



**BENEMERITA UNIVERSIDAD
AUTONOMA DE PUEBLA
INSTITUTO DE FISILOGIA**



TESIS

**“EFECTO DE N’-4,4’diaminodifenilsulfona SOBRE LA
CORRIENTE ACTIVADA POR N-METIL-D- ASPARTATO
EN NEURONAS PIRAMIDALES DE LA CORTEZA
MOTORA DE RATA”**

Para obtener el grado en:

MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANGELICA VILLEGAS RONQUILLO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JORGE LUIS VALENTE FLORES HERNANDEZ

INDICE GENERAL

Abreviaturas.....	5
Resumen.....	7
1. Corteza Cerebral.....	9
1.1 Corteza Motora.....	10
1.1.1 Neuronas de la Corteza Motora.....	13
1.1.2 Conexiones de la Corteza Motora.....	15
1.2 Neurona Piramidal.....	18
2. Glutamato.....	19
2.1 Receptor a Glutamato.....	21
2.2 Receptor NMDA.....	22
2.3 Fisiología del Receptor NMDA.....	25
3. Excitotoxicidad.....	27
3.1 Relación entre isquemia y excitotoxicidad.....	28
3.2 Neuroprotección.....	29
4. Dapsona.....	31
5. Antecedentes.....	34
6. Planteamiento del Problema.....	35
7. Hipótesis.....	37
8. Objetivo.....	37
8.1 General.....	37
8.2 Particulares.....	37
9. Material y Métodos.....	38
9.1 Material.....	38
9.2 Método.....	39
9.2.1 Protocolo de Disociación.....	39
9.2.2 Técnica de célula completa (Whole Cell) en protocolos de fijación de voltaje.....	40
9.2.3 Aplicación de Fármacos.....	42

9.2.4	Protocolo Electrofisiológico.....	43
10.	Análisis Estadístico.....	45
11.	Diagrama de Trabajo.....	46
12.	Resultados.....	47
12.1	Parámetros.....	47
12.2	Resultados de los Protocolos Aplicados.....	48
12.2.1	Efecto de Dapsona sobre la corriente activada de NMDA.....	48
12.2.2	Efecto de Dapsona sobre la corriente activada de NMDA a diferentes concentraciones de su co-agonista Glicina.....	52
12.2.3	Dependencia de voltaje de Dapsona sobre la corriente activada de NMDA.....	53
13.	Discusión.....	56
13.1	Efecto de dapsona sobre la corriente activada de NMDA.....	56
13.2	Dependencia de voltaje de dapsona.....	57
13.3	Participación de Glicina.....	58
14.	Conclusión.....	60
15.	Bibliografía.....	61

ABREVIATURAS

AM	Núcleo Anteromedial del tálamo
AMPA	Acido amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
ATP	Adenosín trifosfato
CPF	Corteza Prefrontal
iGluRs	Receptores ionotrópicos a glutamato
GABA	Acido gama amino butírico
GAD	Enzima descarboxilasa del ácido glutámico
Glu	Glutamato
GluRs	Receptores a Glutamato
HNE	4- hidroxinonenal
IP3	Inositol trifosfato
KA	Ácido Kaínico
LP	Lipoperiodoxidación
MCA	Arteria Cerebral Media
MK-801	5-metil-10-dibenzocyclohepten,11-dihidro-5H-maleato 5,10-imina
M1	Corteza motora
mGluRs	Receptores metabotrópicos a glutamato
NMDA	N -metil-D-aspartato
NO	Oxido nítrico
nNOS	Oxido Nítrico Sintasa neuronal
POm	POm Núcleo posterior del tálamo

RE	Retículo Endoplasmático
SNC	Sistema Nervioso Central
TCE	Traumatismo Cráneoencefálico
VL	Núcleo Ventrolateral del tálamo
VA	Núcleo Ventral anterior

RESUMEN

La corteza cerebral es una capa de sustancia gris que se extiende sobre la superficie de ambos hemisferios, este revestimiento es de tejido nervioso, comprendiendo una gran cantidad de neuronas e importantes conexiones que le permiten tener diversas funciones y constituye una entidad integrada con múltiples interacciones consigo misma y con el resto del Sistema Nervioso Central (SNC) Las funciones de la corteza cerebral están organizadas de manera jerárquica. Al final de la organización se encuentran las áreas de soporte sensitivas y motoras; en áreas de mayor jerarquía se encuentran funciones integrativas. La corteza prefrontal se encuentra en el área más alta en jerarquía dedicada a la ejecución y representación de acciones. La corteza prefrontal se encuentra delante de la corteza motora.

