



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA
LABORATORIO DE NEUROMODULACIÓN

**Efecto de la dapsona en las subunidades del receptor
NMDA: GluN2A y GluN2B en neuronas piramidales de
las capas V y VI de corteza motora primaria de rata**

Tesis presentada para obtener el título de:

Licenciatura en Biomedicina

Presenta:

Adriana Juárez Nájera

Director de Tesis:

Dr. JORGE LUIS VALENTE FLORES HERNÁNDEZ

Co-Directora de Tesis:

LBM ERIKA LORENA ARROYO RÍOS

PUEBLA, PUE. FEBRERO 2016

A mi madre y a mi tía Mari

AGRADECIMIENTO ESPECIAL



Esta investigación fue realizada gracias al apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología del
Estado de Puebla

AGRADECIMIENTO

A la comisión revisora:

D.C. José Gustavo López y López.

Facultad de Ciencias Químicas, BUAP.

D.C. Gonzalo Flores Alvarez.

Laboratorio de Neuropsiquiatría, IF-BUAP.

D.C. Jorge Luis Valente Flores Hernández.

Laboratorio de Neuromodulación, IF-BUAP.

Por el tiempo dedicado a la revisión de la presente tesis, y por sus valiosas observaciones y sugerencias, GRACIAS.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia

Especialmente a mi madre, Ana Magdalena Nájera Vázquez y a mi tía María del Carmen Nájera Vázquez por su amor y apoyo incondicional en cada una de las etapas de mi vida, no sería la persona que soy sin ellas. A mis tíos Genaro, Consuelo, Guadalupe, Juan, Gloria, Andrés y Margarita por siempre estar para mí cuando más los necesite. A mis primos Pablo, José, Diana y Eduardo por llenar de alegría y buenos recuerdos los momentos más tristes y felices de mi vida.

A mis compañeros y amigos

A mis compañeros de generación y de laboratorio por compartir conmigo y apoyarme los principales años de mi formación académica y profesional. A mis amigos Dulce, Caro, Gustavo, Marco, Aldo, Rocío, Alejandro, Arnoldo y Evelyn por los momentos inolvidables de alegría que hemos pasado juntos, por su ayuda incondicional a mi persona y a este proyecto.

A Eduardo Baltazar Gaytan

Por permanecer a mi lado los últimos tres años a pesar de las dificultades que se nos presentaron, por su amor y apoyo incondicional en todos los proyectos que realice y por todos los momentos de felicidad que me proporciono.

Al Dr. Jorge Luis Valente Flores Hernández y a la LBM Erika Lorena Arroyo Ríos

Les agradezco profundamente el haberme proporcionado la oportunidad de formar parte del equipo de trabajo y por todos los días empleados en mi formación académica y personal. Así mismo, por el cariño y apoyo que siempre encontré en ellos aún en los momentos más adversos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE GRÁFICOS	IX
ABREVIATURAS	X
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES GENERALES	2
CORTEZA CEREBRAL	4
<i>Corteza Motora</i>	5
GLUTAMATO.....	7
<i>Receptores de Glutamato</i>	8
Receptor NMDA	10
Modulación del receptor NMDA	13
TCN-201.....	14
Ifenprodil	15
EXCITOTOXICIDAD.....	16
<i>Relación entre lesión cerebral, isquemia y excitotoxicidad.</i>	17
<i>Neuroprotección</i>	19
DAPSONA.....	19
<i>Farmacología</i>	21
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	22
DAPSONA COMO NEUROPROTECTOR	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS.....	25
OBJETIVO GENERAL:	25
OBJETIVOS PARTICULARES:	25
METODOLOGÍA	26
MÉTODO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	26
TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	27
<i>Protocolo de disociación</i>	27
<i>Técnica de célula completa en protocolos de fijación de voltaje (Whole – Cell recordings).</i>	28
<i>Aplicación de fármacos</i>	29
<i>Protocolos electrofisiológicos.</i>	29
<i>Pruebas estadísticas</i>	31
BIOÉTICA	32
ESQUEMA DE TRABAJO	35

RESULTADOS.....	36
PROTOCOLO DE RAMPA.....	37
CORRIENTES ACTIVADAS POR NMDA.....	37
EFECTO DE DAPSONA SOBRE LA CORRIENTE ACTIVADA DE NMDA.....	39
EFECTO DE LA DAPSONA SOBRE LA CORRIENTE ACTIVADA DE NMDA EN PRESENCIA DEL ANTAGONISTA DE LA SUBUNIDAD GLuN2B IFENPRODIL	41
EFECTO DE LA DAPSONA SOBRE LA CORRIENTE ACTIVADA DE NMDA EN PRESENCIA DEL ANTAGONISTA DE LA SUBUNIDAD GLuN2A TCN-201	43
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS	50
ANEXOS.....	50
DEFINICIONES OPERACIONALES	64
<i>Técnica de Voltage Clamp</i>	64
DEFINICIONES CONCEPTUALES	64
DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES Y ESCALAS DE MEDICIÓN.....	65
CONGRESOS.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Neuronas de la corteza y sus proyecciones.	4
Figura 2. Dibujo representativo de la corteza motora primaria (M1) y la secundaria (M2).	6
Figura 3. a) Formula química del glutamato, b) Síntesis y liberación de glutamato.....	8
Figura 4. Estructura y activación de los iGluRs.	9
Figura 5. Estructura y activación de los mGluRs.	10
Figura 6. Estructura del receptor NMDA.	12
Figura 7. Receptor NMDA (GluN1/GluN2) y sus sitios de unión.	13
Figura 8. Estructura química del ifenprodil y algunos de sus derivados.....	16
Figura 9. Estructura de la dapsona.	20
Figura 10. Microfotografías de neuronas piramidales.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Agentes selectivos para los NMDAR.....	14
-------------------------------------------------	----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Trazo representativo del protocolo de rampa.	37
Gráfico 2. Corriente activada por NMDA	38
Gráfico 3. Efecto de la dapsona en la corriente activada por NMDA.	39
Gráfico 4. Densidad de Corriente en el pico, condición NMDA – Dapsona.	40
Gráfico 5. Densidad de Corriente en el estado estacionario, condición NMDA - Dapsona	40
Gráfico 6. Efecto de la dapsona en presencia del antagonista Ifenprodil.	41
Gráfico 7. Densidad de Corriente en pico y estado estacionario, condición NMDA – Dapsona – Ifenprodil – Ifenprodil + Dapsona.	42
Gráfico 8. Porcentaje de reducción al pico y del estado estacionario por Dapsona e Ifenprodil.	42
Gráfico 9. Efecto de la dapsona en presencia del antagonista TCN-201.	43
Gráfico 10. Densidad de Corriente en pico y estado estacionario, condición NMDA – Dapsona – TCN-201 – TCN-201 + Dapsona.	44
Gráfico 11. Porcentaje de reducción al pico y del estado estacionario por Dapsona y TCN-201.	44

ABREVIATURAS

AMPAR	Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propiónico
AMPc	Adenosín Monofosfato Cíclico.
ATD	Dominio N-terminal.
CGR	Células Gliales Radiales.
CTD	Dominio C-terminal.
DAG	Diacilglicerol.
DDS	Dapsona.
EC50	Concentración Efectiva 50.
G _i	Proteína G inhibidora.
GLAST	Transportador de Aspartato y Glutamato.
Gln	Glutamina
GLT-1	Transportador Glial de Glutamato 1.
Glu	Glutamato
GPCR	Receptor acoplado a proteína G.
G _q	Proteína G estimuladora.
IC50	Concentración Inhibidora 50.
ICC	Impacto Cortical Controlado.
iGluRs	Receptores de glutamato ionótrópicos.
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato.
KA	Ácido Kaínico.
KAR	Receptor de Kainato.
LBD	Dominio de Unión a Ligando.
LCT	Lesión Cerebral Traumática.
LP	Peroxidación Lipídica.
M1	Corteza Motora Primaria.
M2	Corteza Motora Premotora.
MADDS	DDS Monoacetilada.
mGluRs	Receptores de glutamato metabotrópicos.
MPO	Mieloperoxidasa.
NE	Neuroepitelial.
NMDAR	Receptor del ácido N-metil-D-aspartato.
PAG	Sustancia Gris Periacueductal.
PLC	Fosfolipasa C.
QUIN	Ácido Quinolínico.
SNC	Sistema Nervioso Central.
Tat	Transactivador de la Transcripción de Proteínas.
TCN-201	3-cloro-4-fluoro-N-[(4-[(2-(fenil carbonil) hidrazina) carbonil] fenil) metil] bencenosulfonamida

TCE	Trauma Craneoencefálico.
TMD	Dominio Transmembrana.

RESUMEN

La dapsona (DDS) o 4,4'-diaminodifenilsulfona es un compuesto aceptado en la terapia de una amplia gama de trastornos dermatológicos y sistémicos (Tingle, Mahmud, Maggs, Pirmohamed, & Park, 1997; V. E. G. Wozel, 2010). Aunque, investigaciones han sugerido que la dapsona puede influenciar en las funciones del Sistema Nervioso Central suprimiendo la neurotoxicidad inducida experimentalmente a través de modelos animales de isquemia-perfusión y lesión, con ácido kaínico y ácido quinolínico (G. Wozel & Blasum, 2013). La excitotoxicidad, un tipo de neurotoxicidad, se refiere a la capacidad del glutamato y otros compuestos relacionados para destruir neuronas por transmisión sináptica excitadora prolongada (Purves *et al.*, 2001; Lai, Zhang, & Wang, 2014). El receptor de NMDA (NMDAR), un tipo de receptor ionotrópico de glutamato, ha recibido mucha atención debido a su papel clave en la plasticidad neuronal y por su participación en la excitotoxicidad neuronal (Vyklícky *et al.*, 2014). Los NMDARs se ensamblan a partir de cuatro subunidades transmembranales, que se unen a glicina o D-serina (GluN1 y GluN3A/B), o que son activadas por glutamato (GluN2A-D; Stepulak, Rola, Polberg, & Ikonomidou, 2014; Stawski, Janovjak, & Trauner, 2010).

En el presente trabajo se realizaron registros electrofisiológicos de neuronas piramidales de la corteza motora primaria agudamente disociadas, a través de la técnica de célula completa con fijación de voltaje, para estudiar el efecto de la dapsona en las corrientes activadas por NMDA, además, con el uso de antagonistas específicos se analizó si la DSS modula la actividad de las subunidades GluN2A y GluN2B del receptor NMDA. De este modo, se observó que la dapsona a una concentración de 20 μ M disminuye la corriente de NMDA en un $15.18 \pm 1.19\%$, y, que aún en presencia de los antagonistas TCN-201 e Ifenprodil, la dapsona aún reduce la corriente de NMDA en un $18.08 \pm 2.08\%$ y en un $10.20 \pm 1.98\%$ respectivamente, cifras similares a las observadas del efecto único de la dapsona. Estos resultados nos permiten sugerir que la dapsona no ejerce su efecto modulador a través de las subunidades GluN2A y GluN2B del receptor de NMDA y que debido al comportamiento de la corriente, la acción de la DDS puede asociarse a la subunidad GluN1.

INTRODUCCIÓN

La presente investigación busca el mecanismo de acción de la dapsona (DDS), un antibiótico de uso dermatológico que recientemente se ha empleado como agente neuroprotector en la terapéutica de pacientes con lesión cerebral traumática y/o accidente cerebrovascular, padecimientos cuya incidencia anual es de aproximadamente 10 millones de personas en todo el mundo y proyecta a convertirse en la tercera causa de morbilidad mundial para el año 2020, sobrepasando padecimientos complejos como el cáncer de mama, el VIH, las enfermedades cardíacas, las crónicas degenerativas, entre otras (Chung, Yun, & Khan, 2014; Prins, Greco, Alexander, & Giza, 2013). En México, de acuerdo al Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía (INEGI), desde 1990 el trauma craneoencefálico (TCE) se ubica dentro de las diez primeras causas de mortalidad, siendo más frecuente en hombres que en mujeres en una relación de 8:1, y en jóvenes entre 15 y 24 años de edad (Rayo *et al.*, 2009). Siendo los accidentes automovilísticos, las caídas, las heridas por proyectil de arma de fuego y las lesiones ocasionadas por deportes las principales causas de trauma craneal (Carmona, Lima, & Mayorga, 2005).

Se sabe que la modulación de la neurotransmisión excitadora mediada por los receptores a Glutamato (principal neurotransmisor excitador del SNC), especialmente los del tipo NMDA tiene importantes implicaciones en el origen del daño y muerte celular que se observa en diversas condiciones como el accidente vascular cerebral, la hipoxia, la isquemia, la epilepsia, entre otras, así como en patologías de enfermedades neurodegenerativas crónicas como el Alzheimer, Parkinson, Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (Flores-Soto *et al.*, 2012). Estudios en la década de los 90's de modelos de isquemia-perfusión, sugirieron que la dapsona puede influenciar en las funciones del SNC suprimiendo la neurotoxicidad inducida experimentalmente, motivo por el cual se ha propuesto como agente neuroprotector modulador de los receptores a glutamato NMDA (Santamaría, Ordaz, Rubio, Solís, & Ríos, 1997). El receptor de NMDA se compone esencialmente de cuatro subunidades transmembranales de unión a glicina, D-serina o a glutamato, siendo las más abundantes las GluN1 y GluN2A-D (Stepulak, Rola, Polberg, & Ikonomidou, 2014; Stawski, Janovjak, & Trauner, 2010). En trabajos del Laboratorio de Neuromodulación de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (Villegas, 2014) se confirmó que la dapsona posee un

efecto modulador de la corriente de NMDA, motivo por el cual se planteó la hipótesis de que este fármaco actúa en las subunidades GluN2A o GluN2B, puesto que estas subunidades predominan en el cerebro humano desarrollado y juegan un papel importante en la plasticidad sináptica, el aprendizaje, la memoria, algunos trastornos y ciertas enfermedades neurológicas (Sanz-Clemente, Nicoll, & Roche, 2013).

El siguiente estudio se considera de carácter experimental-transversal; por ser sistemático y controlado con el propósito de predecir y controlar fenómenos en distintas muestras y en distintos momentos a lo largo de un periodo determinado de tiempo. A su vez, el enfoque de la investigación fue cuantitativo, analítico y prospectivo al recopilar información a partir de datos numéricos obtenidos de modelos farmacológicos de causa-efecto.

Para los procedimientos se utilizaron neuronas piramidales de las capas V y VI de corteza motora primaria de ratas macho de la cepa Wistar de 30 días de edad (100–120g) procedentes del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. En los registros se empleó la técnica de célula completa con fijación de voltaje (Bargas et al., 1994) en células con dendritas y axón cortos, que presentaron corrientes de Na⁺ y Ca²⁺, con una capacitancia de 10 a 20pF. Así mismo, en la presente tesis se hace referencia a las características generales y particulares de la corteza cerebral y la corteza motora primaria, área en la que se enfoca esta investigación, se analiza a profundidad al neurotransmisor Glutamato, sus receptores y específicamente el receptor NMDA, su modulación y a dos de los antagonistas de sus subunidades más abundantes, el TCN-201 y el Ifenprodil. Además, para relacionar estos temas con la dapsona, se explica el proceso de la excitotoxicidad, su relación con la lesión cerebral y la isquemia, así como el mecanismo de neuroprotección y aún más importante el uso de la dapsona como neuroprotector para contrarrestar la excitotoxicidad inducida por lesión cerebral.

ANTECEDENTES GENERALES

Corteza Cerebral

La corteza cerebral es una región central en el cerebro de los mamíferos que controla los comportamientos cognitivos complejos. Tiene origen en la región más rostral del tubo neural embrionario, el cual se constituye de células neuroepiteliales (NE) que son capaces de generar el primer grupo de neuronas de la neocorteza y las células gliales radiales (CGR); mismas que son responsables de la producción de neuronas y glía (astrocitos y oligodendrocitos; Sun & Hevner, 2014; Tan & Shi, 2013).

Figura 1. Neuronas de la corteza y sus proyecciones.

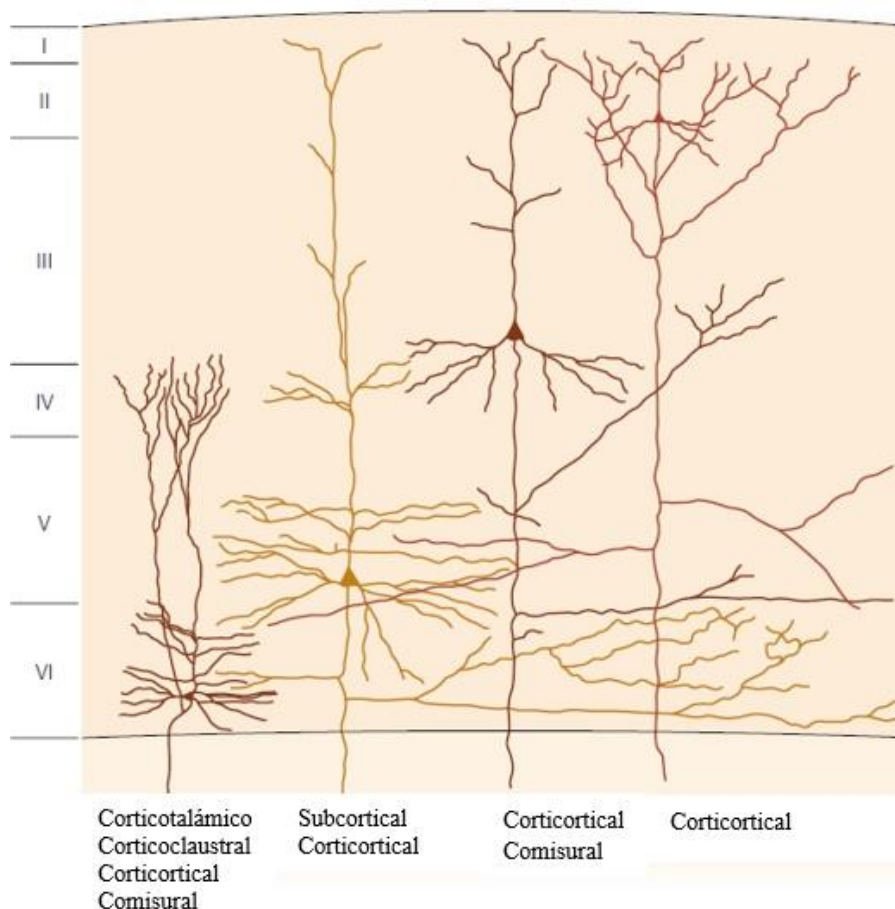


Figura 1. Disposición en capas de la corteza cerebral, además de sus proyecciones y comunicación. Tomada de: Kandel, Schwartz, Jessell, Siegelbaum, & Hudspeth, 2012.

El área total de la superficie de la corteza humana es de aproximadamente 2,000 cm² (Hofman, 2014). Se divide en cinco lóbulos: Frontal, Parietal, Temporal y Occipital los cuales cumplen funciones especializadas. (Walløe, Pakkenberg, & Fabricius, 2014). Además, gracias a la estereología; ciencia matemática basada en estadística y geometría estocástica, se han podido realizar estimaciones de una cantidad de 19 millones de neuronas corticales en cerebros femeninos y 23 millones en cerebros masculinos (Boyce, Dorph-Petersen, Lyck, & Gundersen, 2010; Pakkenberg & Gundersen, 1997). Asimismo de 27.9 millones de células gliales corticales en mujeres y 38.8 millones en hombres (Pelvig, Pakkenberg, Stark, & Pakkenberg, 2008).

La forma de la neocorteza cerebral está organizada en seis capas celulares (Figura 1). La capa uno es una capa acelular (estrato molecular), la dos y cuatro se componen de células esféricas y se les llama estrato granuloso externo e interno, mientras que las capas tres y cinco poseen células de forma piramidal, razón por la cual se les denomina estrato piramidal externo e interno y finalmente y la capa seis nombrada como estrato poliforme o multiforme por la gran variedad de neuronas (Kandel *et al.*, 2012).

