, E. S. de P., Vilela, M. L. B., & Do Nascimento, V. A. (2022). Natural Antioxidant Evaluation: A Review of Detection Methods. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27113563>
- Miyagi, A., Kawashiri, T., Shimizu, S., Shigematsu, N., Kobayashi, D., & Shimazoe, T. (2019). Dimethyl Fumarate Attenuates Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy without Affecting the Anti-tumor Activity of Oxaliplatin in Rodents. In *Biol. Pharm. Bull* (Vol. 42, Issue 4).
- Morana Jaganjac, Ana Cipak, Rudolf Joerg Schaur, & Neven Zarkovic. (2016). Pathophysiology of neutrophil-mediated extracellular redox reactions. *Frontiers in Bioscience*, 21, 839–855.
- National Research Council (U.S.). Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals., & Institute for Laboratory Animal Research (U.S.). (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academies Press.
- Negrette-Guzmán, M., Huerta-Yepe, S., Medina-Campos, O. N., Zatarain-Barrón, Z. L., Hernández-Pando, R., Torres, I., Tapia, E., & Pedraza-Chaverri, J. (2013). Sulforaphane attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity: Role of mitochondrial protection. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/135314>
- Negrette-Guzmán, M., Huerta-Yepe, S., Tapia, E., & Pedraza-Chaverri, J. (2013). Modulation of mitochondrial functions by the indirect antioxidant sulforaphane: A seemingly contradictory dual role and an integrative hypothesis. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 65, pp. 1078–1089). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.182>
- New, P. Z., Jackson, C. E., Rinaldi, D., Burris, H., & Barohn, R. J. (1996). Peripheral neuropathy secondary to docetaxel (Taxotere). *American Academy of Neurology*, 46, 108–111.
- Oberley, L. W. (1984). *Assay of Superoxide Dismutase Activity in Tumor Tissue* (Vol. 105). Academic Press.
- Organización Mundial de la salud. (2025). *Cáncer*. https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab_1
- Orrenius, S. (2007). Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. In *Drug Metabolism Reviews* (Vol. 39, Issues 2–3, pp. 443–455). <https://doi.org/10.1080/03602530701468516>
- Owen, J. B., & Allan Butterfiel, D. (2010). Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 648, pp. 269–277). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-756-3_18
- Patel, B. V., & Hotaling, J. M. (2020). Impact of chemotherapy on subsequent generations. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 38, Issue 1, pp. 10–13). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2019.02.011>

- Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 1(6), 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>
- Rizzo, M. (2021). Mechanisms of docetaxel resistance in prostate cancer: The key role played by miRNAs. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1875, Issue 1). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188481>
- Roy, P. S., & Saikia, B. J. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. In *Indian Journal of Cancer* (Vol. 53, Issue 3, pp. 441–442). Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.200658>
- Sánchez, C. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: fisiopatología del cáncer knowing and understanding the cancer cell: physiopathology of cancer. *Med Clin Condes*. Vol. 24 (4), pp. 553-562
- Sanginetto, M., Grabherr, F., Adolph, T. E., Grander, C., Reider, S., Jaschke, N., Mayr, L., Schwärzler, J., Dallio, M., Moschen, A. R., Moschetta, A., Sabbà, C., & Tilg, H. (2020). Dimethyl fumarate ameliorates hepatic inflammation in alcohol related liver disease. *Liver International*, 40(7), 1610–1619. <https://doi.org/10.1111/liv.14483>
- Sanginetto, M., Grabherr, F., Adolph, T. E., Grander, C., Reider, S., Jaschke, N., Mayr, L., Schwärzler, J., Dallio, M., Moschen, A. R., Moschetta, A., Sabbà, C., & Tilg, H. (2020). Dimethyl fumarate ameliorates hepatic inflammation in alcohol related liver disease. *Liver International*, 40(7), 1610–1619. <https://doi.org/10.1111/liv.14483>
- Schweizer, M., & Antonarakis, E. (2014). Chemotherapy and its evolving role in the management of advanced prostate cancer. In *Asian Journal of Andrology* (Vol. 16, Issue 3, pp. 334–340). Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.122593>
- Schweizer, M. T., Gulati, R., Mostaghel, E. A., Nelson, P. S., Montgomery, R. B., Yu, E. Y., & Cheng, H. H. (2016). Docetaxel-related toxicity in metastatic hormone-sensitive and metastatic castration-resistant prostate cancer. *Medical Oncology*, 33(7). <https://doi.org/10.1007/s12032-016-0793-1>
- Semb, K. A., Aamdal, S., & Oian, P. (1998). Capillary protein leak syndrome appears to explain fluid retention in cancer patients who receive docetaxel treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 16(10), 3426–3432. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.10.3426>
- Senthilkumar, S., Yogeeta, S. K., Subashini, R., & Devaki, T. (2006). Attenuation of cyclophosphamide induced toxicity by squalene in experimental rats. *Chemico-Biological Interactions*, 160(3), 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.02.004>
- Sepúlveda Sánchez, J. M. (2019). Toxicidad neurológica de los tratamientos antineoplásicos farmacológicos. In *Rev. CánCeR (Madrid)* (Vol. 33).
- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., & Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of Pharmacy Research*, 7(9), 828–835. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>
- Singh, J., Thapliyal, S., Kumar, A., Paul, P., Kumar, N., Bisht, M., Naithani, M., Rao, S., & Handu, S. S. (2022). Dimethyl Fumarate Ameliorates Paclitaxel-Induced Neuropathic Pain in Rats. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.28818>
- Singh, K., Bhorl, M., Kasu, Y. A., Bhat, G., & Marar, T. (2018). Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity – Exploring the armoury of obscurity. In *Saudi Pharmaceutical Journal* (Vol. 26, Issue 2, pp. 177–190). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.12.013>