La corteza cerebral presenta seis capas, cada una representada por una variedad neuronal característica, en la capa II y III se encuentran las neuronas piramidales pequeñas y medianas. Uno de los receptores que se encuentran en estas neuronas son los receptores a Glu. Dentro de los GluR podemos distinguir a los ionotrópicos y metabotrópicos. Este trabajo estudió uno de los iGluR, el receptor NMDA.

El receptor NMDA es considerado uno de los receptores que participan en procesos de plasticidad y patológicos. Dentro de estos procesos patológicos se puede distinguir la excitotoxicidad que lleva a la célula a la apoptosis o muerte celular programada.

Durante años se han investigado fármacos que reviertan este proceso de excitotoxicidad, si bien existen varios, no hay un fármaco que llene todos los requisitos para ser un neuroprotector ideal, sin efectos colaterales o reacciones secundarias. Uno de estos fármacos es la dapsona, que es un bacteriostático y antiinflamatorio. Dapsona ha sido usado para enfermedades dermatológicas principalmente por su acción antiinflamatoria. Estudios recientes le otorgan el

nombre de neuroprotector, ya que ha sido probado en modelos animales y en pacientes teniendo buenos resultados, al disminuir el volumen de infarto, o en el caso de los humanos ha mostrado aumento en el tiempo de mejoría y una reducción en las secuelas producidas por Eventos Cerebro-Vasculares.

Este trabajo estudió el efecto que tiene dapsona sobre la corriente activada de NMDA. Los resultados muestran que si existe un efecto de bloqueo o disminución sobre la corriente activada de NMDA.

1.- CORTEZA CEREBRAL

La corteza cerebral es una capa de sustancia gris que se extiende sobre la superficie de ambos hemisferios, este revestimiento es de tejido nervioso, comprendiendo una gran cantidad de neuronas e importantes conexiones que le permiten tener diversas funciones y constituye una entidad integrada con múltiples interacciones consigo misma y con el resto del Sistema Nervioso Central (SNC). A excepción del cerebelo, las proyecciones axonales de la corteza forman parte integral de los ganglios basales, de los núcleos basales telencefálicos, los núcleos del diencefalo, los núcleos del tallo cerebral y de la medula espinal. Este sistema de interconexiones participa en los mecanismos de control y ejecución motora, actividades emocionales y cognitivas (Pimienta, 2004).

La corteza frontal se puede dividir en dos grandes dominios funcionales: la corteza motora y la corteza prefrontal (asociativa). La corteza motora está situada por delante del surco central y se prolonga sobre la superficie medial del hemisferio mientras que la corteza prefrontal ocupa la región rostral a la corteza motora (Fig. 1) (Nieuwenhuys, 2009).

La fisiología de la corteza cerebral está organizada de manera jerárquica. Al final de la organización se encuentran las áreas de soporte sensitivas y motoras; en áreas de mayor jerarquía se tienen funciones integrativas. La corteza prefrontal se encuentra en el área más alta en jerarquía dedicada a la ejecución y representación de acciones (Fuster, 2001). La corteza prefrontal en rata ha sido definida como parte de la corteza que recibe entradas del núcleo mediodorsal del tálamo y de grupos de células dopaminérgicas localizadas en el área ventral tegmental (VTA). La CPF envía señales de arriba hacia abajo con la corteza posterior para controlar la recuperación de la información y regular el control de movimiento (Fuster, 2001). Esta se divide en tres principales regiones: orbital, medial y lateral. La región orbital y medial está involucrada en la conducta

emocional. La región lateral se encarga de la organización temporal de la conducta, el lenguaje y razonamiento (Fuster, 2001).