Corteza Motora

La corteza motora fue localizada en la circunvolución precentral de simios por Sherrington en 1901 y un año después fue identificada histológicamente por Campbell donde Brodmann había descrito el área 4, ahora corteza motora primaria (M1) y el área 6, ahora corteza motora secundaria o suplementaria (M2; Figura 2; Shipp, Adams, & Friston, 2013; Shipp, 2005). Siendo la corteza motora primaria fue una de las primeras estructuras corticales estudiadas por Fritz y Hitzig mediante experimentación con estimulación eléctrica a finales de 1800 (Hatsopoulos & Suminski, 2011).

Respecto a las conexiones de M1 se sabe que las capas dos y tres de la corteza motora proyectan principalmente a otras áreas corticales, la capa cuatro es agranular, la capa cinco posee neuronas con proyecciones corticoespinales y corticoestriatales (aproximadamente del 30 al 50% de las proyecciones corticoespinales) y que la capa seis proyecta a los núcleos del tálamo (Tsubo, Isomura, & Fukai, 2013; Kandel *et al.*, 2012; Anderson, Sheets, Kiritani, & Shepherd, 2010). En estudios recientes se ha demostrado que la corteza motora tiene baja

densidad neuronal en comparación con otras áreas de la corteza, y se ha relacionado con la delgada y casi indistinguible capa IV además de la capa V donde se encuentran las células Betz, las neuronas más grandes de la corteza, con diámetros tan grandes como 100 micrómetros (Young, Collins, & Kaas, 2013).

Figura 2. Dibujo representativo de la corteza motora primaria (M1) y la secundaria (M2).

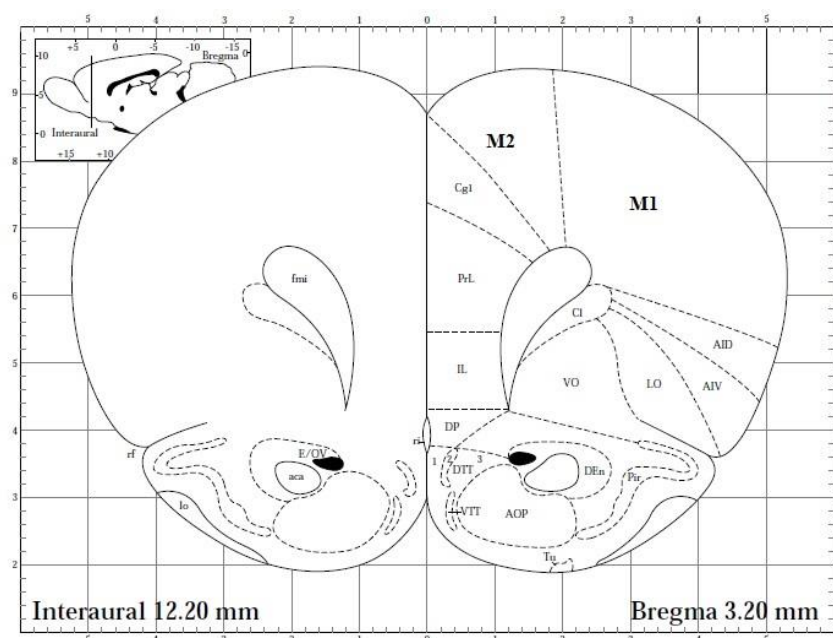


Figura 2. Se observa las coordenadas estereotáxicas de la ubicación de la corteza motora primaria (M1, área 4 de Brodmann) y la corteza motora secundaria (M2, área 6 de Brodmann). Tomada de: Paxinos & Watson, 2007.

En la corteza cerebral, aproximadamente el 80% de las neuronas son neuronas piramidales glutamatérgicas y el 20% restante son interneuronas GABAérgicas no piramidales con axones confinados a la corteza. Por lo que, todas las salidas de la corteza cerebral surgen de las neuronas piramidales glutamatérgicas situadas en una disposición específica de capas que proyectan a objetivos definidos (Fan *et al.*, 2014). La corteza motora primaria contiene una capa V muy grande por lo que se pueden encontrar poblaciones de células ausentes en otras regiones como las llamadas células de Betz o células piramidales gigantes, las cuales pueden ser hasta 20 veces más grandes que otras células piramidales en la misma capa (Castro-Alamancos, 2013). Sin embargo, el tamaño del cuerpo celular no es la única característica discriminativa de las células Betz las dendritas primarias de las células

piramidales gigantes dejan el cuerpo celular de forma asimétrica en casi cualquier punto alrededor de la superficie basal de la célula a diferencia de la mayoría de las células piramidales en las cuales el árbol dendrítico deja el cuerpo celular casi exclusivamente desde ángulos basales, además de que las células Betz poseen un soma heterogéneo con forma piramidal, triangular o en forma de huso (Rivara, Sherwood, Bouras, & Hof, 2003).

Glutamato

La acción excitadora del glutamato en el cerebro y la médula espinal es conocida desde la década de 1950, aunque no fue hasta finales de 1970 que llegó a ser altamente reconocido (Meldrum, 2000). El glutamato (Glu; Figura 3a) es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central de mamíferos, insectos, gusanos redondos y platelmintos, éste provoca cambios en el crecimiento, la morfología y la ramificación de la raíz en plantas como *Arabidopsis thaliana* L. y juega un papel crítico en numerosas funciones, tales como la cognición, el movimiento, el aprendizaje y la memoria (Gou, Wang, & Wang, 2013; Forde, 2014; Lin, Huang, Wu, Lu, & Wang, 2014).

La estimulación de una neurona glutamatérgica causa la liberación de glutamato en la sinapsis, donde se ha estimado que las concentraciones de glutamato se elevan transitoriamente a concentraciones milimolares (Vandenberg & Ryan, 2013). Después de su liberación en la hendidura sináptica, el glutamato remanente es capturado por astrocitos a través de transportadores (GLT1 y GLAST); y convertido a glutamina (Gln) por la glutamina sintetasa (Ramadan, Lin, & Stanwell, 2013). La Gln se libera del astrocito y es recapturada por las neuronas, que la transforman en glutamato con ayuda de la glutaminasa (Figura 3b). El glutamato también se puede sintetizar de novo a partir del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (o de Krebs) utilizando como precursor el α -oxoglutarato (Siegel & Sapru, 2014).

Figura 3. a) Fórmula química del glutamato, b) Síntesis y liberación de glutamato.

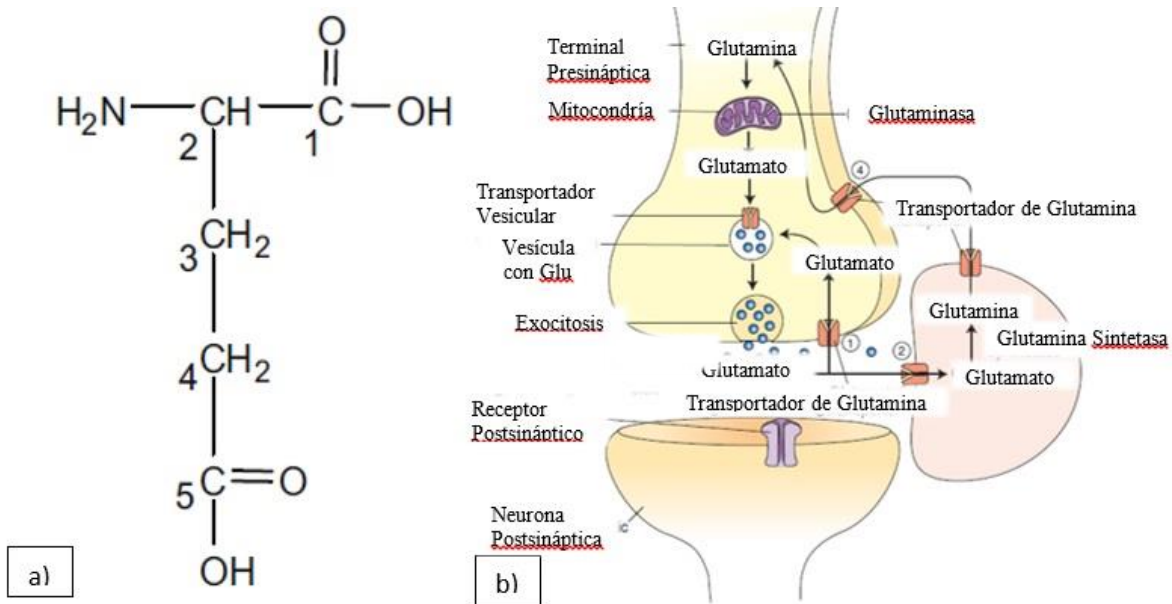


Figura 3. A) Se aprecia la fórmula extendida del glutamato. B) Ciclo del glutamato, desde su síntesis en la neurona presináptica, su liberación dependiente de Ca^{2+} y su recaptura por astrocitos y neuronas. Tomadas de: Ramadan *et al.*, 2013; Siegel & Sapru, 2014.

Receptores de Glutamato

El glutamato interactúa con dos clases de receptores para regular la transmisión sináptica: los receptores de glutamato ionotrópicos (iGluRs) y los receptores de glutamato metabotrópicos (mGluRs; (Willard & Koochekpour, 2013).

Los iGluRs (Figura 4) son canales iónicos activados por ligando principalmente postsináptico, están implicados en casi todos los aspectos del desarrollo y función del sistema nervioso, y su disfunción está asociada a enfermedades neurodegenerativas crónicas devastadoras como el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia y la depresión y los trastornos agudos tales como trauma cerebral y accidente cerebrovascular (Sobolevsky, 2015). Se clasifican en receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA), los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR), y los receptores de Kainato (KAR), llamados así por el agonista sintético que se une selectivamente a los miembros de la subfamilia. Todos los iGluRs forman heterómeros u homómeros a partir de diferentes subunidades para ser funcionales, los mGluRs por otro

lado son una familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Mao, Jin, Xue, Chu, & Wang, 2014).

La interacción del glutamato o de su agonista con los iGluRs resulta en un cambio de conformación que cambia el ángulo de las regiones transmembranales, provocando la abertura de un poro en la membrana donde se produce el flujo de Na^+ , K^+ y/o Ca^{2+} (Figura 4a). Si suficientes iGluRs son estimulados simultáneamente, las altas concentraciones de cationes darán como resultado un potencial de acción (Willard & Koochekpour, 2013).

Figura 4. Estructura y activación de los iGluRs.

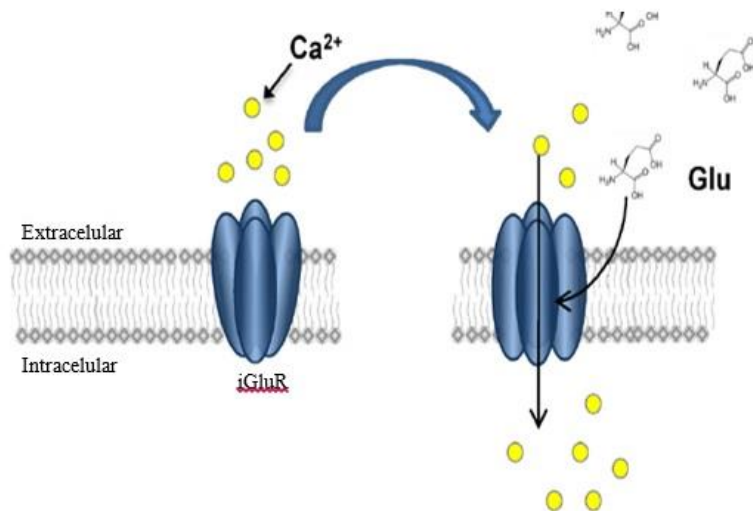
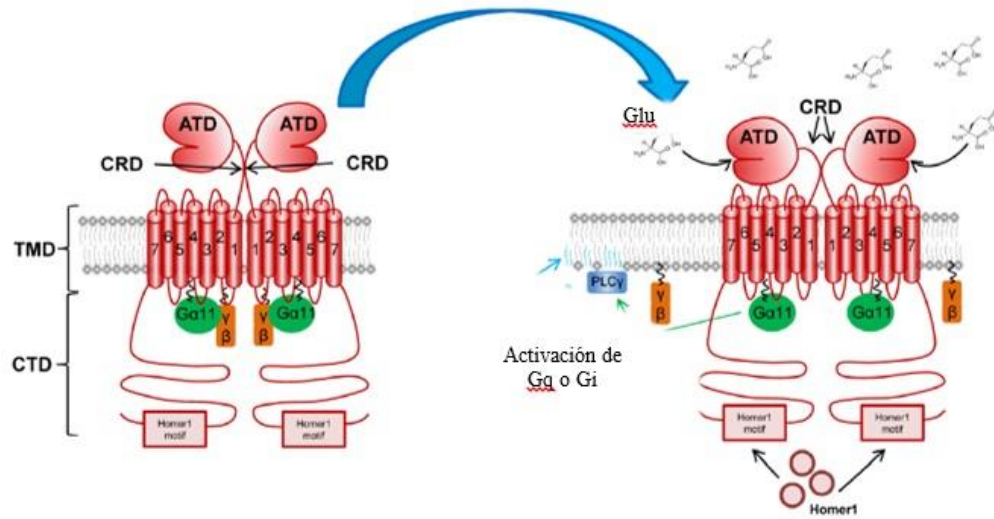


Figura 4. Cambio conformacional de un iGluR que permite el flujo de Ca^{2+} . Tomada de: Willard & Koochekpour, 2013.

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) pertenecen a la clase C de la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Poseen un gran dominio extracelular N-terminal donde se unen los ligandos endógenos, agonistas ortostéricos sintéticos y agonistas competitivos, además de una región de siete dominios transmembranales responsable del acoplamiento de proteínas G (Figura 5). Se han identificado ocho subtipos de receptores que se dividen a su vez en tres grupos principales en base a su homología de secuencia, mecanismo de transducción de señales y perfiles farmacológicos (Montana & Gereau, 2011). El grupo I GLuR1 y 5 (principalmente postsinápticos) activan proteínas G estimuladoras (G_q) e inicia la señalización a través de la fosfolipasa C (PLC)/Inositol 1,4,5-trifosfato/diacilglicerol (vía PLC/IP₃/DAG). Los grupos

II (mGluR2 y 3) y III (mGlu4, 6, 7, 8), que son principalmente presinápticos activan proteínas G inhibitoras (G_i), lo que resulta en una disminución de los niveles de cAMP (Willard & Koochekpour, 2013).

Figura 5. Estructura y activación de los mGluRs.



Tomada de: Willard & Koochekpour, 2013.

Los mGluRs se expresan ampliamente en todo el cerebro, con excepción de mGlu6 que se encuentra exclusivamente en la retina. mGlu1 se encuentra principalmente en la corteza cerebelosa, la sustancia nigra, el hipocampo y ligeramente en la neocorteza, la amígdala y el cuerpo estriado. mGlu5 se halla en toda la corteza cerebral, el hipocampo, el cuerpo estriado y la amígdala, mientras que mGlu3 y 7 son de interés para el procesamiento del dolor por su ubicación en la sustancia gris periacueductal (PAG), (Montana & Gereau, 2011).

Receptor NMDA

Los receptores de NMDA, han recibido mucha atención en los últimos decenios, debido a su papel clave en muchos tipos de plasticidad neuronal y por su participación en la excitotoxicidad neuronal (Vyklícky *et al.*, 2014). Los NMDARs se ensamblan a partir de cuatro subunidades transmembranales que se unen a glicina o D-serina (GluN1 y GluN3A/B) o que son activadas por glutamato (GluN2A-D), (Stepulak *et al.*, 2014; Stawski *et al.*, 2010).

La subunidad GluN1 consta de 22 exones; los exones 5, 21 y 22 pueden ser empalmados alternativamente para producir ocho isoformas distintas y es una parte obligada de todos los complejos tetraméricos de receptores de NMDA, la mayoría de ellos compuestos por dos subunidades GluN1 y dos GluN2 (Monaghan & Jane, 2009; Stawski *et al.*, 2010). Las subunidades GluN2 son las principales determinantes de las propiedades funcionales de los NMDARs, incluyendo características tales como afinidad al agonista, la cinética de inactivación, la conductancia de un solo canal y la permeabilidad a Ca^{2+} (Bai *et al.*, 2013), mientras que las subunidades GluN3 no forman receptores funcionales solos, pero pueden co-ensamblarse con complejos de GluN1 / GluN2. GluN2B y GluN2D predominan en el cerebro neonatal, pero en el cerebro humano desarrollado, las formas más abundantes son GluN2A y en algunas regiones por GluN2C; a pesar de esto, GluN2A y GluN2B juegan un papel importante en la plasticidad sináptica, el aprendizaje, la memoria, algunos trastornos y ciertas enfermedades neurológicas. (Stuart Cull-Candy, Brickley, & Farrant, 2001; Sanz-Clemente, Nicoll, & Roche, 2013).

Todas las subunidades comparten la misma conformación membranal (Figura 6): un dominio de unión a ligando (LBD), tres dominios transmembrana (TMD: M1, M3 y M4), un dominio de horquilla hidrofóbico (M2), un dominio N-terminal extracelular (ATD) y un dominio C-terminal intracelular (CTD), (Mao *et al.*, 2014). El dominio de unión a ligando de cada subunidad se compone de dos segmentos (S1 y S2) y contiene el sitio de unión del agonista para el control de la apertura del canal iónico (Kvist, Steffensen, et al., 2013). Los dominios transmembrana forman el canal iónico heterotetrámero, el dominio N-terminal controla la velocidad de inactivación y contiene sitios de unión para compuestos moduladores alostéricos específicos como Zn^{2+} (GluN2A y 2B), ifenprodil (GluN2B) y poliaminas (GluN2B), y el dominio C-terminal se asocia con proteínas de densidad postsináptica facilitando la señalización intracelular, lo que es fundamental para la neuroplasticidad (Karakas & Furukawa, 2014).

Los receptores de NMDA se activan significativamente más lento que los AMPA y los Kainato (Blanke & VanDongen, 2009). Para activar un NMDAR compuesto por las subunidades GluN1 y GluN2 se requieren dos moléculas de glicina y dos moléculas de glutamato (los NMDR compuestos por GluN1 y GluN3 requieren solo una glicina para

activarse); la glicina se encuentra a una concentración de $4.2 \pm 1.6M$ en el líquido cefalorraquídeo y su EC_{50} para actuar como coagonista en los receptores GluN1 y GluN2 es de $\sim 1 \mu M$. La unión del agonista y el coagonista abre canales iónicos selectivos para Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , siendo éste último 10 veces más permeable en comparación con el Na^+ debido a la selectividad del canal proporcionada por una asparagina que reside en todas las subunidades del receptor NMDA, confiriendo alta permeabilidad al Ca^{2+} (Plitman *et al.*, 2014; Vyklicky *et al.*, 2014).

Figura 6. Estructura del receptor NMDA.