- Skrzycki, M. (2021). Superoxide dismutase and the signal receptor as key elements of the antioxidant system in human gastrointestinal tract cancers. *Open Life Sciences*, *16*(1), 1225–1239. <https://doi.org/10.1515/biol-2021-0124>
- Suckow Mark, Hankenson Claire, Wilson Ronald, & Foley Patricia, “The Laboratory Rat, 3rd Edition”, *American College of Laboratory Animal Medicine Series*, 2019.
- Tabernero, J., Climent, M. A., Lluch, A., Albanell, J., Vermorken, J. B., Barnadas, A., Antón, A., Laurent, C., Mayordomo, J. I., Estaun, N., Losa, I., Guillem, V., Garcia-Conde, J., Tisaire, J. L., & Baselga, J. (2004). A multicentre, randomised phase II study of weekly or 3-weekly docetaxel in patients with metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, *15*(9), 1358–1365. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh349>
- Thomas, S. D., Jha, N. K., Sadek, B., & Ojha, S. (2022). Repurposing Dimethyl Fumarate for Cardiovascular Diseases: Pharmacological Effects, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Promise. In *Pharmaceuticals* (Vol. 15, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ph15050497>
- Tonra, J. R., Lloyd, G. K., Mohanlal, R., & Huang, L. (2020). Plinabulin ameliorates neutropenia induced by multiple chemotherapies through a mechanism distinct from G-CSF therapies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *85*(2), 461–468. <https://doi.org/10.1007/s00280-019-03998-w>
- U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, & Center for Drug Evaluation and Research (CDER). (2005). *Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers Healthy Volunteers*. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
- Velasco, R., & Bruna, J. (2015). Taxane-induced peripheral neurotoxicity. In *Toxics* (Vol. 3, Issue 2, pp. 152–169). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/toxics3020152>
- Villavicencio, F., & Quintanilla, R. A. (2021). Contribution of the nrf2 pathway on oxidative damage and mitochondrial failure in parkinson and alzheimer’s disease. In *Antioxidants* (Vol. 10, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox10071069>
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W. W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G. M., Budinger, G. R. S., & Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(19), 8788–8793. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003428107>
- Xu, C., Yang, S. P., Zhang, Y., Tang, L. L., Zhou, G. Q., Liu, X., Mao, Y. P., Guo, R., Li, W. F., Chen, L., Lin, A. H., Sun, Y., & Ma, J. (2018). Neutropenia during the first cycle of induction chemotherapy is prognostic for poor survival in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: A real-world study in an endemic area. *Cancer Research and Treatment*, *50*(3), 777–790. <https://doi.org/10.4143/crt.2017.255>
- Yamamoto, X. M., Kensler, T. W., & Motohashi, H. (2018). THE KEAP1-NRF2 SYSTEM: A THIOL-BASED SENSOR-EFFECTOR APPARATUS FOR MAINTAINING REDOX HOMEOSTASIS. *Physiol Rev*, *98*, 1169–1203. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023>
- Yin, W., Wang, J., Jiang, L., & James Kang, Y. (2021). Cancer and stem cells. In *Experimental Biology and Medicine* (Vol. 246, Issue 16, pp. 1791–1801). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/15353702211005390>
- Zajaczkowska, R., Kocot-Kępska, M., Leppert, W., Wrzosek, A., Mika, J., & Wordliczek, J. (2019). Mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. In *International*

Journal of Molecular Sciences (Vol. 20, Issue 6). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/ijms20061451>

- Zehua, M., Weiwei, Z., Baijun, D., Zhixiang, X., Yiyi, J., Ruopeng, S., Kai, S., Jiahua, P., Qi, W., & Wei, X. (2022). Docetaxel remodels prostate cancer immune microenvironment and enhances checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Theranostics*, *12*(11), 4965–4979. <https://doi.org/10.7150/thno.73152>
- Zhao, M., Su, M., Lin, X., Luo, Y., He, H., Cai, C., & Tang, X. (2010). Evaluation of docetaxel-loaded intravenous lipid emulsion: Pharmacokinetics, tissue distribution, antitumor activity, safety and toxicity. *Pharmaceutical Research*, *27*(8), 1687–1702. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0180-0>