1.1 CORTEZA MOTORA

La corteza motora comprende la corteza motora primaria y la corteza motora no primaria. Martelli y cols., han subdividido la corteza motora somática del *mono Rhesus* en siete áreas designadas de F1-F7. Basándose en datos citoarquitectónicos, histoquímicos, neuroquímicos, hodológicos y funcionales. Los análisis arquitectónicos modernos y las pruebas funcionales, principalmente con estudios de neuroimagen, indican que la organización de la corteza motora humana se asemeja estrechamente a la del *mono Rhesus* (Nieuwenhuys, 2009). Experimentos han revelado que la corteza motora está organizada como un “homúnculo”, un mapa del cuerpo representado en el cerebro; las partes contiguas del cuerpo son controlados por regiones corticales vecinas (Levine, 2012).

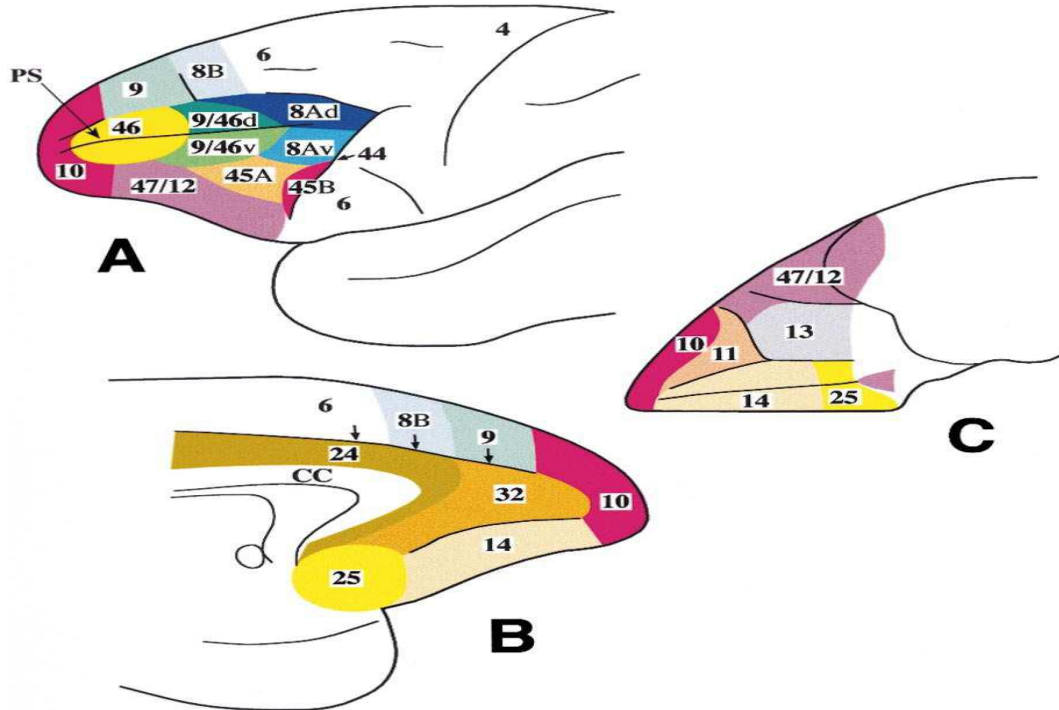


Figura 1. Mapa de la corteza prefrontal del mono. A) vista lateral. B) vista medial C) vista inferior (Fuster, 2001)

En mamíferos inferiores como la rata la corteza frontal ha sido dividida en tres regiones: la motora, orbitofrontal y corteza media prefrontal (Ueta, 2013). En el roedor hay dos subdivisiones principales de áreas motoras; una zona de extremidad anterior rostral y una región caudal que contiene a las extremidades anteriores y los miembros posteriores (Levine, 2012).