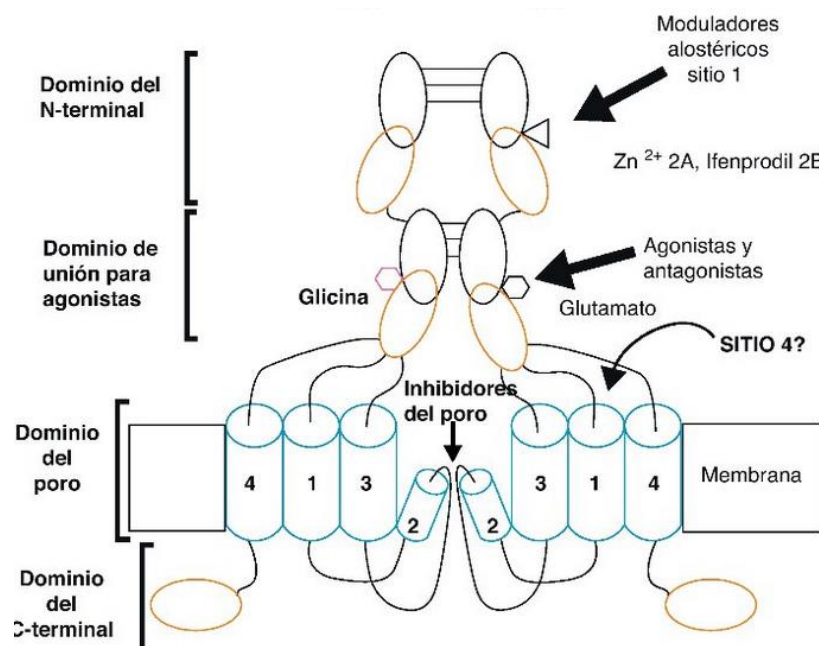


Figura 6. Se observa el Dominio N- terminal (ATD), el Dominio de Unión a Ligando (LBD), Tres Dominios Transmembrana (TMD), el Dominio C-Terminal (CTD), un Dominio de Horquilla hidrofóbica (M2) y los sitios de unión de moduladores del receptor NMDA Tomada de: Flores-Soto *et al.*, 2012.

Los receptores de NMDA compuestos por las subunidades GluN1 / GluN2A-B muestran mayor sensibilidad al bloqueo dependiente de voltaje por Mg^{2+} y mayor permeabilidad y conductancia por canal al Ca^{2+} que los receptores compuestos por GluN1 / GluN2C-D. A su vez, los NMDARs con GluN1 / GluN2A poseen la probabilidad de apertura más alta (0.5) con una duración de activación de 30 a 50 ms, la probabilidad de apertura de los receptores de NMDA con GluN1 / GluN2B es de tres a cinco veces menor que la anterior y los que contienen las subunidades GluN1/ GluN2C-D tienen una probabilidad de apertura

muy baja (0.01 a 0.04), tardando de 2000 a 4000 ms en activarse (Wyllie, Livesey, & Hardingham, 2013).

Modulación del receptor NMDA

Un gran número de moléculas naturales y sintéticas han sido identificadas como moduladores de los receptores de NMDA, llamados así por unirse al receptor y causar aumento o disminución en la respuesta máxima o en la afinidad de su agonista. Algunos de estos moduladores como el Zn^{2+} , las poliaminas y los protones son moléculas endógenas que ejercen efectos reguladores sobre los NMDAR en condiciones fisiológicas y patológicas. (Williams, 2009; Ogden & Traynelis, 2011).

Durante las últimas tres décadas se han encontrado compuestos que interactúan con el receptor NMDA en alguno de sus cuatro sitios de unión: el poro del canal iónico, el sitio de unión de glutamato, el sitio de unión de glicina y el dominio N-terminal (Figura 7; Monaghan, Irvine, Costa, Fang, & Jane, 2012).

Figura 7. Receptor NMDA (GluN1/GluN2) y sus sitios de unión.

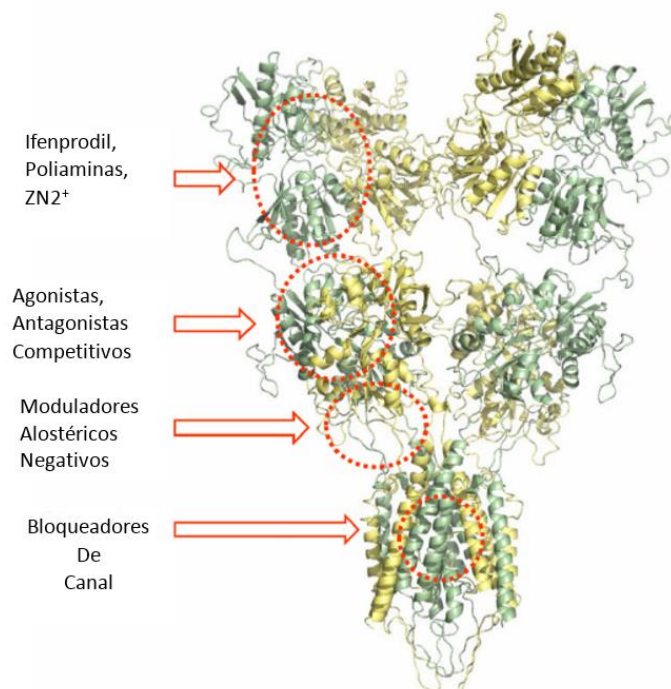


Figura 7. Se aprecia los sitios de unión de moduladores y antagonistas del receptor NMDA en cada uno de sus dominios. Tomada de: Santangelo *et al.*, 2012.

Los primeros compuestos identificados fueron agonistas y antagonistas para el sitio de unión del glutamato (ácidos D- α -aminoadípico y D-2-amino-5-fosfonopentanóico). Poco después al corroborar la unión de glicina al receptor NMDA para su activación, se reconocieron antagonistas parciales y competitivos de la glicina como la ketamina y la fenilciclidina. También se han encontrado bloqueadores del canal iónico como el MK-801 (Monaghan *et al.*, 2012).

La industria farmacéutica ha desarrollado antagonistas para los diferentes sitios de unión del receptor NMDA como herramientas para estudiar sus propiedades y para el desarrollo de moléculas terapéuticamente útiles (Hansen, Ogden, Yuan, & Traynelis, 2014; Santangelo *et al.*, 2012). Los antagonistas más importantes se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Agentes selectivos para los NMDAR.

Agente	Acción	Selectividad
Ifenprodil	Inhibición no competitiva de GluN2B	GluN2B > 2A/2B > 2D = 2C =2 A
Haloperidol	Inhibición no competitiva de GluN2B	GluN2B > 2A/2B > 2D = 2C =2 A
Ro 8.4304	Inhibición no competitiva de GluN2B	GluN2B > 2A
Felbamato	Inhibición no competitiva de GluN2B	GluN2B > 2C = 2A
Conantocin-G	Inhibición competitiva de GluN2B	GluN2B > 2A = 2C
D-CPPene	Inhibición competitiva de GluN2B y GluN2A	GluN2A = 2B > 2C = 2D
PPDA	Inhibición competitiva de GluN2C y GluN2D	GluN2C = 2D > 2A = 2B
Protones	Inhibición de GluN1	GluN2A > 2B > 2C
Zn ²⁺	Inhibición no competitiva de GluN2A	GluN2B solo con GluN1-1a

Tabla 1. Tomada de: (Stuart Cull-Candy *et al.*, 2001).

TCN-201

El 3-cloro-4-fluoro-N - [(4 - [(2- (fenil carbonil) hidrazina) carbonil] fenil) metil] bencenosulfonamida (TCN-201 o compuesto 1) es un antagonista selectivo de la subunidad GluN2A del receptor NMDA que actúa como modulador alostérico negativo del sitio de unión a glicina de GluN1 (Hansen, Ogden, Yuan, & Traynelis, 2014). La concentración

inhibidora media del TCN-201 es de $0.746 + 0.133 \mu\text{M}$ cuando la glicina se encuentra a una concentración de $10 \mu\text{M}$ (Hansen, Ogden, & Traynelis, 2012).

Recientemente se ha asociado la inhibición de la subunidad GluN2A del receptor de NMDA por el TCN-201 en la disminución de la búsqueda de nicotina en modelos de recaída de adicciones (Gipson *et al.*, 2013). Sin embargo, en neuronas de hipocampo transfectadas con Tat (transactivador de la transcripción de proteínas del VIH) se observó que el TCN-201 no indujo recuperación de la poda dendrítica ni la pérdida de la densidad de espinas; a su vez, tampoco protegió a las neuronas contra la muerte celular como otros antagonistas del receptor de NMDA (Shin, Kim, & Thayer, 2012).

Ifenprodil

El ifenprodil (Figura 8) fue desarrollado originalmente como un agente vasodilatador, basado en su actividad como un antagonista adrenérgico α_1 . Sin embargo, los estudios realizados en la década de los 80's e inicios de los 90's demostraron que también era un antagonista no competitivo de los receptores NMDA, específicamente de la subunidad GluN2B (Williams, 2009), siendo su afinidad de 200 a 400 veces más potente para los receptores GluN1 / GluN2B que para GluN1 / GluN2A, GluN1 / GluN2C, o GluN1 / GluN2D ($\text{IC}_{50}=1\mu\text{M}$; André *et al.*, 2004; Traynelis *et al.*, 2010). La interacción del ifenprodil con el receptor NMDA reduce el estado de apertura del canal iónico, inhibe la afluencia de iones Ca^{2+} dentro de la célula, aumenta la afinidad de protones y de Zn^{+} para bloquear el receptor y disminuye la afinidad del glutamato y la glicina por sus sitios de unión (Brittain *et al.*, 2012; Amico, Paganelli, Myers, & Popescu, 2012).

Debido al análisis de la estructura cristalina de los receptores de NMDA se ha encontrado que el ifenprodil se une al dominio amino terminal de la subunidad GluN2B y en hendiduras de los dominios de unión a ligando (LBD) de GluN1 y GluN2B, sin embargo, para poder anclarse a este sitio es necesario un cambio conformacional del dímero ATD y un pH de 7.4 (Amico *et al.*, 2012; Bhatt, Prakash, Suryavanshi, & Dravid, 2013; Falck, Begrow, Verspohl, & Wunsch, 2014).

Además de actuar como antagonista selectivo, se ha estudiado el papel del ifenprodil en la neurogénesis y en la conducta. Se ha observado que el tratamiento con ifenprodil aumenta la proliferación de células madre neurales y que en bajas dosis ayuda a las interacciones sociales en general (Bunk, König, Prehn, & Kirby, 2014; Morales, Varlinskaya, & Spear, 2013).

Compuestos con estructuras similares al ifenprodil (Figura 8) como el haloperidol y la nilidrina o derivados de él, como el CP-101606, Ro 8-4304, Ro 25 hasta 6981 y CI-1041 también han demostrado ser antagonistas selectivos de la subunidad GluN2B y se presume que comparten el mismo sitio de unión al receptor de NMDA (Traynelis *et al.*, 2010; Williams, 2009).

Figura 8. Estructura química del ifenprodil y algunos de sus derivados.

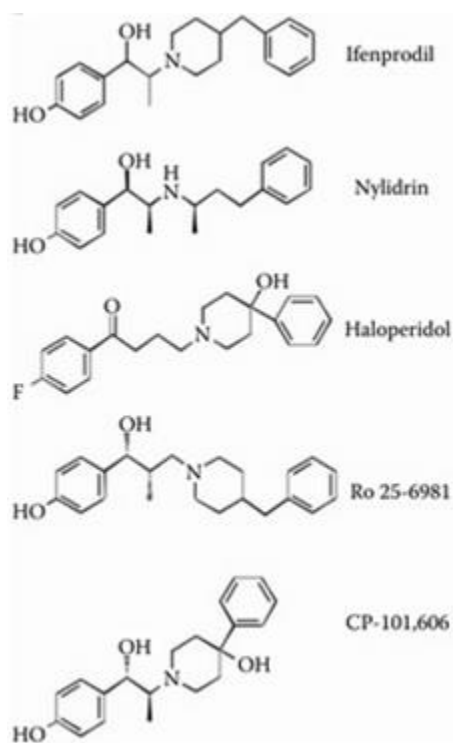


Figura 8. Estructura química del ifenprodil y algunos de sus derivados que también funcionan como antagonistas. Tomada de Williams, 2009.

Excitotoxicidad

La excitotoxicidad se refiere a la capacidad de los compuestos de glutamato y otros relacionados para destruir neuronas por transmisión sináptica excitadora prolongada.

Normalmente, la concentración de glutamato liberado en la hendidura sináptica se eleva a niveles altos (aproximadamente 1 mM), pero se mantiene en este nivel durante unos pocos milisegundos. Si las concentraciones anormalmente altas de glutamato se acumulan en la hendidura, la excesiva activación de receptores de glutamato neuronales puede excitar literalmente las neuronas a la muerte (Purves *et al.*, 2001).

Esta premisa fue sugerida originalmente por Lucas y Newhouse en 1957, quienes observaron que el glutamato monosódico, un aditivo de alimento popular en restaurantes chinos, mostraba efectos neurotóxicos tras su administración sistémica en la capa interna de la retina del ratón. Posteriormente, se demostró que ejerce el mismo efecto en neuronas periféricas y centrales en ratones, ratas, conejos y monos (Lai, Zhang, & Wang, 2014b).

El glutamato es el neurotransmisor excitador predominante en el SNC de mamíferos y es esencial para la función neuronal normal y la neurotransmisión. Sin embargo, la acumulación de este en el espacio extracelular como resultado de varios procesos patológicos en el cerebro puede conducir a la excitotoxicidad, un fenómeno asociado con muchas enfermedades humanas como la esquizofrenia, la esclerosis lateral amiotrófica, la epilepsia y el glioblastoma (Noch & Khalili, 2009).

La activación continua de receptores de NMDA (especialmente el subtipo GluN1 / GluN2B) conduce a incrementos en las cargas de Ca^{2+} intracelular y la actividad de enzimas catabólicas, que pueden desencadenar una cascada de acontecimientos como la despolarización de la membrana mitocondrial, la activación de caspasas, la producción de especies reactivas de oxígeno, los radicales libres de nitrógeno, la depleción de ATP como consecuencia del daño mitocondrial y la activación de proteínas (quinasas, proteasas, fosfolipasas, sintetasa de óxido nítrico), que conduce a la lesión neuronal y finalmente llevan a la apoptosis o necrosis (Beal, 1992; Dong *et al.*, 2009; Noch & Khalili, 2009).

Relación entre lesión cerebral, isquemia y excitotoxicidad.

Las lesiones cerebrales, como las que se producen después del trauma craneoencefálico (TCE) y el accidente cerebrovascular, se caracterizan por dos áreas distintas: núcleo y penumbra. El núcleo es el área sometida directamente a un impacto físico

o anoxia (ictus) y muestra una pérdida casi completa de células neuronales debido a la necrosis (muerte celular aguda). La penumbra, situada inmediatamente fuera del núcleo no es sometida a lesión directa, sin embargo, sufre de la lesión secundaria y muestra signos de apoptosis (muerte celular retardada) (Belousov, 2012).

La lesión cerebral traumática (LTC) induce daño primario que incluye hematomas, contusiones, isquemia e inflamación difusa, lo que resulta en el deterioro neurológico y como consecuencia puede iniciar el daño cerebral secundario con la liberación de neurotransmisores, estrés oxidativo, daño ocasionado por calcio como resultado de disfunción mitocondrial, inflamación y conducir a la muerte celular en días o semanas (Lin, Chen, Yang, & Shih, 2014).

Los mecanismos de excitotoxicidad juegan un papel importante en el daño celular de diversas enfermedades, y la excitotoxicidad por glutamato es la vía final común que resulta en lesión cerebral para muchas enfermedades aparentemente no relacionadas (Moritani, Smoker, Sato, Numaguchi, & Westesson, 2005). Por eso se ha sugerido que uno de los factores más críticos responsables de la muerte neuronal secundaria es la liberación excesiva de glutamato de las células lesionadas. Los mecanismos de excitotoxicidad del glutamato están bien caracterizados e incluyen hiperactivación de los receptores de glutamato (principalmente NMDARs), entrada masiva de iones Ca^{2+} y sobreactivación de las rutas de señalización dependientes de Ca^{2+} que eventualmente causa la muerte de las neuronas (Belousov, 2012).

Además de dañar neuronas, el glutamato puede perjudicar a las células gliales, como son los astrocitos y los oligodendrocitos. Los astrocitos son las células gliales más abundantes en el SNC, transportan nutrientes y participan en la neurotransmisión. Durante la lesión cerebral traumática la supervivencia neuronal está fuertemente afectada por la hipofunción de las células gliales que no pueden captar glutamato ni aportar sustratos para el metabolismo energético neuronal (Lin, Chen, *et al.*, 2014).

Neuroprotección

La Neuroprotección se refiere al uso de cualquier modalidad terapéutica que previene, retrasa o revierte la muerte celular neuronal resultante de diferentes condiciones cerebrales como lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular isquémico y enfermedades neurodegenerativas (Levin & Peeples, 2008; Minnerup, Sutherland, Buchan, & Kleinschnitz, 2012).

Varios autores usan como definición de agente neuroprotector a una intervención que influencia favorablemente el proceso de una enfermedad o la patogénesis subyacente para producir efectos benéficos, incluyendo términos como neurorescate y neurorestauración (Miranda & Azaldegui, 2004).

Se han propuesto más de 500 productos como agentes neuroprotectores por sus posibles propiedades neuroprotectoras en diversos estados de enfermedad, incluyendo eliminadores de radicales libres, agentes antiexcitotóxicos, inhibidores de la apoptosis, agentes anti-inflamatorios, factores neurotróficos, quelantes de iones metálicos, moduladores de canales iónicos y terapia génica, cuyo origen va desde fármacos establecidos hasta productos nuevos de la biotecnología (Levin & Peeples, 2008).

El desarrollo en la atención neuronal crítica ha progresado gracias a la investigación y ha sido un factor importante para mejorar el pronóstico de pacientes gravemente lesionados del cerebro, sin embargo, hasta la fecha no existen opciones de tratamiento farmacológico neuroprotector específico y con eficacia clínica demostrada para pacientes en situaciones como lesión traumática cerebral o isquemia (Marklund & Hillered, 2011).

Dapsona

La dapsona (DDS) o 4,4'-diaminodifenilsulfona, fue sintetizada en 1908 por Emil Fromm, profesor de química orgánica en la Universidad de Freiburg en Alemania y por Jakob Witman quienes descubrieron por primera vez la síntesis de sulfonas durante sus experimentos en la producción de colorantes azoicos (Zhu & Stiller, 2001; V. E. G. Wozel, 2010). Los compuestos de sulfonamida fueron los primeros en ser sometidos a ensayos clínicos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, permitiéndole recibir a Gerhard

Domagk el Premio Nobel de Medicina por el descubrimiento del efecto antibacteriano del Prontosil en 1939 (Wolf, Tuzun, & Tuzun, 2000).

No fue hasta 1937 cuando dos grupos de investigación; Buttle, Stephenson y Smith en Inglaterra y Fourneau, Trefouel y Nitti en Francia estudiaron los efectos quimioterapéuticos de la dapsona para tratar infecciones estreptocócicas en ratones (Zhu & Stiller, 2001; Wolf *et al.*, 2000).

Actualmente, la dapsona es un compuesto aceptado en la terapia de una amplia gama de trastornos dermatológicos y sistémicos como la lepra, la malaria, la tuberculosis e infecciones por *Pneumocystis carinii* y *Toxoplasma gondii* en pacientes VIH-positivos gracias a los estudios realizados en la década de los 50's por dos investigadores de Portugal; Esteves y Brandão quienes informaron de la eficacia de la DDS en la dermatitis herpetiforme y por Sneddon y Wilkinson en 1956 por el uso de dapsona para tratar la dermatosis pustulosa subcórnea (Tingle *et al.*, 1997; Zhu & Stiller, 2001; Azizi & Bahadori, 2011).

Químicamente, la dapsona es un derivado de anilina. Estructuralmente es la sulfona más simple, con las cuales comparte la estructura de un átomo de azufre que uno a dos átomos de carbono (Figura 9). Dentro de las características físicas encontramos que la solubilidad de la DDS varía dependiendo del disolvente utilizado, por ejemplo: Agua, 0.2 mg/ml y Metanol 52 mg/ml (V. E. G. Wozel, 2010).

Figura 9. Estructura de la dapsona.