La isocorteza frontal representa la corteza motora en la rata y es arquitectónicamente heterogénea. Basado en su cito, mieloarquitectura y patrones de conexión se han definido tres áreas: Fr1, Fr2 y Fr3. Fr1 representa la corteza motora primaria en el cerebro de rata, con Fr3 como un subcampo somatotópico y Fr2 es el equivalente anatómico a la zona premotora del primate, motora suplementaria y área del campo visual frontal (Fig. 2 y 3) (Paxinos, 2004).

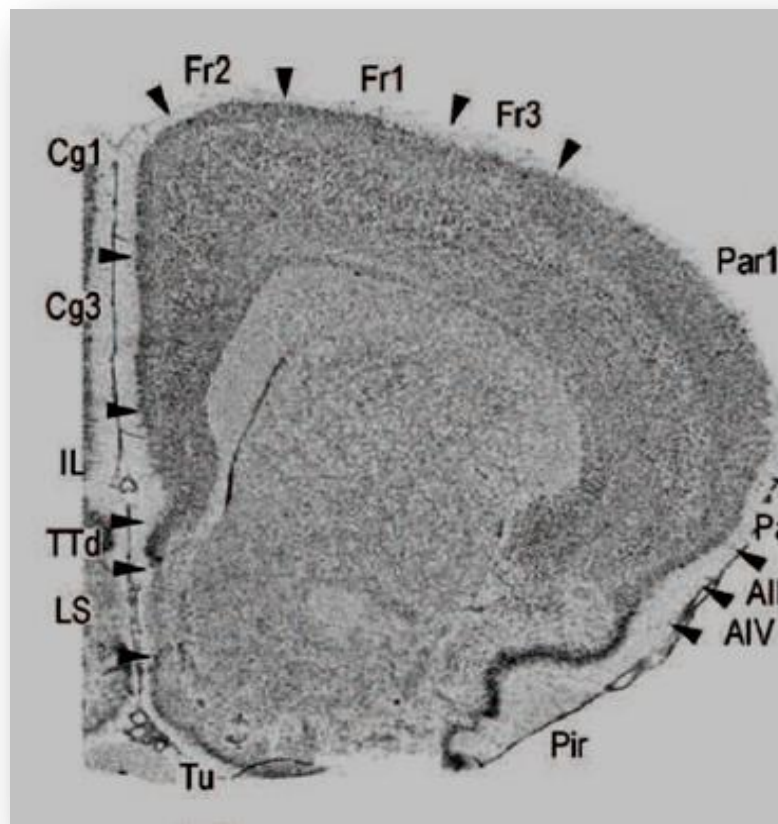


Figura 2. Sección de un corte coronal (15 μ m de ancho) del cerebro de rata, mostrando las zonas Fr1, Fr2 y Fr3 correspondientes a la corteza motora primaria (Fr1), un subcampo somatotópico (Fr3) y la zona equivalente a la corteza motora en el primate (Fr2) (Paxinos, 2004).

La evidencia reciente sugiere que uno de los principales principios de organización de la corteza motora es la separación espacial de grupos neuronales que están activas durante comportamientos complejos (Levine, 2012).

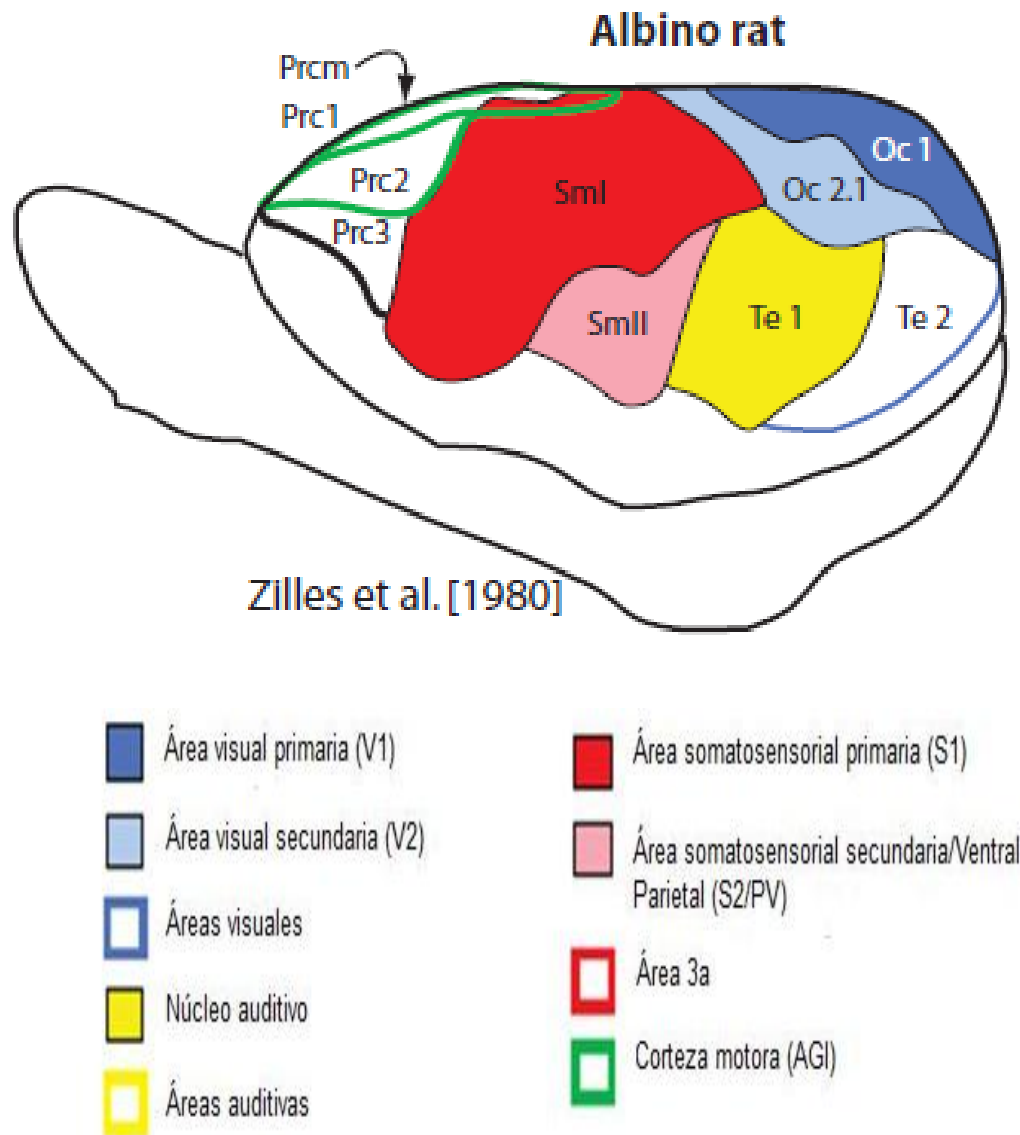


Figura 3. Arquitectura cortical de la rata, representada en color verde está la corteza motora (Krubitzer, 2011)

1.1.1 NEURONAS DE LA CORTEZA MOTORA

La corteza motora al igual que la isocórtexa temporoparietoccipital en general tiene seis capas fundamentales: capa I o capa plexiforme externa, donde hay escasas células; las capas II y III o de células piramidales pequeñas y medianas, respectivamente (la capa II también es conocida como capa granular externa debido al reducido tamaño de sus componentes celulares), la capa IV o capa granular interna, la cual contiene células piramidales de tamaño semejante a las de las capas II y variedad de pequeñas células estrelladas (esta capa está ausente en la corteza motora); la capa V o de las grandes células piramidales, y la capa VI o capa de células fusiformes, la cual tiene células de forma irregular, fusiformes o polimorfas (Fig.4) (Valverde, 2002).

En roedores existen fibras específicas tálamocorticales que pueden ser reconocidas por su morfología, forma de ramificación y distribución. Lorente de Nó estudió con el método de Golgi la terminación de fibras aferentes corticales en la capa IV, en el ratón, sin especificar su origen, donde contribuyen a delimitar determinadas estructuras que él denominó “glomérulo” y que hoy se conoce como “barriles”. Y que consisten en “agregados” de neuronas. Son específicos en la corteza somatosensorial de Roedores (Valverde 2002, De Felipe 2011, Feldmeyer 2012).