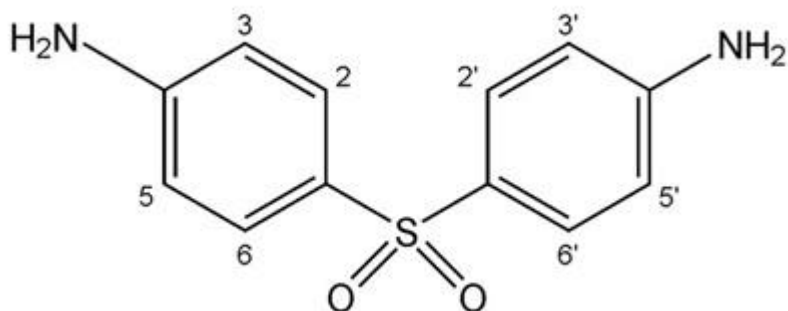


Figura 9. La dapsona es un derivado de la anilina y la sulfona más simple. Tomada de Hummel, Gannett, Aguilar, & Tracy, 2008.

Farmacología

Después de la administración oral, la dapsona es casi totalmente absorbida desde el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad de más de 86% (Pieters & Zuidema, 1987). El pico de concentración sérica máxima se alcanza en aproximadamente 4 horas con valores entre 0.63 y 4,82 mg/L posterior a la ingesta de una dosis única de 50 a 300 mg de dapsona (V. E. G. Wozel, 2010), aunque el intervalo de concentración de suero terapéutico de DDS puede ser definida como 0,5 a 5 mg /L (Zuidema, Hilbers-Modderman, & Merkus, 1986).

Al llegar a hígado la dapsona es metabolizada a través de las reacciones de oxidación de N-acetilación y N-hidroxilación (Ashurst, Wasson, Hauger, & Fritz, 2010). La DDS tiene un porcentaje de unión a proteínas de 70 a 90, mientras que su principal metabolito monoacetilado (MADDS) es casi de unión completa a proteínas. El volumen de distribución de la dapsona se estima en 1.5 L/kg. La relación de acetilación (MADDS: dapsona) muestra una distribución bimodal genéticamente determinada y permite la definición de acetiladores 'rápidos' y 'lentos' (Zuidema *et al.*, 1986).

Alrededor del 70 a 80% de la dapsona es excretada en la orina como compuestos acetilados, metabolitos hidroxilados o conjugados en parte como N-glucurónidos y N-sulfatos, mientras que el resto es eliminada en la bilis (Ellard, 1966; Zuidema, 1986). Después de una sola dosis de dapsona, aproximadamente el 50% se excreta durante las primeras 24 horas, sin embargo se conoce que a veces circula en el sistema enterohepático, dando como resultado una vida media relativamente larga de la droga de 24 a 30 horas (Ashurst *et al.*, 2010; Zhu & Stiller, 2001).

Algunos padecimientos como la enfermedad hepática alcohólica disminuyen la unión a proteínas de la dapsona, a su vez, la enfermedad celíaca y la dermatitis herpetiforme pueden retrasar su absorción oral. Fármacos como la rifampicina aumentan la velocidad de eliminación de la dapsona, la pirimetamina incrementa el volumen de distribución y el probenecid disminuye el aclaramiento renal de la DDS (Zuidema *et al.*, 1986).

La dapsona posee acción bacteriostática como agente antimicrobiano. Inhibe la síntesis del ácido dihidrofólico compitiendo con el ácido para-aminobenzóico por el sitio

activo de la dihidropteroato sintasa (G. Wozel & Blasum, 2013). Además se ha informado que la DDS participa en otros procesos celulares que se producen en células eucariotas, tales como la inflamación, la migración y la apoptosis (Cho *et al.*, 2010), por lo que es utilizada en una serie de condiciones dermatológicas, particularmente aquellas con predominio de neutrófilos, dado que inhibe la activación de los mismos por adhesión a IgA, disminuye su función quimiotáctica, la actividad de los metabolitos de oxígeno y enzimas lisosomales (Lorenz, Wozel, & Schmitt, 2012; Piette & Werth, 2012; Debol, Herron, & Nelson, 1997). También se ha encontrado que el fármaco interfiere con la mieloperoxidasa citotóxica (MPO) medida por haluro en leucocitos polimorfonucleares (Stendahl, Molin, & Dahlgren, 1978).

A pesar de que la dapsona es un fármaco generalmente bien tolerado y adecuado para el tratamiento a largo plazo, se pueden presentar reacciones adversas dependientes de la dosis (Lorenz *et al.*, 2012). Los efectos adversos más comunes de este medicamento incluyen metahemoglobinemia, anemia hemolítica y el síndrome de la dapsona (Piette & Werth, 2012).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Dapsona como neuroprotector

Investigaciones recientes han revelado que la dapsona puede influenciar en las funciones del SNC suprimiendo la neurotoxicidad inducida experimentalmente a través de modelos animales de isquemia-reperfusión y lesión con ácido kaínico (KA) y ácido quinolínico (QUIN; G. Wozel & Blasum, 2013).

Posterior a la publicación de Altagracia *et al.*, 1994 en la que se demostró como la dapsona previene la neurotoxicidad inducida por quinolato en ratas, en 1997 se propuso a este fármaco como un agente neuroprotector al actuar en contra de la exitotoxicidad inducida por agonistas del receptor de glutamato, además, se observó que disminuye las concentraciones de GABA en el cuerpo estriado de rata después de inducir neurotoxicidad con ácido quinolínico (agonista de receptores de glutamato NMDA) y ácido kaínico (agonista de receptores de glutamato no NMDA; Santamaría *et al.*, 1997).

Posteriormente, se demostró que tras ejercer daño neuronal inducido por QUIN en el cuerpo estriado la administración única de DDS de 12.5 mg/kg disminuía la actividad convulsiva y contrarrestaba las alteraciones morfológicas inducidas por el ácido quinolínico. Asimismo, se propuso que la dapsona podría tener un mecanismo de acción similar a la zonisamida, un fármaco con un grupo sulfonamida similar al de la DDS, el cual impide selectivamente la afluencia de calcio al bloquear sus canales (Rodríguez *et al.*, 1999).

Además del efecto neuroprotector de la dapsona al antagonizar efectos excitotóxicos por glutamato, se ha planteado su oposición a la sobreproducción de radicales libres, permitiendo que en modelos animales de oclusión vascular el volumen de infarto se reduzca en un 93% luego de una administración de 9.375 mg/kg y en un 92% después de una dosis de 12.5mg/kg (Ríos *et al.*, 2004).

Se sabe que la dapsona posee efectos anti-convulsivos en modelos de epilepsia inducida y que inhibe el daño oxidativo, la respuesta inflamatoria y la muerte apoptótica después de la isquemia-reperfusión. A su vez, su capacidad antagonista de la mieloperoxidasa (MPO) podría explicar su acción antioxidante. También, se ha sugerido que es eficaz en la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias y la síntesis y secreción de prostaglandinas y leucotrienos en ratón. (Díaz *et al.*, 2013).

En 2011, se demostró que la dapsona tiene potencial para actuar como agente neuroprotector con respecto a la actividad de la MPO, el proceso de peroxidación lipídica (LP) y la función de recuperación motora posterior a un modelo de lesión de la médula espinal al observar una mejoría en la capacidad motora con respecto al grupo control (Díaz *et al.*, 2011).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque la dapsona ha pasado por diferentes controles de calidad y su consumo es aceptado y regulado, se sabe de padecimientos como la metahemoglobina inducida por diaminodifenil sulfona (dapsona) la cual se forma por la oxidación del hierro de la hemoglobina con cambio de estado ferroso a férrico y con desvío de la curva de la oxihemoglobina a la izquierda; además se sabe que es letal en pacientes con concentraciones mayores del 70% (Torices, Armenta, García, & Villegas, 2013).

Por este motivo, antes de difundir el uso de la dapsona como neuroprotector se deben dilucidar sus mecanismos de acción, principalmente en los receptores de NMDA, los cuales tras su continua estimulación incrementan las concentraciones del ion Ca^{2+} en el interior de la célula provocando activación de proteínas que conducen a la lesión celular y finalmente llevan a la apoptosis o necrosis (excitotoxicidad; Dong *et al.*, 2009).

Puesto que en la corteza cerebral aproximadamente el 80% de las células son neuronas piramidales glutamatérgicas (Fan *et al.*, 2014) se usaron antagonistas de las subunidades GluN2A y GluN2B co-aplicados con dapsona para medir el efecto en la corriente de NMDA y así poder comprender mejor el rol de esta sulfona en la excitotoxicidad.

HIPÓTESIS

La dapsona reduce la corriente activada por NMDA en neuronas piramidales de la corteza motora primaria al actuar en la subunidad GluN2A o en la GluN2B del receptor.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar si la dapsona actúa en las subunidades GluN2A y GluN2B del receptor de NMDA en neuronas piramidales de las capas V y VI de la corteza motora primaria de rata.

Objetivos Particulares:

Los siguientes objetivos se realizarán en neuronas piramidales de la capa V-VI de la corteza primaria de rata.

- Evaluar el efecto de la dapsona en la corriente activada por NMDA.
- Estudiar el comportamiento de las corrientes inducidas por NMDA en presencia de antagonistas específicos de las subunidades del receptor.
- Caracterizar el efecto de la dapsona sobre la corriente activada por NMDA en presencia de antagonistas específicos de las subunidades del receptor.

METODOLOGÍA

La fase experimental de esta investigación se realizó en el Laboratorio de Neuromodulación perteneciente al Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla con ubicación en la calle 14 Sur, No. 6301, colonia San Manuel en la capital del estado de Puebla. Fue dirigida por el Doctor en Ciencias Jorge Luis Valente Flores Hernández, supervisada por la Licenciada Erika Lorena Arroyo Ríos y comprendió el periodo de tiempo entre los meses de Mayo de 2015 a Enero de 2016.

Para los procedimientos se utilizaron neuronas piramidales de las capas V y VI de corteza motora primaria de ratas macho de la cepa Wistar de 30 días de edad (100–120g) procedentes del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Los registros se realizaron en neuronas piramidales con dendritas y axón cortos (usualmente menores a los 75 μ m), que presentaron corrientes de Na⁺ y Ca²⁺, con una capacitancia de 10 a 20pF, una resistencia de membrana de 1G Ω y una resistencia de acceso menor a 25 M Ω . Por cada condición experimental se obtuvieron un mínimo de 12 neuronas piramidales procedentes de la capa V y VI de la corteza motora primaria. Teniendo en cuenta que no sólo se encuentran neuronas piramidales en la corteza motora primaria se utilizó un muestreo aleatorio estratificado para dividir la población neuronal total en función de sus diferentes características morfológicas y posteriormente se seleccionaron aleatoriamente células que cumplan con los requisitos mencionados anteriormente.

Método de recolección de datos

Los registros electrofisiológicos se obtuvieron con un amplificador para fijación de voltaje (*voltage clamp*) Multiclamp 700A (Molecular Devices, Foster City, CA), controlado con el programa pClamp Versión 8 (Molecular Devices) ejecutándose en una computadora con procesador Pentium y una interfase tipo Digidata 1440A (Molecular Devices).

Técnicas y procedimientos

Protocolo de disociación

El protocolo de disociación que se empleó y que a continuación se expone ha sido descrito previamente por Bargas, Howe, Eberwine, Cao, & Surmeier, 1994; Surmeier, Bargas, Hemmings Jr., Nairn, & Greengard, 1995; Flores-Hernandez *et al.*, 2009, 2000.

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico a una dosis de 35 mg/kg y posteriormente se decapitaron; los cerebros se disecaron rápidamente y se colocaron en solución fría de isetionato con calcio bajo; en milimolares (mM): 140 isetionato de sodio, 2 KCl, 2 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 23 glucosa, 15 HEPES, a un pH de 7.4, y la osmolaridad de 300 – 310mOsm/L, suplementada con (en mM) de : 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NG – nitro – L – arginina, 1 ácido kinurénico, y gaseada con O₂. Posteriormente se obtuvieron rebanadas coronales de 350µm con ayuda de un vibratomo (Campden) mientras estaban sumergidas en la solución fría de isetionato. La disección de la corteza motora primaria estuvo limitada a las capas cinco y seis.

Las rebanadas se mantuvieron de 1 a 6 horas a temperatura ambiente (20-22° C) en una solución salina balanceada de Earle (EBSS, SIGMA) amortiguada con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) suplementada con (en mM) de: 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NG–nitro–L–arginina, 1 ácido kinurénico; burbujeada con 95% O₂/ 5% CO₂, pH = 7.4 ajustado con NaOH, 300 – 310mOsm/L.

Después de al menos 1 hora de incubación se tomaron una o dos rebanadas de corteza motora primaria para su tratamiento enzimático; el cual se realizó en una cámara de cultivo de 40mL con solución salina balanceada de Hanks (HBSS, SIGMA) amortiguada con HEPES, burbujeada con O₂, suplementada con (en mM) de 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NG–nitro–L–arginina, 1 ácido kinurénico y conteniendo 0.3 mg/ml de papaína (Calbiochem) a 35° C, durante 10 min.

Transcurrido el tiempo de la digestión enzimática, el tejido se lavó con la solución de isetionato y posteriormente se disocio mecánicamente con pipetas Pasteur de diferentes calibres (pulidas con calor). La suspensión de células se sembró en cajas Petri de poliestireno

de 35 mm (Nunc Surface, NUNC) montadas en el microscopio de registro. Después de 10 minutos de incubación la suspensión se lavó con una solución de fondo (en mM) de: 140 NaCl, 23 Glucosa, 15 HEPES, 2 KCl, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂ y 1% rojo fenol, burbujeada con O₂, pH = 7.4 ajustado con NaOH, 300 – 310mOsm/L; para su posterior registro por medio de la técnica de fijación de voltaje.

Técnica de célula completa en protocolos de fijación de voltaje (*Whole – Cell recordings*).

Para el registro electrofisiológico de las corrientes inducidas por NMDA en neuronas piramidales de la corteza motora primaria se empleó la técnica de célula completa con fijación de voltaje (Bargas *et al.*, 1994). Los electrodos de registro que se utilizaron son resultado del estiramiento de tubos capilares de borosilicato tipo Corning 8250 (WPI – 1B120F-4 Sarasota, Florida), con una resistencia de 6 – 8MΩ.

La solución interna para registro de corrientes de Ca²⁺ y activadas por NMDA estuvo compuesta de (en mM) de: 175 N – metil – D – glutamina (NMDG), 40 HEPES, 2 MgCl₂, 10 ácido etilen glicol – bis (β – aminoetil éter) – N, N, N', N' – tetraacético (EGTA), 12 fosfocreatina, 3 Na₂ATP, 0.35 Na₃GTP, 0.1 leupeptina, pH = 7.3 con H₂SO₄, 265 – 270mOsm/L. La solución externa contenía (en mM) de: 127 NaCl, 20 CsCl, 5 BaCl₂, 2 CaCl₂, 12 glucosa, 10 HEPES, pH = 7.3 con NaOH, 300 – 305mOsm/L., además, fue suplementada con Glicina 10μM y según sea el caso con antagonistas de las corrientes de NMDA.

Los registros se obtuvieron con un amplificador para fijación de voltaje (voltage clamp) Multiclamp 700A (Molecular Devices, Foster City, CA), controlado con el programa pClamp Versión 8 (Molecular Devices) ejecutándose en una computadora con procesador Pentium y una interfase tipo Digidata 1440A (Molecular Devices).

La resistencia de los electrodos oscilo entre 6 – 10 MΩ en el baño. Una vez que se realizó la ruptura del sello, la resistencia de acceso que resulta de la resistencia de la punta de la pipeta más contribuciones de la membrana adherida a consecuencia de la ruptura del sello, deberá ser menor a 25MΩ. Cuando el cambio de la resistencia serial fue mayor al 50% el experimento se suspendió. El potencial de membrana se mantuvo en -80mV mientras no

hubo protocolo activo para no estimular canales sensibles a voltaje y así poder registrar solo la actividad espontánea de la neurona.

Aplicación de fármacos

Para la inducción de corrientes activadas por ligando NMDA ($100\mu\text{M}$), este mismo se aplicó a través de un sistema de dos capilares con un ángulo de 45° entre ellos y una distancia de 200 a $600\mu\text{m}$ de la célula a registrar. Un capilar contuvo la solución externa (control), y el otro esta misma más el ligando a utilizar. El intercambio de solución se realizó por la apertura de válvulas solenoides (The Lee Company, Essex CO LFAA 1201718H) comandadas por la salida digital del sistema Digidata 1440A y un aparato de control de válvulas fabricado en el laboratorio.

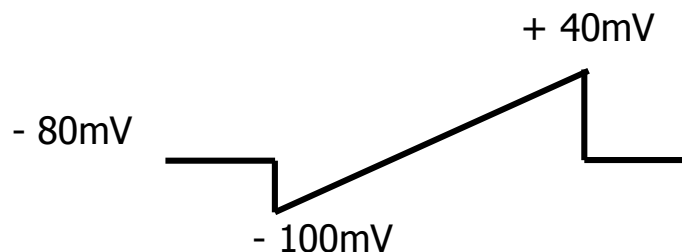
La célula fue bañada por la solución del primer capilar con la solución externa o control adicionada con glicina a una concentración de $10\mu\text{M}$; después del cambio, la célula se bañó durante tres segundos con la solución del segundo capilar que contuvo el ligando a probar para posteriormente regresar a la solución control. El tiempo en que el electrodo detecta el cambio de las condiciones iónicas entre una solución y otra es de tres milisegundos.

Las fármacos fueron preparados como soluciones concentradas en agua desionizada de al menos 1000 veces la concentración final a utilizar y con DMSO en una proporción 1:10.

Protocolos electrofisiológicos.

Los protocolos que se emplearán para el registro electrofisiológico son los siguientes:

Rampa: (-100mV a $+40\text{mV}$) con una duración de 100ms para generar las corrientes de Na^+ y Ca^{2+} para conocer el estado funcional de la célula.



- **Aplicación de NMDA:** El potencial de mantenimiento fue de -80mV durante 15 segundos; de los cuáles tres segundos fueron para la aplicación del neurotransmisor (NMDA $100\mu\text{M}$) a una frecuencia de muestreo de 500 Hz (cada 2 ms). Esta condición experimental se dejó correr hasta obtener tres o cuatro trazos de corriente estable y se tomó como control y lavado del efecto de la aplicación de dapsona y de los antagonistas de las subunidades GluN2A y GluN2B del receptor NMDA.

Neurotransmisor



Con este protocolo se llevaron a cabo las condiciones experimentales que se describen a continuación para la aplicación de los antagonistas del receptor NMDA; en cada una de las cuales se dejó correr de tres o cuatro trazos de corriente estable para analizar.

Condición NMDA + Dapsona: En este protocolo la célula se perfundió continuamente con solución externa a través del capilar uno, con interrupción de tres segundos durante los cuales se bañó a la célula con NMDA + Dapsona disueltos en solución externa y conducidos por el capilar dos a una concentración de 100 y $20\ \mu\text{M}$ respectivamente. Esta condición experimental se tomó como control y lavado del efecto de la aplicación de los antagonistas de las subunidades del receptor NMDA con y sin dapsona.

Condición NMDA + Antagonistas de las subunidades del receptor NMDA: En esta condición experimental la célula se perfundió continuamente con solución externa a través del capilar uno, con interrupción de tres segundos durante los cuales se bañó a la célula con NMDA + TCN 201 o Ifenprodil que estuvieron disueltos en solución externa y fueron conducidos por el capilar dos a una concentración de 100 , 1.3 y $1.6\ \mu\text{M}$ respectivamente. Este protocolo se tomó como control y lavado del efecto de la aplicación de dapsona.

Condición NMDA + Dapsona + Antagonistas de las subunidades del receptor

NMDA: En este protocolo la célula se perfundió continuamente con solución externa a través del capilar uno, con interrupción de tres segundos durante los cuales se bañó a la célula con NMDA + Dapsona + TCN 201 o Ifenprodil, que fueron disueltos en solución externa y conducidos por el capilar dos a una concentración de 100, 20, 1.3 y 1.6 μM respectivamente.