De acuerdo con un estudio reciente en la corteza de rata, aproximadamente del 88-89% de 19,000 neuronas son excitatorias, mientras que solo 11-12% son interneuronas gabaérgicas (Feldmeyer, 2012). Además, existen células neurogliales, vasos y fibras nerviosas organizadas en capas paralelas. Es importante señalar que cada capa tiene su propia individualidad, dada por esta variedad celular y por sus conexiones, sin embargo, estas capas no operan de forma aislada; los elementos que las caracterizan están íntimamente ligados con los componentes de las otras capas corticales. Por lo tanto, es contemplada como una organización funcional de grupos celulares verticalmente ensamblados en

torno a un eje central representado por fibras aferentes corticales (Valverde, 2002).

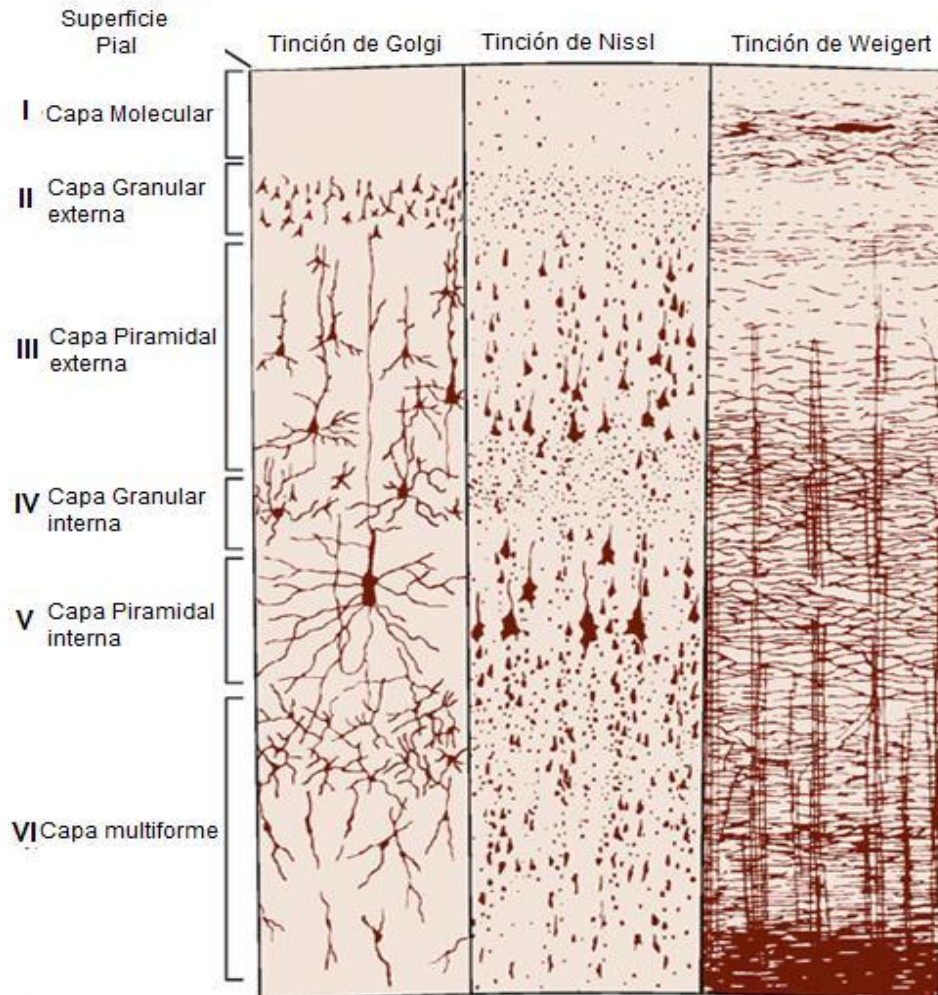


Figura 4. Se observa la morfología y ubicación espacial de las seis capas de la corteza cerebral (tinción de Golgi, Nissl y Weigert) (Kandel, 2000).