Pruebas estadísticas

Para determinar el comportamiento de una distribución normal se aplicó una prueba Shapiro ($p < 0.05$) a cada uno de los conjuntos de los datos obtenidos. Posteriormente, las diferencias entre las medias de grupos experimentales se analizaron mediante una prueba t-Student para muestras pareadas ($p < 0.05$).

Los ajustes y las gráficas se realizaron en el programa Origin 9 (Microcal Software Inc., Norton Hampton, MA). Los valores en tablas, gráficas o texto, representan el valor de la media de los resultados obtenidos \pm su error estándar (ESM).

BIOÉTICA

Este protocolo de investigación fue desarrollado con la previa revisión, conocimiento y seguimiento de los lineamientos de documentos nacionales e internacionales de normas de seguridad así como de las medidas a seguir para tratar con animales de investigación, uso debido y desecho de los materiales biológicos.

Los biomodelos que se ocuparán para el desarrollo del presente estudio serán proporcionados por el Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Se utilizarán ratas macho de la cepa Wistar de 30 días de edad (100–120g) previamente alojadas en jaulas de policarbonato y mantenidas en condiciones de temperatura constante con un ciclo de luz-oscuridad (12/12 horas) con libre acceso a agua y alimento. El manejo, mantenimiento y sacrificio de los animales se realizará en apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. La norma establece que cualquier procedimiento que cause mayor dolor o molestia en los animales, que la producida por inyección o marcaje en orejas, requerirá el uso de tranquilizantes analgésicos o anestésicos.

El sacrificio de los animales será realizado únicamente por personal de laboratorio que previamente ha recibido la capacitación y la certificación necesaria para el uso y manejo del modelo murino por parte de los expertos del Bioterio Claude Bernard de nuestra Universidad. Los animales serán anestesiados con pentobarbital sódico (apartado 9.4.1.2 de la NOM-062-ZOO-1999) en un espacio bien ventilado y en ausencia de flamas u otras fuentes de ignición (apartado 9.4.1.2.1 de la NOM-062-ZOO-1999).

En la presente investigación se tomará en cuenta los títulos V, XII y XIII de la Ley General de la Salud, con el objetivo de respaldar la investigación y establecer que los animales usados en la experimentación no sufrirán innecesariamente y que durante el tiempo de su manutención se le asegurará el bienestar máximo.

El Título V de la Ley General de Salud, el cual se refiere a la Investigación para la Salud, en el artículo 96, en el apartado III, establece que la investigación para la salud comprende el desarrollo de acciones que contribuyan a la prevención y control de los problemas de salud que se consideren prioritarios para la salud. Este proyecto pretende

obtener conocimiento que puede ayudar a la prevención o tratamiento de problemas sanitarios (Título V, Investigación para la Salud, Ley General de Salud, 2015).

En el Título XII, Control Sanitario de Productos y Servicios y de su importación y Exportación, cabe resaltar que la sustancia que se usará para esta investigación, la dapsona, será usada únicamente con fines de investigación básica, y no se administra a ningún sujeto de investigación (Título XII, Control Sanitario de Productos y Servicios y de su Importación y Exportación, Ley General de Salud, 2015).

En la presente investigación no se busca obtener algún beneficio, ni se pretende promover el uso de la Dapsona sin la sustentación, ni los fundamentos adecuados, como establece el Título XIII de la Ley General de Salud, la publicidad referente a la salud (Título XIII, Publicidad, Ley General de la Salud, 2015).

El laboratorio donde se desarrollara el proyecto cuenta con las normas de bioseguridad de un laboratorio básico, según el artículo 76 del reglamento de la Ley general de salud en materia de investigación para la salud y las normas establecidas en el manual de procedimientos de bioseguridad de la UNAM, capítulo 3, sección 3.1.1, sección 3.1.2 y 3.1.4.

El “Manual de procedimientos en bioseguridad”, fue elaborado por la Comisión de Bioseguridad atendiendo lineamientos y recomendaciones existentes en la materia para el manejo de agentes biológicos descritos en la normatividad y reglamentación nacional; como ejemplo, en la “Ley general de salud en materia de investigación para la salud”, publicado en el Diario Oficial de la Federación, México D. F., 3 de febrero de 1983.

También se tomará en cuenta la Declaración de Helsinki II, la cual establece los principios y derechos universales en estudios de investigación en especies, en este caso la rata Wistar, utilizada en laboratorios. Se hace constatar que se respetará cada a uno de los lineamientos establecidos en la Declaración, vigilando que al animal sufra lo menos posible y se garantice su seguridad en el tiempo en que sea utilizado.

La Declaración de Helsinki, marca que el uso de animales es esencial para el progreso médico, sin embargo, exige que la investigación respete el bienestar de los animales usados en investigación, se debe tratar a los animales de una forma compasiva y que el uso de

animales es necesario para lograr un resultado importante cuando no se disponga de ningún otro método posible (Declaración de la AMM sobre el Uso de Animales en Investigación Biomédica, 2013). Además, como se marca en “Principios para toda investigación médica” en el punto 15 de la Declaración de Helsinki II de la Asociación Médica Mundial, el protocolo de investigación será enviado para su revisión a un comité de ética de investigación.

En cuanto a las medidas de bioseguridad y contención, el transporte y manipulación de material biológico, la desinfección y limpieza de laboratorio se realizarán de acuerdo a las recomendaciones realizadas en el capítulo 8, secciones 8.1., 8.2. y 8.3 del “Manual de procedimientos de bioseguridad de la UNAM”

ESQUEMA DE TRABAJO



Ratas macho cepa Wistar 100 -120 g 30 días de edad

Anestesia con Pentobarbital 35 (mg/Kg)



Decapitación y extracción de cerebro



Obtención de rebanadas coronales de 350µm.
Lamina: Bregma 3.2mm (Paxinos & Watson, 2007)



Disociación Mecánica en Isetionato



Tratamiento enzimático con Papaina en HBSS



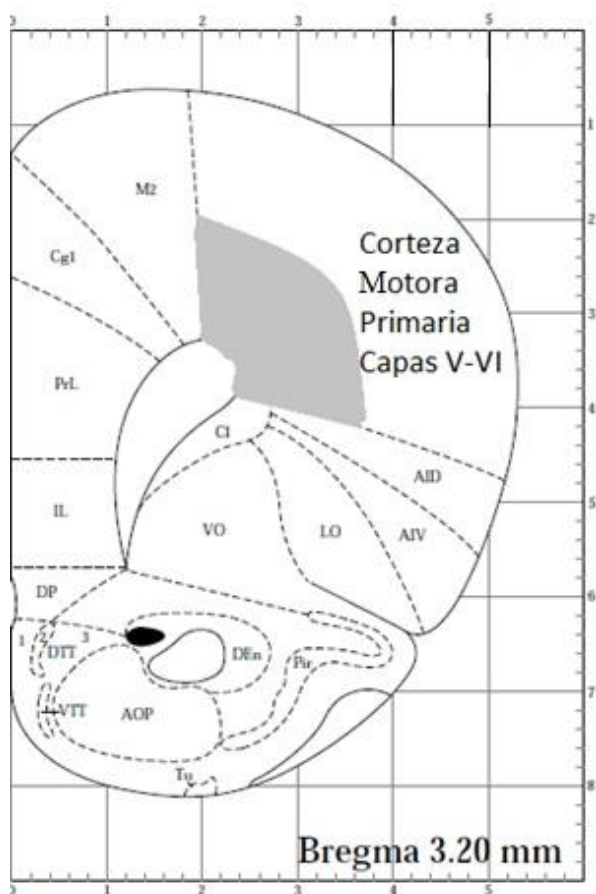
Fijado de neuronas en Caja Petri de Poliestireno (10 min)



Registro Electrofisiológico



Análisis y Conclusiones



RESULTADOS

Se registró un total de 42 neuronas piramidales provenientes de las capas V y VI de corteza motora primaria de rata. Únicamente se tomaron en cuenta aquellas que presentaron una resistencia de membrana mayor a $1\text{ G}\Omega$ y una resistencia de acceso menor a $25\text{ M}\Omega$.

El área de las células registradas se determinó por su capacitancia, una medida electrofisiológica equivalente a $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$, dichas células oscilaron entre 10 y 20 pF. En la figura 10a y 10b se puede observar la morfología de las neuronas piramidales antes y durante el registro.

Figura 10. Microfotografías de neuronas piramidales.

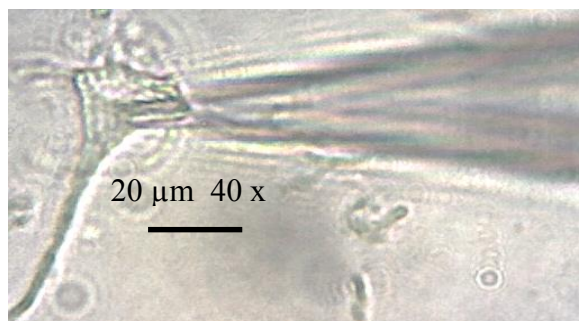


Figura 10. A) Microfotografía de ejemplo de célula agudamente disociada de corteza motora primaria de rata. B) Microfotografía de una neurona durante el registro electrofisiológico de corrientes de NMDA.

PROTOCOLO DE RAMPA

Al inicio de cada registro electrofisiológico se realizó un protocolo de rampa de voltaje de -100mV a +40mV con una duración de 100ms, y se indicó como índice de viabilidad celular la presencia de las corrientes de Na^+ y Ca^{2+} (Gráfica 1).

Gráfico 1. Trazo representativo del protocolo de rampa.

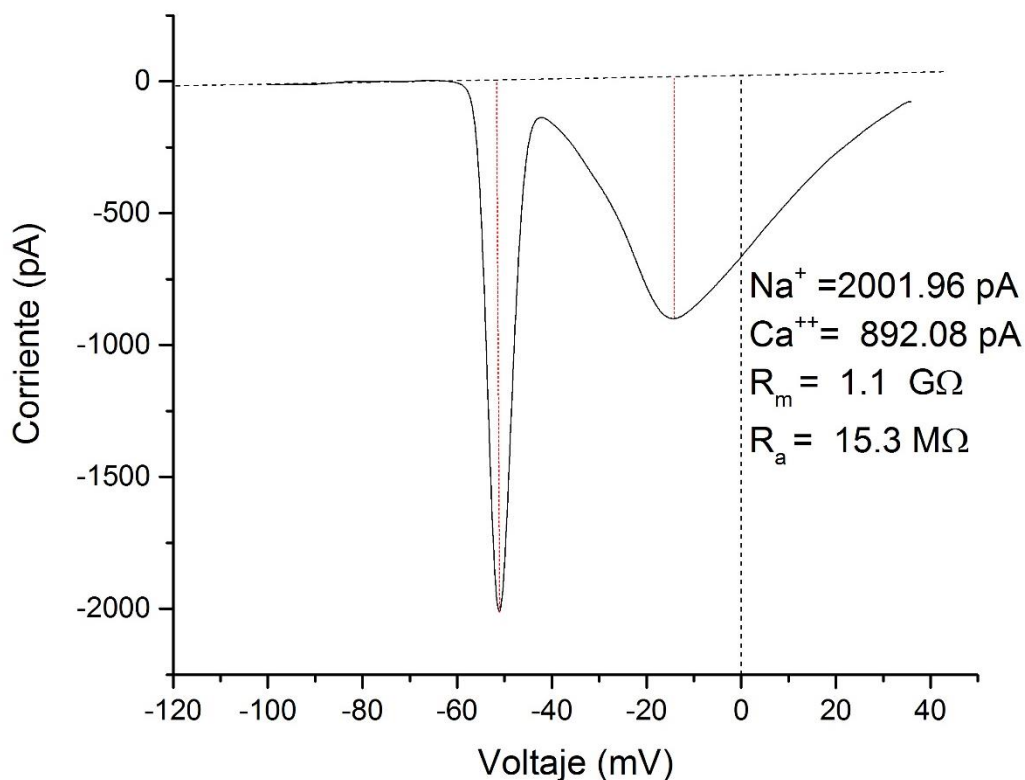


Gráfico 1. Trazo representativo del protocolo de rampa. Se observa la corriente de Na^+ con un pico máximo aproximadamente a -50mV y la corriente de Ca^{2+} con un pico a -10 mV.

CORRIENTES ACTIVADAS POR NMDA

Para generar las corrientes activadas por NMDA (INMDA), se utilizó el protocolo de aplicación anteriormente descrito en el que se suministró el agonista a una concentración de 100 μM en presencia de su co-agonista Glicina a una concentración de 10 μM . Para normalizar las corrientes iónicas se tomó en cuenta el tamaño de la corriente al pico y el

estado estacionario, valores que divididos entre la capacitancia celular da la densidad de corriente (pA/pF; Gráfica 2).

Gráfico 2. Corriente activada por NMDA

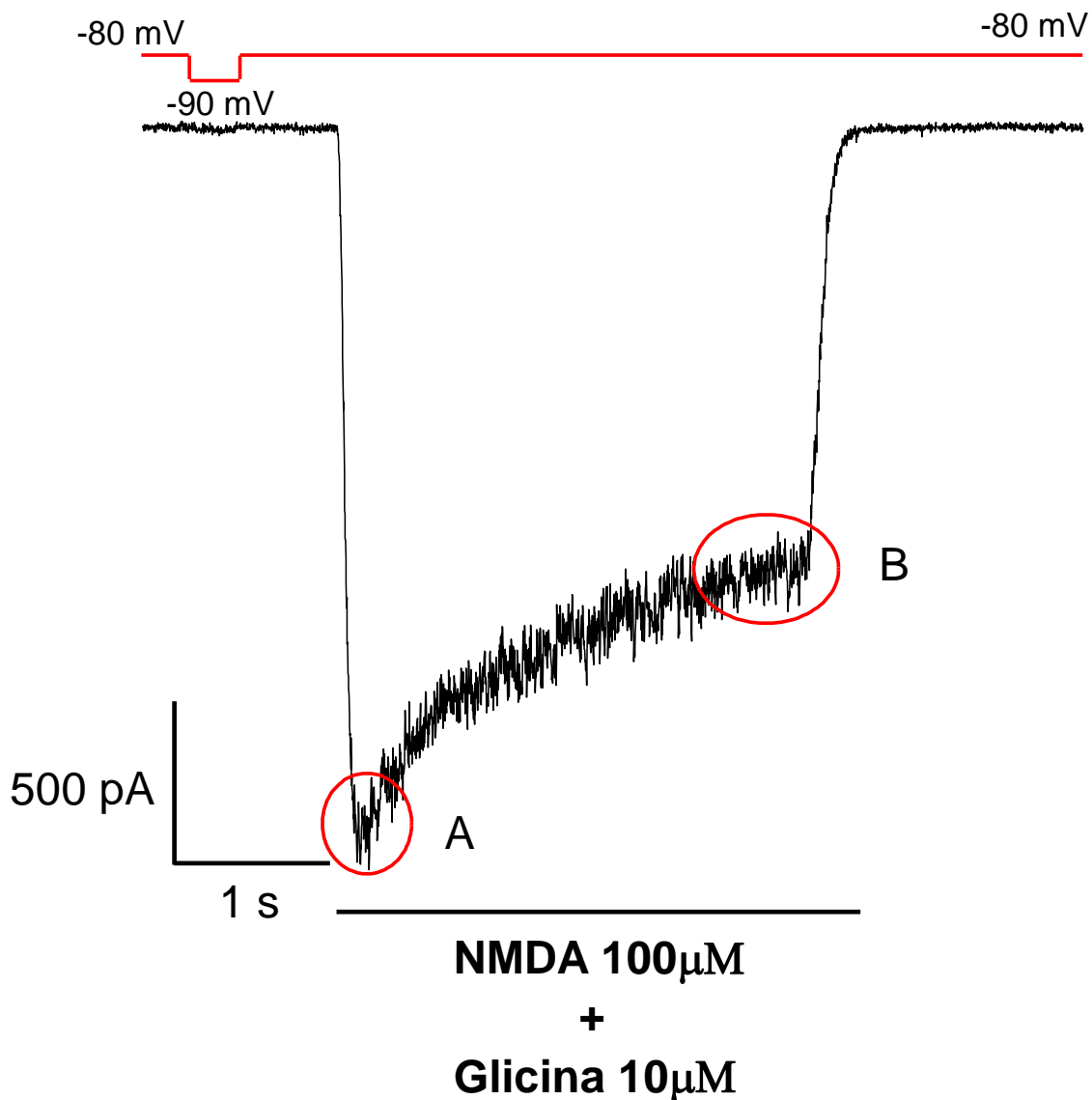


Gráfico 2. Trazo representativo del protocolo de aplicación de NMDA 100μM en presencia de Glicina 10 μM. Se señala en A el pico máximo de la corriente y en B el estado estacionario de la misma. En la parte superior se muestra el cambio de voltaje durante el protocolo de aplicación.

EFFECTO DE DAPSONA SOBRE LA CORRIENTE ACTIVADA DE NMDA

Para evaluar el efecto de la dapsona sobre las corrientes activadas por NMDA se registraron células correspondientes a la corteza motora. En el protocolo experimental previamente descrito se co-aplicó dapsona y NMDA a una concentración de 20 μM y 100 μM respectivamente; en el Gráfico 3 se observa un trazo representativo de un registro. Con una n de 16 se observó que la dapsona disminuye en un $15.18 \pm 1.19\%$ la corriente activada por NMDA a una concentración de 20 μM .

Gráfico 3. Efecto de la dapsona en la corriente activada por NMDA.

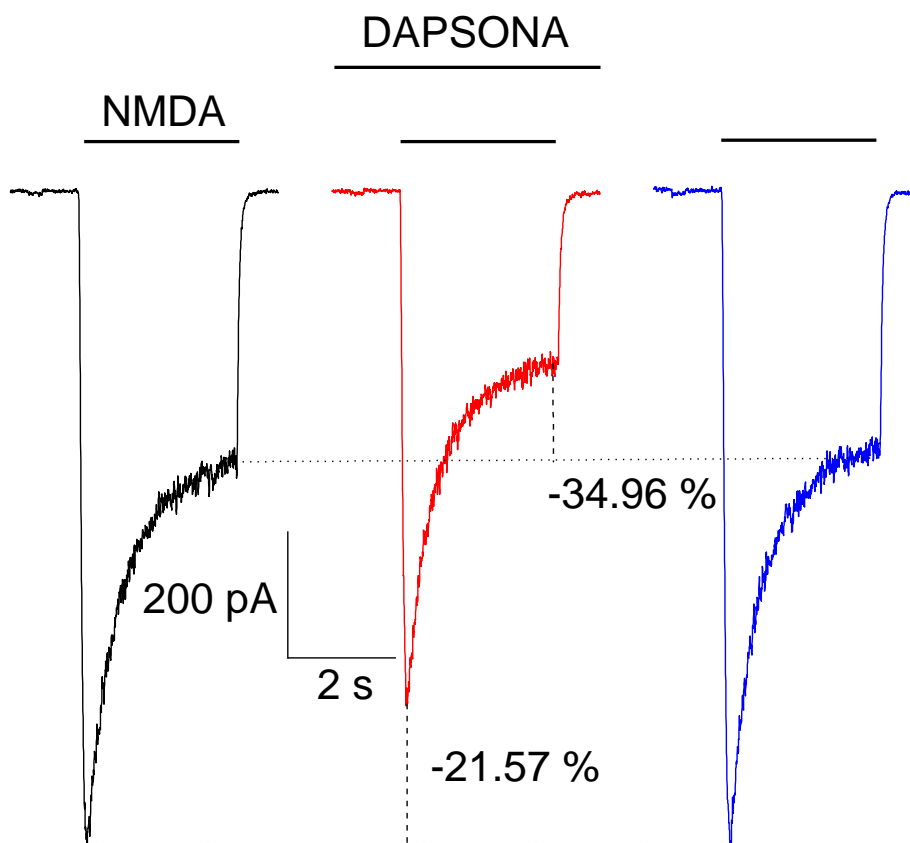


Gráfico 3. Se muestra el porcentaje de disminución de la corriente al pico y al estado estacionario.

Una vez obtenidos los datos se determinó el tamaño de la corriente a través de la relación guardada entre el pico, el estado estacionario y el tamaño de la célula (Densidad de corriente, pA/pF; Gráficos 4 y 5), a continuación se realizó una prueba T-Student para

muestras pareadas y se encontraron diferencias de reducción altamente significativas tanto en el pico de la corriente ($p < .001$) como en el estado estacionario ($p < .001$).

Gráfico 4. Densidad de Corriente en el pico, condición NMDA – Dapsona.

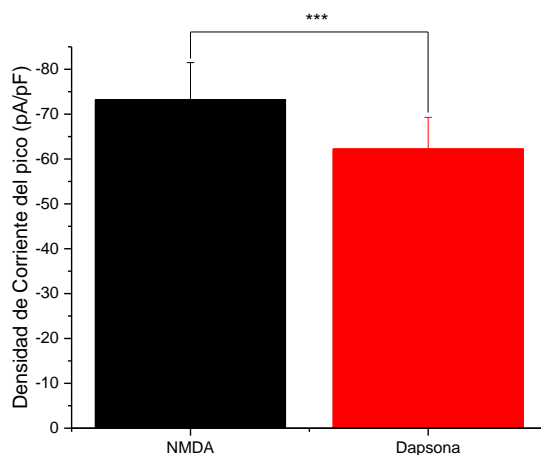


Gráfico 4. Se aprecia que hay diferencias altamente significativas entre ambos grupos en relación al pico de la corriente y el tamaño de la célula, ($p < .001$) en prueba T-Student para muestras pareadas.

Gráfico 5. Densidad de Corriente en el estado estacionario, condición NMDA - Dapsona

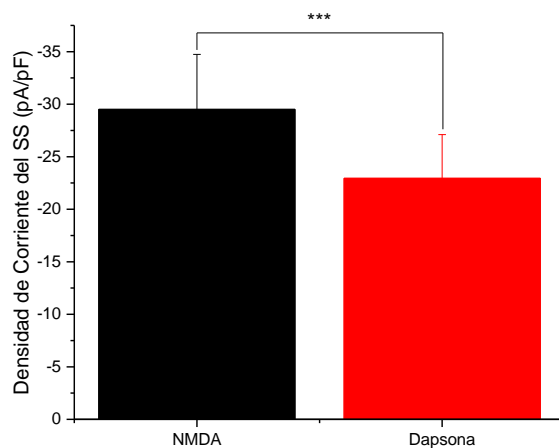


Gráfico 5. Se aprecia que hay diferencias altamente significativas entre ambos grupos en relación al pico de la corriente y el tamaño de la célula, ($p < .001$) en prueba T-Student para muestras pareadas.

EFEECTO DE LA DAPSONA SOBRE LA CORRIENTE ACTIVADA DE NMDA EN PRESENCIA DEL ANTAGONISTA DE LA SUBUNIDAD GluN2B IFENPRODIL

Se registraron 12 células para estudiar el efecto de la dapsona en la subunidad GluN2B del receptor de NMDA en neuronas piramidales con el uso del antagonista Ifenprodil. El protocolo experimental consistió en co-aplicar dapsona (20 μM), Ifenprodil (1.6 μM) y NMDA (100 μM) en presencia del co-agonista Glicina (10 μM ; Gráfico 6).

Gráfico 6. Efecto de la dapsona en presencia del antagonista Ifenprodil.

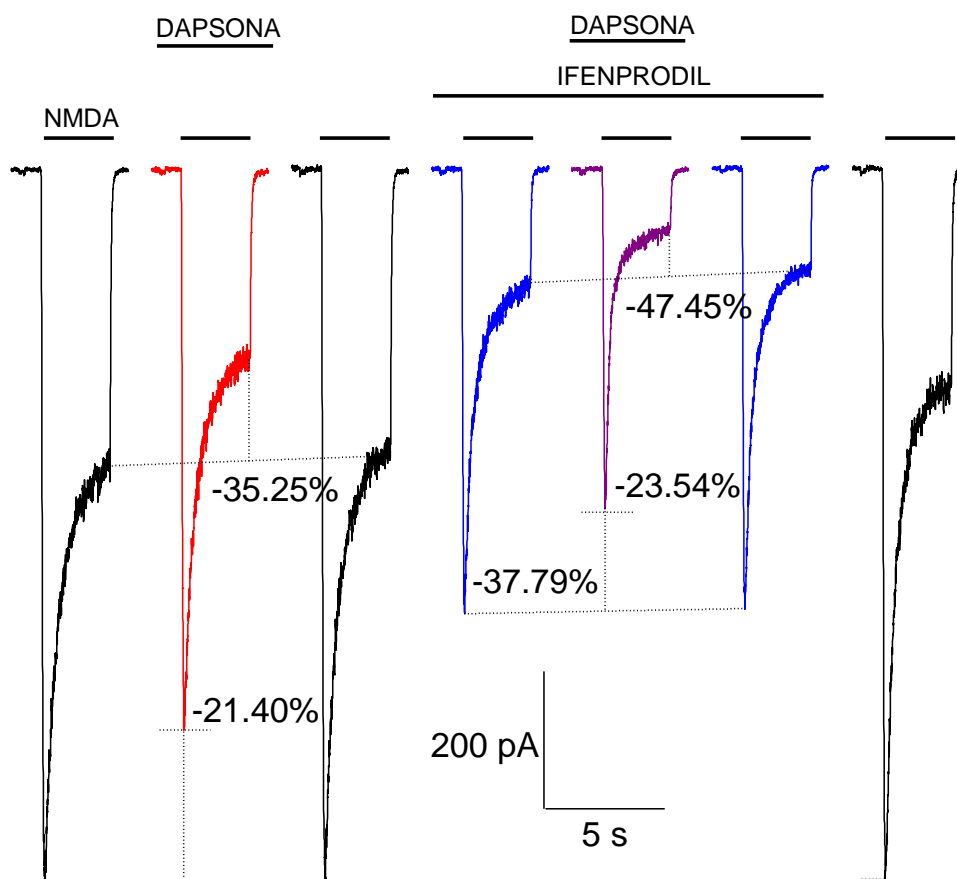


Gráfico 6. Se observa el porcentaje de disminución de la corriente al pico y al estado estacionario de la corriente de la dapsona (20 μM), el Ifenprodil (1.6 μM) y la co-aplicación de Ifenprodil + Dapsona.

Para definir el tamaño y analizar las corrientes de NMDA en presencia de Dapsona, Ifenprodil e Ifenprodil + Dapsona se hizo uso de la Densidad de Corriente (Gráfico 7a y 7b).

Gráfico 7. Densidad de Corriente en pico y estado estacionario, condición NMDA – Dapsona – Ifenprodil – Ifenprodil + Dapsona.

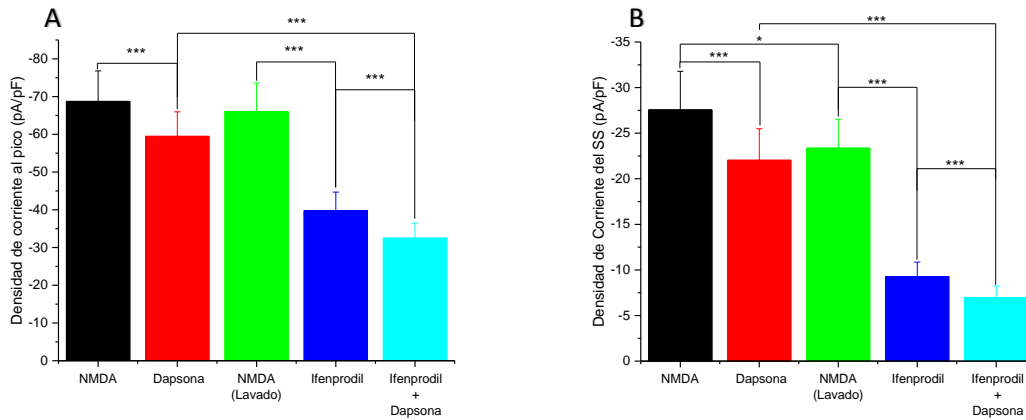


Gráfico 7. A) Densidad de corriente al pico, se apreciaron diferencias altamente significativas en todos los grupos con respecto a su control excepto en el conjunto NMDA – NMDA (Lavado). B) Densidad de corriente del estado estacionario, en todos los grupos hubo diferencias significativas. n=12 *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 en prueba T- Student pareada.

Posterior al análisis de la densidad de corriente se midió el porcentaje de reducción al pico y del estado estacionario. Los datos obtenidos se examinaron con pruebas T-Student para muestras apareadas. Se obtuvo que la reducción en el pico y el estado estacionario que provoca la dapsona en la corriente de NMDA es similar y no presenta cambios significativos aún en presencia del antagonista de la subunidad GluN2B Ifenprodil (Gráfico 8a y 8b).

Gráfico 8. Porcentaje de reducción al pico y del estado estacionario por Dapsona e Ifenprodil.

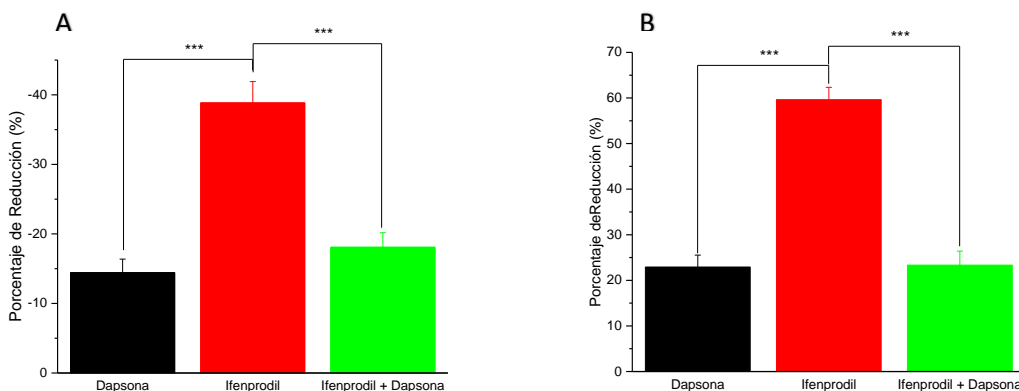
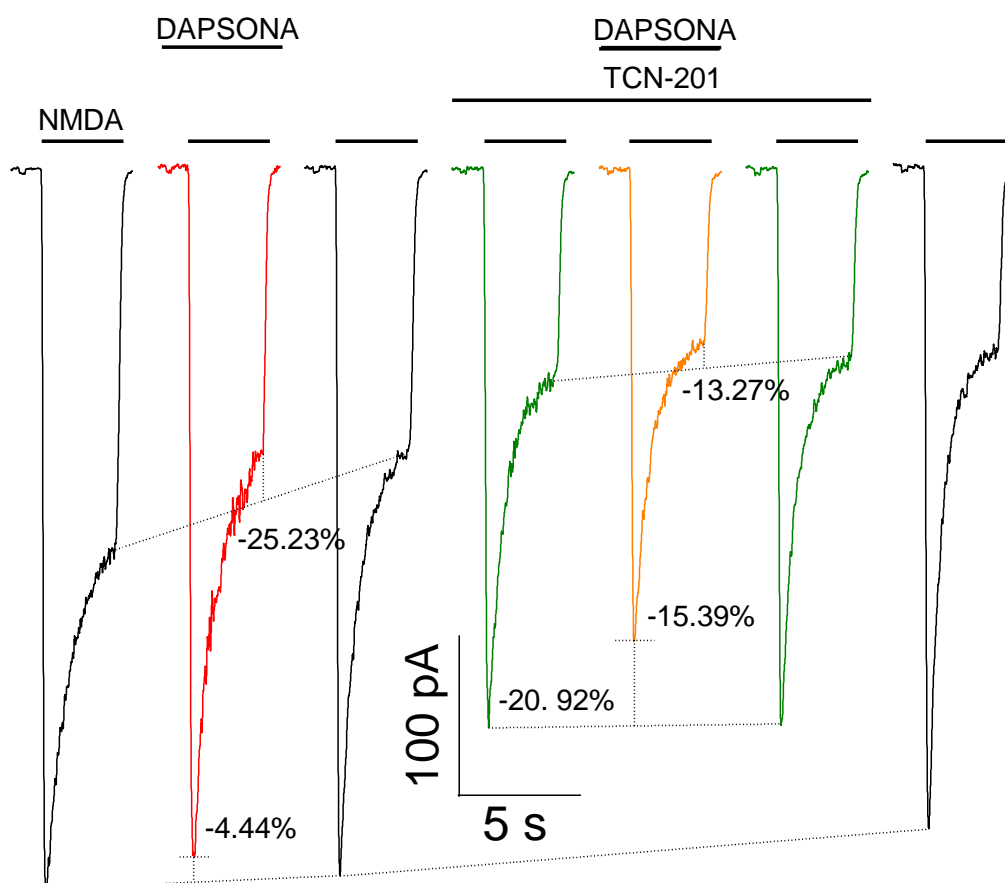


Gráfico 8. A) Porcentaje de reducción de la corriente al pico, se distingue diferencias altamente significativas entre los grupos Dapsona – Ifenprodil ($14.42 \pm 1.95\%$ - $38.83 \pm 3.07\%$) e Ifenprodil - Ifenprodil + Dapsona ($38.83 \pm 3.07\%$ - $18.08 \pm 2.08\%$). B) Porcentaje de reducción de la corriente del estado estacionario, se observa diferencias altamente significativas entre los grupos Dapsona – Ifenprodil ($22.91 \pm 2.61\%$ - $59.62 \pm 2.71\%$) e Ifenprodil - Ifenprodil + Dapsona ($59.62 \pm 2.71\%$ - $23.33 \pm 3.06\%$). n=12 *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 en prueba T- Student pareada.

EFFECTO DE LA DAPSONA SOBRE LA CORRIENTE ACTIVADA DE NMDA EN PRESENCIA DEL ANTAGONISTA DE LA SUBUNIDAD GluN2A TCN-201

Para evaluar el efecto de la dapsona en la subunidad GluN2A del receptor de NMDA en neuronas piramidales de corteza motora primaria se utilizó el antagonista específico TCN-201 en un total de 13 células. El protocolo experimental consistió en co-aplicar dapsona (20 μM), TCN-201 (1.3 μM) y NMDA (100 μM), en presencia de Glicina (10 μM ; Gráfico 6).

Gráfico 9. Efecto de la dapsona en presencia del antagonista TCN-201.



Gráfica 7. Se observa el porcentaje de disminución de la corriente al pico y al estado estacionario de la corriente de la dapsona (20 μM), el TCN-201 (1.3 μM) y TCN-201 + Dapsona.

Se hizo uso de la Densidad de Corriente para poder definir y analizar el tamaño de las corrientes de NMDA en presencia de los moduladores Dapsona, TCN-201 y TCN-201 + Dapsona (Gráfico 10a y 10b).

Gráfico 10. Densidad de Corriente en pico y estado estacionario, condición NMDA – Dapsona – TCN-201 – TCN-201 + Dapsona.

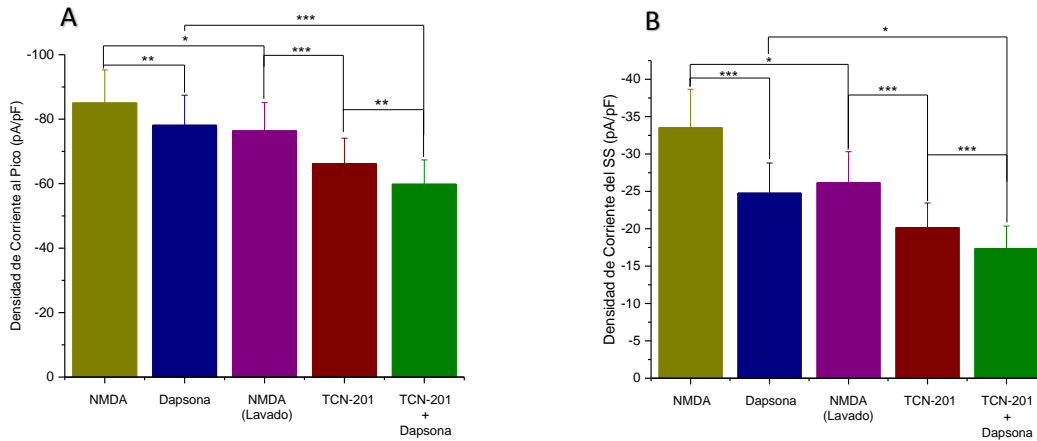


Gráfico 10. A) Densidad de corriente al pico, se apreciaron diferencias significativas en todos los grupos con respecto a su control. B) Densidad de corriente del estado estacionario, en todos los grupos hubo diferencias significativas. n=13 *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 en prueba T- Student pareada.

Después del análisis de la densidad de corriente se midió el porcentaje de reducción al pico y del estado estacionario. Los datos obtenidos se examinaron con pruebas T-Student para muestras apareadas. En el pico no se observó diferencias significativas entre los grupos TCN-201 - TCN-201 + Dapsona y Dapsona – TCN-201 + Dapsona. En el estado estacionario a diferencia de los conjuntos anteriores se apreció diferencias significativas entre el grupo Dapsona y TCN-201 + Dapsona (Gráfico 11a y 11b).

Gráfico 11. Porcentaje de reducción al pico y del estado estacionario por Dapsona y TCN-201.

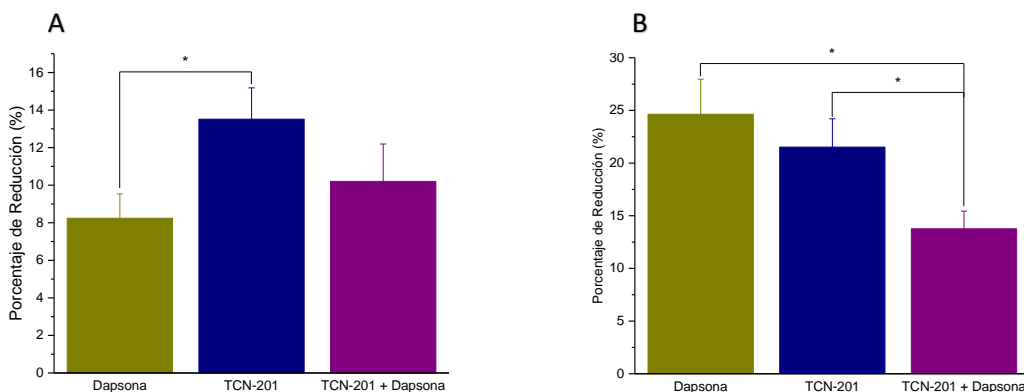


Gráfico 11. A) Porcentaje de reducción de la corriente al pico, sólo se observó diferencias significativas en el grupo Dapsona – TCN-201 (8.24 ± 1.29% - 13.51 ± 1.66%). B) Se aprecia diferencias significativas en el grupo Dapsona – TCN-201 + Dapsona (21.51 ± 2.68% - 13.76 ± 1.67%). n= 13, *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 en prueba T- Student pareada.

DISCUSIÓN

El trabajo anterior tuvo como objetivo principal el determinar si el antibiótico dapsona ejercía su efecto modulador en las corrientes activadas por NMDA a través de la subunidad GluN2A o en la GluN2B, para así poder entender mejor su mecanismo de acción. Para lograr este propósito se registraron neuronas piramidales de las capas V y VI de la corteza motora primaria (M1), mismas que de no cumplir con los siguientes requisitos fueron excluidas del estudio: dendritas y axón cortos (usualmente menores a los 75 μ m), presencia de corrientes de Na⁺ y Ca²⁺, una capacitancia de 10 a 20pF, una resistencia de membrana de 1G Ω y una resistencia de acceso menor a 25 M Ω . Las células registradas pertenecían a M1 debido a que estudios recientes demostraron que las capas profundas de esta área son de las zonas más afectadas en modelos de isquemia cerebral focal (de Oliveira *et al.*, 2014), mismos que han sido utilizados para exponer el papel de la dapsona en la neuroprotección.

Los resultados obtenidos confirmaron estudios previos realizados en el Laboratorio de Neuromodulación del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (Villegas Ronquillo Angélica, 2015), en los que se observó que la dapsona reduce la corriente de NMDA y añadieron que a una concentración saturante, como lo es 20 μ M reduce aproximadamente un 15.18 \pm 1.19% la corriente al pico y en un 24.93 \pm 1.28% el estado estacionario. Para conocer el sitio de unión de la dapsona en el receptor de NMDA se utilizaron los antagonistas de las subunidades GluN2A y GluN2B; Ifenprodil y TCN-201 respectivamente. Cabe mencionar que todas las condiciones experimentales mencionadas anteriormente en la metodología se realizaron en cada una de las células registradas.

Al igual que para dapsona, se utilizaron concentraciones saturantes de Ifenprodil y de TCN-201 en base al modelo matemático propuesto por Jarvis & Thompson en 2013 para la combinación de fármacos y su interacción con canales iónicos. Para probar el efecto del antagonista Ifenprodil en la corriente activada por NMDA se registraron 12 células, las cuáles se bañaron en una solución de NMDA + Glicina + Ifenprodil a una concentración de 100 μ M, 10 μ M y 1.6 μ M respectivamente (IC₅₀=1 μ M; Traynelis *et al.*, 2010) y se observó que la corriente al pico de NMDA disminuyó en un 38.83 \pm 1.95% y el estado estacionario en un 59.62 \pm 2.71% (**Gráfico 8a y 8b**).

Sin embargo, para poder discernir si la dapsona actúa o no en la subunidad GluN2B se evaluó en efecto de Dapsona en ausencia y en presencia de Ifenprodil y se obtuvo que aún en presencia del antagonista, la dapsona reduce un $18.08 \pm 2.08\%$ la corriente al pico y un $23.33 \pm 3.06\%$ el estado estacionario (**Gráfico 8a y 8b**). Posteriormente se realizaron pruebas T-Student para muestras pareadas y se observaron diferencias altamente significativas entre las muestras de Dapsona e Ifenprodil + Dapsona en contraposición con el grupo de Ifenprodil, sin embargo, los datos no fueron estadísticamente diferentes, motivo por el cual se puede negar que la dapsona haga efecto en la subunidad GluN2B.

Para saber el comportamiento en la corriente activada por NMDA en presencia del antagonista de la subunidad GluN2A, TCN-201 se realizó el mismo protocolo que con el Ifenprodil (n=13). Se observó que el TCN-201 a una concentración de $1.3\mu\text{M}$ ($\text{IC}_{50}=0.746 + 0.133\mu\text{M}$; Hansen, Ogden, & Traynelis, 2012) disminuye en un $13.51 \pm 1.66\%$ la corriente al pico y en un $21.51 \pm 2.68\%$ el estado estacionario (**Gráfico 11a y 11b**). Como se puede notar, el antagonista Ifenprodil proporciona una mayor reducción a la corriente de NMDA que el TCN-201, suceso que puede relacionarse a que los receptores GluN1/GluN2B dominan en las sinapsis inmaduras y los receptores GluN1/GluN2A en las sinapsis maduras y el animal de experimentación usado en este trabajo se encuentra catalogado dentro de la población joven (Amico-Ruvio & Popescu, 2010).

No obstante, para aclarar si la dapsona tiene como sitio de unión la subunidad GluN2A o no, se bañó a las células registradas con una solución suplementada con NMDA + Glicina + TCN-201 + Dapsona y se observó que aún en presencia del antagonista, la dapsona aún reduce un $10.20 \pm 1.98\%$ la corriente al pico y en un $13.76 \pm 1.67\%$ el estado estacionario (**Gráfico 11a y 11b**). Para analizar estos datos se realizaron pruebas T-Student dependientes para muestras pareadas que mostraron diferencias significativas en el pico entre los grupos Dapsona y TCN-201, pero no en los grupos TCN-201 y TCN-201 + Dapsona como con el antagonista Ifenprodil. Sin embargo, a diferencia del antagonista Ifenprodil, se observó que la co-aplicación de TCN-201+ Dapsona resultaba en una reducción del estado estacionario, efecto que podría atribuirse a que el TCN-201 es un antagonista selectivo de la subunidad GluN2A del receptor NMDA, pero también actúa como modulador alostérico negativo del sitio de unión a glicina de GluN1 (Hansen *et al.*, 2014b). Además, se conoce

que existen tres tipos diferentes de desensibilización en los receptores NMDA, una sensible a glicina, una insensible a glicina y uno dependiente de Ca^{2+} . La desensibilización sensible a glicina se refiere a la transición del receptor NMDA cuando se encuentra en un estado cerrado pero unido a glutamato, lo que refleja una interacción alostérica negativa entre el glutamato y los sitios de unión de glicina, resultando en una afinidad reducida de la glicina en presencia de altas concentraciones de glutamato (Kito Z. & Scheuss V., 2010). Dadas estas circunstancias, si la dapsona actuara en el sitio de unión a glicina podría ocasionar una mayor desensibilización de la corriente en consecuencia a las altas concentraciones de glutamato o su agonista NMDA en contraparte con las bajas concentraciones de glicina en los receptores, teoría que puede ser puesta a prueba con el uso de antagonistas del sitio de unión a glicina.

En estudios previos realizados en el Laboratorio de Neuromodulación mediante técnicas electrofisiológicas se llegó a la conclusión de que la dapsona no tiene relación dependiente de voltaje para bloquear la corriente activada por NMDA y que no interfiere con la función de la Glicina como co-agonista de la corriente de NMDA (Villegas Ronquillo Angélica, 2015), aunque este último efecto contrasta con los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, los receptores de NMDA contienen dos subunidades con unión a glicina, GluN1 y GluN3. El sitio de unión a glicina de las subunidades GluN3 posee diferencias estructurales y farmacológicas con respecto al sitio de GluN1, estudios han revelado que la glicina se une con una afinidad 650 veces mayor a GluN3A que a GluN1, además, de poseer una selectividad diferente, ejemplo de ello se encuentra el antagonista del sitio de unión a glicina el ácido 5,7-dicloroquinurénico el cual tiene una mayor afinidad por GluN1 que por GluN3A (Kvist, Greenwood, Hansen, Traynelis, & Bräuner-Osborne, 2013), motivo por el cual la dapsona podría competir por el sitio de unión a glicina en las subunidades GluN1 o GluN3.

Gracias a los datos obtenidos en este trabajo, es posible sugerir nuevas líneas de investigación. Debido a que la dapsona no tuvo efecto aparente en las subunidades GluN2A y GluN2B pero si en la corriente total activada por NMDA (pico y estado estacionario) es necesario aclarar el efecto que tiene la dapsona en las subunidades restantes. No obstante, con los registros obtenidos se pueden descartar algunas series experimentales.

La literatura menciona que los receptores de NMDA con las subunidades GluN1 / GluN2A poseen la probabilidad de apertura más alta (0.5) con una duración de activación de 30 a 50 ms, la probabilidad de apertura de los receptores de NMDA con GluN1 / GluN2B es de tres a cinco veces menor que la anterior y los que contienen las subunidades GluN1/ GluN2C-D tienen una probabilidad de apertura muy baja (0.01 a 0.04), tardando de 2000 a 4000 ms en activarse (Wyllie *et al.*, 2013), además, es necesario considerar que aunque los receptores de NMDA tienen una alta afinidad por el neurotransmisor Glutamato, sólo el ~30% de los receptores parecen contribuir a la respuesta de pico (Amico-Ruvio & Popescu, 2010).

De la misma manera que existen diferencias en la activación del receptor NMDA, también la desensibilización difiere dependiendo de las subunidades que conformen el receptor. Aproximadamente, los tiempos de desensibilización abarcan un rango de 50 veces, siguiendo la secuencia NR2A < 2C = 2B << 2D, siendo prácticamente ausente en los receptores que contienen GluN2D (S. Cull-Candy, Brickley, & Farrant, 2001; Traynelis *et al.*, 2010). Los resultados de este trabajo demuestran que la dapsona actúa en el pico y en el estado estacionario de la corriente de NMDA, pero si sólo el ~30% de los receptores contribuyen a la respuesta de pico y la activación de algunas subunidades va más allá de 2000 ms es claro que la dapsona no puede actuar en todas las subunidades al mismo tiempo.

Otro aspecto a tener en cuenta es que la presente investigación se llevó a cabo en neuronas piramidales de corteza motora primaria, y que los estudios anteriores para demostrar el efecto neuroprotector de la dapsona se han realizado en diferentes estructuras, como son cuerpo estriado y médula espinal (Diaz *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 1999; Santamaría *et al.*, 1997). Sin embargo, la subunidad GluN2C del receptor NMDA se expresa en cerebelo, amígdala, bulbo olfativo, corteza retrosplenial, interneuronas de tálamo, corteza e hipocampo y oligodendrocitos (Khatri *et al.*, 2014) y la subunidad GluN2D en interneuronas del circuito cortico-límbico (Suryavanshi, Ugale, Yilmazer-Hanke, Stairs, & Dravid, 2014), razón por la cual no afectarían la corriente activada por NMDA en neuronas piramidales de corteza.

La mayor limitación del estudio realizado fue la cantidad de reactivos para continuar la búsqueda del sitio de unión de la dapsona, sin embargo, los resultados obtenidos son de

gran impacto por el hecho de referir a dos de las subunidades más importantes y abundantes del receptor NMDA, asimismo, la bibliografía citada sobre la activación, desensibilización y poblaciones de las diferentes subunidades nos acerca cada vez más al entendimiento del mecanismo de acción de tan importante fármaco.

CONCLUSIONES

Con base en los objetivos propuestos se concluye que:

- I. La dapsona bloquea la corriente activada por NMDA un $15.18 \pm 1.19\%$ a una concentración de $20 \mu\text{M}$ en neuronas piramidales de las capas V y VI de corteza motora primaria.
- II. Los antagonistas de las subunidades GluN2A (TCN-201) y GluN2B (Ifenprodil) reducen el pico y el estado estacionario de la corriente activada por NMDA.
- III. En las corrientes activadas por NMDA la dapsona reduce la corriente al pico y el estado estacionario aún en presencia de los antagonistas TCN-201 o Ifenprodil.

PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos se propone:

- i. Evaluar el efecto de la dapsona en la corriente activada por NMDA de diferentes poblaciones de neuronas.
- ii. Estudiar el comportamiento de las corrientes inducidas por NMDA en presencia de dapsona y de antagonistas de la subunidad GluN1 y GluN3.
- iii. Evaluar la cinética de las corrientes de NMDA en presencia de dapsona y de antagonistas del sitio de unión a glicina.

REFERENCIAS

- Altagracia, M., Kravzov, J., Santamaría, A., Ríos, C., Ordaz, H., & Gonzalez, L. (1994). Dapsone administration prevents quinolinate-induced neurotoxicity in rats. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 37, 63.
- Amico-Ruvio, S. A., & Popescu, G. K. (2010). Stationary Gating of GluN1/GluN2B Receptors in Intact Membrane Patches. *Biophysical Journal*, 98(7), 1160–1169. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.12.4276>
- Amico, S. A., Paganelli, M. A., Myers, J. M., & Popescu, G. K. (2012). Ifenprodil Effects on GluN2B-Containing Glutamate Receptors. *Molecular Pharmacology*, 82(6), 1074–1081. <http://doi.org/10.1124/mol.112.078998>
- Anderson, C. T., Sheets, P. L., Kiritani, T., & Shepherd, G. M. G. (2010). Sublayer-specific microcircuits of corticospinal and corticostriatal neurons in motor cortex. *Nature Neuroscience*, 13(6), 739–744. <http://doi.org/10.1038/nn.2538>
- Ashurst, J. V., Wasson, M. N., Hauger, W., & Fritz, W. T. (2010). Pathophysiologic mechanisms, diagnosis, and management of dapsone-induced methemoglobinemia. *The Journal of the American Osteopathic Association*, 110(1), 16–20.
- Azizi, M. H., & Bahadori, M. (2011). A history of leprosy in Iran during the 19th and 20th centuries. *Archives of Iranian Medicine*, 14(6), 425–430. <http://doi.org/011146/AIM.0014>
- Bai, N., Aida, T., Yanagisawa, M., Katou, S., Sakimura, K., Mishina, M., & Tanaka, K. (2013). NMDA receptor subunits have different roles in NMDA-induced neurotoxicity in the retina. *Molecular Brain*, 6(1), 34. <http://doi.org/10.1186/1756-6606-6-34>
- Bargas, J., Howe, A., Eberwine, J., Cao, Y., & Surmeier, D. J. (1994). Cellular and molecular characterization of Ca²⁺ currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 14(11), 6667–6686.

- Beal, M. F. (1992). Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *The FASEB Journal*, 6(15), 3338–3344.
- Belousov, A. B. (2012). Novel model for the mechanisms of glutamate-dependent excitotoxicity: Role of neuronal gap junctions. *Brain Research*, 1487, 123–130. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.05.063>
- Bhatt, J. M., Prakash, A., Suryavanshi, P. S., & Dravid, S. M. (2013). Effect of Ifenprodil on GluN1/GluN2B N-Methyl-D-aspartate Receptor Gating. *Molecular Pharmacology*, 83(1), 9–21. <http://doi.org/10.1124/mol.112.080952>
- Blanke, M. L., & VanDongen, A. M. J. (2009). Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. In A. M. Van Dongen (Ed.), *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5274/>
- Boyce, R. W., Dorph-Petersen, K.-A., Lyck, L., & Gundersen, H. J. G. (2010). Design-based Stereology Introduction to Basic Concepts and Practical Approaches for Estimation of Cell Number. *Toxicologic Pathology*, 38(7), 1011–1025. <http://doi.org/10.1177/0192623310385140>
- Brittain, M. K., Brustovetsky, T., Brittain, J. M., Khanna, R., Cummins, T. R., & Brustovetsky, N. (2012). Ifenprodil, a NR2B-selective antagonist of NMDA receptor, inhibits reverse Na⁺/Ca²⁺ exchanger in neurons. *Neuropharmacology*, 63(6), 974–982. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.07.012>
- Bunk, E. C., König, H.-G., Prehn, J. H. M., & Kirby, B. P. (2014). Effect of the N-methyl-D-aspartate NR2B subunit antagonist ifenprodil on precursor cell proliferation in the hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, 92(6), 679–691. <http://doi.org/10.1002/jnr.23347>
- Carmona, M. C. U., Lima, J. A. C., & Mayorga, G. A. (2005). Hallazgos por tomografía computada en pacientes con trauma craneoencefálico, su relación con la evolución

clínica y cálculo del edema cerebral. *Revista Neurología, Neurocirugía y Psiquiatría*, 38(1), 11–19.

Castro-Alamancos, M. A. (2013). The motor cortex: a network tuned to 7-14 Hz. *Frontiers in Neural Circuits*, 7. <http://doi.org/10.3389/fncir.2013.00021>

Cho, S. C., Park, M. C., Keam, B., Choi, J. M., Cho, Y., Hyun, S., ... Lee, J. (2010). DDS, 4,4'-diaminodiphenylsulfone, extends organismic lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(45), 19326–19331. <http://doi.org/10.1073/pnas.1005078107>

Chung, P., Yun, S. J., & Khan, F. (2014). A comparison of participation outcome measures and the International Classification of Functioning, Disability and Health Core Sets for traumatic brain injury. *Journal of Rehabilitation Medicine*, 46(2), 108–116. <http://doi.org/10.2340/16501977-1257>

Cull-Candy, S., Brickley, S., & Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), 327–335. [http://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00215-4](http://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00215-4)

Debol, S. M., Herron, M. J., & Nelson, R. D. (1997). Anti-inflammatory action of dapsone: inhibition of neutrophil adherence is associated with inhibition of chemoattractant-induced signal transduction. *Journal of Leukocyte Biology*, 62(6), 827–836.

De Oliveira, J. L., Crispin, P. di T. B., Duarte, E. C. W., Marloch, G. D., Gargioni, R., Trentin, A. G., & Alvarez-Silva, M. (2014). Histopathology of motor cortex in an experimental focal ischemic stroke in mouse model. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 57-58, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.03.002>

Diaz, A., Mendez, M., Galván, S., Manjarrez, J., Nava, C., Santander, I., ... Ríos, C. (2013). Antioxidant, anticonvulsive and neuroprotective effects of dapsone and phenobarbital against kainic acid-induced damage in rats. *Neurochemical Research*, 38(9), 1819–1827. <http://doi.org/10.1007/s11064-013-1087-z>

- Diaz, A., Salgado, H., Montes, S., Guizar, G., Gelista, N., Mendez, M., ... Ríos, C. (2011). Delayed administration of dapsone protects from tissue damage and improves recovery after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research*, 89(3), 373–380. <http://doi.org/10.1002/jnr.22555>
- Dong, X., Wang, Y., & Qin, Z. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(4), 379–387. <http://doi.org/10.1038/aps.2009.24>
- Falck, E., Begrow, F., Verspohl, E., & Wunsch, B. (2014). Metabolism studies of ifenprodil, a potent GluN2B receptor antagonist. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 88, 96–105. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.08.014>
- Fan, X., Zhao, F., Ai, Y., Andersen, A., Hardy, P., Ling, F., ... Quintero, J. (2014). Cortical glutamate levels decrease in a non-human primate model of dopamine deficiency. *Brain Research*, 1552, 34–40. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.035>
- Flores-Hernandez, J., Hernandez, S., Snyder, G. L., Zhen Yan, Fienberg, A. A., Moss, S. J., ... Surmeier, D. J. (2000). D1 Dopamine Receptor Activation Reduces GABA_A Receptor Currents in Neostriatal Neurons Through a PKA/DARPP-32/PP1 Signaling Cascade. *Journal of Neurophysiology*, 83(5), 2996–3004.
- Flores-Hernandez, J., Salgado, H., De La Rosa, V., Avila-Ruiz, T., Torres-Ramirez, O., Lopez-Lopez, G., & Atzori, M. (2009). Cholinergic direct inhibition of N-methyl-D aspartate receptor-mediated currents in the rat neocortex. *Synapse*, 63(4), 308–318. <http://doi.org/10.1002/syn.20609>
- Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E., & Beas-Zarate, C. (2012a). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología*, 27(5), 301–310. <http://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.10.014>
- Forde, B. G. (2014). Glutamate signalling in roots. *Journal of Experimental Botany*, 65(3), 779–787. <http://doi.org/10.1093/jxb/ert335>

- Gipson, C. D., Reissner, K. J., Kupchik, Y. M., Smith, A. C. W., Stankeviciute, N., Hensley-Simon, M. E., & Kalivas, P. W. (2013). Reinstatement of nicotine seeking is mediated by glutamatergic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(22), 9124–9129. <http://doi.org/10.1073/pnas.1220591110>
- Gou, Z., Wang, X., & Wang, W. (2013). Evolution of neurotransmitter gamma-aminobutyric acid, glutamate and their receptors: Evolution of neurotransmitter gamma-aminobutyric acid, glutamate and their receptors. *Zoological Research*, *33*(6), 75–81. <http://doi.org/10.3724/SP.J.1141.2012.E05-06E75>
- Hansen, K. B., Ogden, K. K., & Traynelis, S. F. (2012). Subunit-Selective Allosteric Inhibition of Glycine Binding to NMDA Receptors. *The Journal of Neuroscience*, *32*(18), 6197–6208. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5757-11.2012>
- Hansen, K. B., Ogden, K. K., Yuan, H., & Traynelis, S. F. (2014b). Distinct functional and pharmacological properties of triheteromeric GluN1/GluN2A/GluN2B NMDA receptors. *Neuron*, *81*(5), 1084–1096. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.035>
- Hatsopoulos, N. G., & Suminski, A. J. (2011). Sensing with the Motor Cortex. *Neuron*, *72*(3), 477–487. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.10.020>
- Hofman, M. A. (2014). Evolution of the human brain: when bigger is better. *Frontiers in Neuroanatomy*, *8*, 15. <http://doi.org/10.3389/fnana.2014.00015>
- Hummel, M. A., Gannett, P. M., Aguilar, J., & Tracy, T. S. (2008). Substrate proton to heme distances in CYP2C9 allelic variants and alterations by the heterotropic activator, dapsone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *475*(2), 175–183. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2008.04.034>
- Jarvis, G. E., & Thompson, A. J. (2013). A golden approach to ion channel inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences*, *34*(9), 481–488. <http://doi.org/10.1016/j.tips.2013.07.004>

- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (Eds.). (2012). *Principles of Neural Science, Fifth Edition* (5th edition). New York: McGraw-Hill Professional.
- Karakas, E., & Furukawa, H. (2014). Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science*, *344*(6187), 992–997. <http://doi.org/10.1126/science.1251915>
- Khatri, A., Burger, P. B., Swanger, S. A., Hansen, K. B., Zimmerman, S., Karakas, E., ... Traynelis, S. F. (2014). Structural Determinants and Mechanism of Action of a GluN2C-selective NMDA Receptor Positive Allosteric Modulator. *Molecular Pharmacology*, *86*(5), 548–560. <http://doi.org/10.1124/mol.114.094516>
- Kito Z., & Scheuss V. (2010). NMDA Receptor Function and Physiological Modulation. In *Intercellular Communication in the Nervous System*. Academic Press.
- Kvist, T., Greenwood, J. R., Hansen, K. B., Traynelis, S. F., & Bräuner-Osborne, H. (2013). Structure-based discovery of antagonists for GluN3-containing N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuropharmacology*, *0*. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.08.003>
- Kvist, T., Steffensen, T. B., Greenwood, J. R., Tabrizi, F. M., Hansen, K. B., Gajhede, M., ... Bräuner-Osborne, H. (2013). Crystal Structure and Pharmacological Characterization of a Novel N-Methyl-d-aspartate (NMDA) Receptor Antagonist at the GluN1 Glycine Binding Site. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(46), 33124–33135. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.480210>
- Lai, T. W., Zhang, S., & Wang, Y. T. (2014b). Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, *115*, 157–188. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.006>
- Levin, & Peeples. (2008). History of Neuroprotection and Rationale as a Therapy for Glaucoma. *American Journal of Managed Care*, *14*(Managed Care Issues in Glaucoma: Emerging Trends and Treatment 1 Suppl). Retrieved from

<http://www.ajmc.com/publications/supplement/2008/2008-02-vol14-n1Suppl/Feb08-2896pS11-S14/>

- Lin, Chen, T. H., Yang, L. Y., & Shih, C. M. (2014). Resveratrol protects astrocytes against traumatic brain injury through inhibiting apoptotic and autophagic cell death. *Cell Death & Disease*, 5(3), e1147. <http://doi.org/10.1038/cddis.2014.123>
- Lin, T.-Y., Huang, W.-J., Wu, C.-C., Lu, C.-W., & Wang, S.-J. (2014). Acacetin Inhibits Glutamate Release and Prevents Kainic Acid-Induced Neurotoxicity in Rats. *PLoS ONE*, 9(2), e88644. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0088644>
- Lorenz, M., Wozel, G., & Schmitt, J. (2012). Hypersensitivity reactions to dapson: a systematic review. *Acta Dermato-Venereologica*, 92(2), 194–199. <http://doi.org/10.2340/00015555-1268>
- Mao, L.-M., Jin, D.-Z., Xue, B., Chu, X.-P., & Wang, J. Q. (2014). Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by CaMKII. *Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]*, 66(3), 365–372.
- Marklund, N., & Hillered, L. (2011). Animal modelling of traumatic brain injury in preclinical drug development: where do we go from here? *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1207–1229. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01163.x>
- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *The Journal of Nutrition*, 130(4), 1007–1007.
- Minnerup, J., Sutherland, B. A., Buchan, A. M., & Kleinschnitz, C. (2012). Neuroprotection for Stroke: Current Status and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9), 11753–11772. <http://doi.org/10.3390/ijms130911753>
- Miranda, M., & Azaldegui, O. (2004). Terapia neuroprotectora de la Enfermedad de Parkinson. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría*, 42(1), 49–52. <http://doi.org/10.4067/S0717-92272004000100007>

- Monaghan, D. T., Irvine, M. W., Costa, B. M., Fang, G., & Jane, D. E. (2012). Pharmacological Modulation of NMDA Receptor Activity and the Advent of Negative and Positive Allosteric Modulators. *Neurochemistry International*, 61(4), 581–592. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.01.004>
- Monaghan, D. T., & Jane, D. E. (2009). Pharmacology of NMDA Receptors. In A. M. Van Dongen (Ed.), *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5282/>
- Montana, M. C., & Gereau, R. W. (2011). Metabotropic glutamate receptors as targets for analgesia: antagonism, activation, and allosteric modulation. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(10), 1681–1688.
- Morales, M., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2013). Low doses of the NMDA receptor antagonists, MK-801, PEAQX, and ifenprodil, induces social facilitation in adolescent male rats. *Behavioural Brain Research*, 250, 18–22. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.04.050>
- Moritani, T., Smoker, W. R. K., Sato, Y., Numaguchi, Y., & Westesson, P.-L. A. (2005). Diffusion-Weighted Imaging of Acute Excitotoxic Brain Injury. *American Journal of Neuroradiology*, 26(2), 216–228.
- Noch, E., & Khalili, K. (2009). Molecular mechanisms of necrosis in glioblastoma: the role of glutamate excitotoxicity. *Cancer Biology & Therapy*, 8(19), 1791–1797.
- Ogden, K. K., & Traynelis, S. F. (2011). New advances in NMDA receptor pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(12), 726–733. <http://doi.org/10.1016/j.tips.2011.08.003>
- Pakkenberg, B., & Gundersen, H. J. (1997). Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *The Journal of Comparative Neurology*, 384(2), 312–320.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Sixth Edition: Hard Cover Edition* (6 edition). Amsterdam ; Boston: Academic Press.

- Pelvig, D. P., Pakkenberg, H., Stark, A. K., & Pakkenberg, B. (2008). Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiology of Aging*, 29(11), 1754–1762. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.013>
- Pieters, F. A., & Zuidema, J. (1987). The absolute oral bioavailability of dapsone in dogs and humans. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy, and Toxicology*, 25(7), 396–400.
- Piette, E. W., & Werth, V. P. (2012). Dapsone in the Management of Autoimmune Bullous Diseases. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 32(2), 317–322. <http://doi.org/10.1016/j.iac.2012.04.011>
- Plitman, E., Nakajima, S., de la Fuente-Sandoval, C., Gerretsen, P., Chakravarty, M. M., Kobylanskii, J., ... Graff-Guerrero, A. (2014). Glutamate-mediated excitotoxicity in schizophrenia: A review. *European Neuropsychopharmacology*, 24(10), 1591–1605. <http://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.07.015>
- Prins, M., Greco, T., Alexander, D., & Giza, C. C. (2013). The pathophysiology of traumatic brain injury at a glance. *Disease Models & Mechanisms*, 6(6), 1307–1315. <http://doi.org/10.1242/dmm.011585>
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (2001). Box B, Excitotoxicity in Acute Neuronal Injury - Neuroscience - NCBI Bookshelf [Text]. Retrieved January 26, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10807/box/A393/>
- Radesca, D. (2009, May 19). Inclusión de una célula nerviosa en un circuito electrónico de estimulación y medida. Retrieved April 30, 2015, from <http://www.nib.fmed.edu.uy/Seminario%202009/Monografias%20seminario%202009/Radesca-CelulaNerviosaCircuito.pdf>
- Ramadan, S., Lin, A., & Stanwell, P. (2013). Glutamate and Glutamine: A Review of In Vivo MRS in the Human Brain. *NMR in Biomedicine*, 26(12). <http://doi.org/10.1002/nbm.3045>

- Rayo, A. C., Olazo, O. M., Guillén, A. I., Salas, R. M., Hernández, G. L., & Pompa, M. S. (2009). Traumatismo craneoencefálico severo. *Revista de la Asociación Mexicana de Medicina Crítica y Terapia Intensiva*, 23(2), 94–101.
- Ríos, C., Nader, J., Rodríguez, A. J., & Nava, C. (2004). Neuroprotective effect of dapsone in an occlusive model of focal ischemia in rats. *Brain Research*, 999(2), 212–215. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.11.040>
- Rivara, C.-B., Sherwood, C. C., Bouras, C., & Hof, P. R. (2003). Stereologic characterization and spatial distribution patterns of Betz cells in the human primary motor cortex. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 270A(2), 137–151. <http://doi.org/10.1002/ar.a.10015>
- Rodríguez, E., Méndez-Armenta, M., Villeda-Hernández, J., Galván-Arzate, S., Barroso-Moguel, R., Rodríguez, F., ... Santamaría, A. (1999). Dapsone prevents morphological lesions and lipid peroxidation induced by quinolinic acid in rat corpus striatum. *Toxicology*, 139(1–2), 111–118. [http://doi.org/10.1016/S0300-483X\(99\)00116-X](http://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00116-X)
- Santamaría, A., Ordaz, J. M., Rubio, M. O., Solís, F. H., & Ríos, C. (1997). Neuroprotective effect of dapsone against quinolinate- and kainate-induced striatal neurotoxicities in rats. *Pharmacology & Toxicology*, 81(6), 271–275.
- Santangelo, R. M., Acker, T. M., Zimmerman, S. S., Katzman, B. M., Strong, K. L., Traynelis, S. F., & Liotta, D. C. (2012). Novel NMDA Receptor Modulators: An Update. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 22(11), 1337–1352. <http://doi.org/10.1517/13543776.2012.728587>
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R. A., & Roche, K. W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 19(1), 62–75. <http://doi.org/10.1177/1073858411435129>

- Shin, A., Kim, H., & Thayer, S. (2012). Subtype selective NMDA receptor antagonists induce recovery of synapses lost following exposure to HIV-1 Tat. *British Journal of Pharmacology*, *166*(3), 1002–1017. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01805.x>
- Shipp, S. (2005). The importance of being agranular: a comparative account of visual and motor cortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *360*(1456), 797–814. <http://doi.org/10.1098/rstb.2005.1630>
- Shipp, S., Adams, R. A., & Friston, K. J. (2013). Reflections on agranular architecture: predictive coding in the motor cortex. *Trends in Neurosciences*, *36*(12), 706–716. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2013.09.004>
- Siegel, A., & Sapru, H. N. (2014). *Essential Neuroscience* (Third edition). Philadelphia: LWW.
- Sobolevsky, A. I. (2015). Structure and gating of tetrameric glutamate receptors. *The Journal of Physiology*, *593*(Pt 1), 29–38. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.264911>
- Stawski, P., Janovjak, H., & Trauner, D. (2010). Pharmacology of ionotropic glutamate receptors: A structural perspective. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *18*(22), 7759–7772. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.09.012>
- Stendahl, O., Molin, L., & Dahlgren, C. (1978). The Inhibition of Polymorphonuclear Leukocyte Cytotoxicity by Dapsone. *Journal of Clinical Investigation*, *62*(1), 214–220. <http://doi.org/10.1172/JCI109109>
- Stepulak, A., Rola, R., Polberg, K., & Ikonomidou, C. (2014). Glutamate and its receptors in cancer. *Journal of Neural Transmission*, *121*(8), 933–944. <http://doi.org/10.1007/s00702-014-1182-6>
- Sun, T., & Hevner, R. F. (2014). Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. *Nature Reviews. Neuroscience*, *15*(4), 217–232. <http://doi.org/10.1038/nrn3707>

- Surmeier, D. J., Bargas, J., Hemmings Jr., H. C., Nairn, A. C., & Greengard, P. (1995). Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron*, *14*(2), 385–397. [http://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90294-5](http://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90294-5)
- Suryavanshi, P. S., Ugale, R. R., Yilmazer-Hanke, D., Stairs, D. J., & Dravid, S. M. (2014). GluN2C/GluN2D subunit-selective NMDA receptor potentiator CIQ reverses MK-801-induced impairment in prepulse inhibition and working memory in Y-maze test in mice. *British Journal of Pharmacology*, *171*(3), 799–809. <http://doi.org/10.1111/bph.12518>
- Tan, X., & Shi, S.-H. (2013). Neocortical neurogenesis and neuronal migration. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, *2*(4), 443–459. <http://doi.org/10.1002/wdev.88>
- Tingle, M. D., Mahmud, R., Maggs, J. L., Pirmohamed, M., & Park, B. K. (1997). Comparison of the Metabolism and Toxicity of Dapsone in Rat, Mouse and Man. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *283*(2), 817–823.
- Torices, M. Á. N., Armenta, J. M. A., García, S. F., & Villegas, M. del C. S. (2013). La ingesta de dapsona con fines de intento suicida induce metahemoglobinemia. A propósito de un caso. *Archivos de Medicina de Urgencia de México*, *5*(2), 85–88.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., ... Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews*, *62*(3), 405–496. <http://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
- Tsubo, Y., Isomura, Y., & Fukai, T. (2013). Neural dynamics and information representation in microcircuits of motor cortex. *Frontiers in Neural Circuits*, *7*. <http://doi.org/10.3389/fncir.2013.00085>

- Vandenberg, R. J., & Ryan, R. M. (2013). Mechanisms of Glutamate Transport. *Physiological Reviews*, 93(4), 1621–1657. <http://doi.org/10.1152/physrev.00007.2013>
- Villegas, A. (2014). *Efecto de N'-4,4'diaminodifenilsulfona sobre la corriente activada por N-Metil-D-Aspartato en neuronas piramidales de la corteza motora de rata* (Tesis de Maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Pue.
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., ... Vyklicky, L. (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 63 Suppl 1, S191–203.
- Walløe, S., Pakkenberg, B., & Fabricius, K. (2014). Stereological estimation of total cell numbers in the human cerebral and cerebellar cortex. *Frontiers in Human Neuroscience*, 8, 508. <http://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00508>
- Willard, S. S., & Koochekpour, S. (2013). Glutamate Signaling in Benign and Malignant Disorders: Current Status, Future Perspectives, and Therapeutic Implications. *International Journal of Biological Sciences*, 9(7), 728–742. <http://doi.org/10.7150/ijbs.6475>
- Williams, K. (2009). Extracellular Modulation of NMDA Receptors. In A. M. Van Dongen (Ed.), *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton (FL): CRC Press. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5272/>
- Wolf, R., Tuzun, B., & Tuzun, Y. (2000). Dapsone: unapproved uses or indications. *Clinics in Dermatology*, 18(1), 37–53. [http://doi.org/10.1016/S0738-081X\(99\)00093-0](http://doi.org/10.1016/S0738-081X(99)00093-0)
- Wozel, G., & Blasum, C. (2013). Dapsone in dermatology and beyond. *Archives of Dermatological Research*, 306(2), 103–124. <http://doi.org/10.1007/s00403-013-1409-7>
- Wozel, V. E. G. (2010). Innovative Use of Dapsone. *Dermatologic Clinics*, 28(3), 599–610. <http://doi.org/10.1016/j.det.2010.03.014>

- Wyllie, D. J. A., Livesey, M. R., & Hardingham, G. E. (2013). Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. *Neuropharmacology*, *74*(100), 4–17. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.01.016>
- Young, N. A., Collins, C. E., & Kaas, J. H. (2013). Cell and neuron densities in the primary motor cortex of primates. *Frontiers in Neural Circuits*, *7*. <http://doi.org/10.3389/fncir.2013.00030>
- Zhu, Y. I., & Stiller, M. J. (2001). Dapsone and sulfones in dermatology: overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *45*(3), 420–434. <http://doi.org/10.1067/mjd.2001.114733>
- Zuidema, J., Hilbers-Modderman, E. S., & Merkus, F. W. (1986). Clinical pharmacokinetics of dapsone. *Clinical Pharmacokinetics*, *11*(4), 299–315. <http://doi.org/10.2165/00003088-198611040-00003>

ANEXOS

Definiciones operacionales

Técnica de *Voltage Clamp*

En la técnica de *Voltage Clamp*, el potencial de membrana se mantiene constante, a la vez que se mide la corriente a través de la membrana requerida para mantener ese nuevo voltaje. De esta forma se consigue que la corriente sea linealmente proporcional a la conductancia estudiada. El voltage clamp permite la separación de la corriente iónica de la corriente capacitiva. Además permite obtener mejor información del comportamiento de los canales, especialmente los procesos de apertura y cierre según el potencial de membrana establecido. Las micropipetas y los microelectrodos son cuidadosamente realizados para disminuir sus resistencias (5-10 M Ω para los de voltaje y 1-2 M Ω para corriente) y para generar poco daño en la célula. Un preamplificador registra el potencial de membrana y el amplificador diferencial del clamp ingresa corriente para controlar este potencial (Radesca, 2009).

Definiciones conceptuales

Las siguientes definiciones se obtuvieron del Diccionario de la Real Academia Española.

Disecar: Dividir en partes un vegetal o el cadáver de un animal para el examen de su estructura normal o de las alteraciones orgánicas.

Disociar: Separar los diversos componentes de una sustancia.

Resistencia: Elemento que se intercala en un circuito para dificultar el paso de la corriente o para hacer que esta se transforme en calor.

Definición de las variables y escalas de medición

Voltaje: Es una magnitud física que cuantifica la diferencia de potencial eléctrico entre dos puntos. También se puede definir como el trabajo por unidad de carga ejercido por el campo eléctrico sobre una partícula cargada para moverla entre dos posiciones determinadas. El voltaje se mide en Volts (V).

Corriente: Es el flujo de carga eléctrica por unidad de tiempo que recorre un material. Este se expresa en Coulombios sobre segundo (C/s), unidad que se denomina Amperio (A).

Capacitancia: Es la propiedad que tienen los cuerpos para mantener una carga eléctrica. La capacitancia también es una medida de la cantidad de energía eléctrica almacenada para una diferencia de potencial eléctrico dada. La capacitancia es medida en faradios; esta unidad es relativamente grande y suelen utilizarse submúltiplos como el microfaradio (μF) o picofaradio (pF).

Resistencia de membrana: Es una medida que mide el impedimento de la membrana para el flujo de iones. Se expresa en mega Ohms ($\text{M}\Omega$).

Resistencia de acceso: Es la suma de la resistencia del electrodo y la resistencia del electrodo y su unión con la célula. Se expresa en mega Ohms ($\text{M}\Omega$).

Tiempo al pico: Es el tiempo requerido para que la respuesta alcance el pico máximo en el potencial de acción. Este se mide en milisegundos (ms).

CONGRESOS



Efecto de la dapsona en las subunidades del receptor NMDA: GluN2A y GluN2B en neuronas piramidales

Juárez-Nájera Adriana¹ (Estudiante de licenciatura), Villegas-Ronquillo Angélica¹, Arroyo-Ríos Erika Lorena¹, Díaz-Ruiz Araceli², Castañeda-Ríos Camilo², Flores-Hernández Jorge Luis Valente¹.

¹Instituto de Fisiología, BUAP. ²Departamento de Neuroquímica, INNN.



Effect of dapsona on NMDA receptor subunits: GluN2A and GluN2B in pyramidal neurons from rat primary motor cortex

***A. J. NÁJERA**¹, A. VILLEGAS RONQUILLO¹, E. ARROYO RÍOS¹, A. DÍAZ RUIZ², C. RÍOS CASTAÑEDA², J. FLORES HERNÁNDEZ.

¹Instituto de Fisiología, BUAP. ²Departamento de Neuroquímica, INNN.