1.1.2 CONEXIONES DE LA CORTEZA MOTORA

La corteza comprende un conjunto de áreas neocorticales interconectadas que envía y recibe proyecciones de todos los sistemas sensoriales corticales, motores y muchas estructuras subcorticales (Tabla 1). Por un lado envía información para poder realizar movimientos voluntarios y por otra parte, recibe información sensorial desde centros cerebrales que sirve como retroalimentación para el mejoramiento y ejecución de movimientos. En la corteza motora predominan las capas I, III y V; la capa V contiene neuronas piramidales gigantes que envían largos axones hacia los núcleos motores contralaterales de los nervios craneales y hacia las motoneuronas inferiores del asta ventral de la médula espinal. Formando el tracto corticoespinal, que es la principal aferencia que parte desde la corteza motora (Herculano, 2010). Los axones del tracto corticoespinal atraviesan la sustancia blanca y se van uniendo hasta formar parte de la cápsula interna. Atraviesan los ganglios basales y llegan al tronco del encéfalo. Aquí la mayor parte de las fibras nerviosas se decusan en el bulbo raquídeo formando el tracto corticoespinal lateral que desciende a la médula espinal (Nieuwenhuys, 2009).

La corteza motora (M1) es inervada por axones del tálamo, de la corteza frontal y parietal. La información somatosensorial alcanza a M1 por la vía de orden superior del tálamo sensorial, incluyendo la subdivisión medial de los núcleos posterior (POm) y ventrolateral (VL). El tálamo motor consiste en varios núcleos, incluyendo el anteromedial (AM), ventral anterior (VA) y ventrolateral (VL). Áreas corticales frontales también proyectan hacia M1 y pueden activarlas durante los movimientos voluntarios (Hooks, 2013). Se ha estudiado que la entrada procedente del tálamo termina principalmente en la capa IV, de ahí se transmite a la capa III, a continuación a las V y VI desde donde la señal modificada puede salir de la corteza. Patrones de proyección también indican proyecciones hacia “atrás” de la capa V-III y de la capa VI a la IV (Bannister, 2005). En la figura 5 se muestran parte de las conexiones importantes de la corteza.

CAPA	NOMBRE DE LA CAPA	TIPO CELULAR	CONEXIONES
1	Molecular	Cél. Horizontales de Cajal (Pocas)	Es el estrato más superficial. Estrato de asociación intracortical. Se encuentra cubierto por piamadre. Contiene principalmente fibras nerviosas que derivan de las dendritas apicales de las neuronas piramidales subyacentes y de los axones de las neuronas piramidales invertidas. También llegan aquí algunos axones provenientes del tálamo y de fibras comisurales.
2	Granular Externo	N. Granulares Pequeñas - Están en gran cantidad - Son estrelladas N. Piramidales Pequeñas	Estrato de asociación intracortical. Las dendritas de estas neuronas terminan en la capa molecular, mientras que sus axones se dirigen a las capas más profundas y algunos pasan a la sustancia blanca.
3	Piramidal Externo	N. Piramidales - Son de tamaño mediano y grande	Estrato de asociación intracortical. Las dendritas de estas neuronas terminan en la capa molecular, mientras que sus axones se dirigen a las capas más profundas, proyectándose luego hacia otras áreas corticales, especialmente las del hemisferio del lado opuesto.
4	Granular Interno	N. Granulares - Son de gran tamaño	Estrato Receptor de Proyección , porque recibe impulsos desde la región subcortical, específicamente del tálamo, las que se distribuyen por este cuarto estrato en forma de estrías, denominadas Estrías Tálamo Corticales.
5	Piramidal Interno o Ganglionar	N. Gigantes de Betz - Son neuronas piramidales gigantes (miden hasta 100 Mm)	Estrato Efecto de Proyección Aquí existe una banda de fibras conocida como banda interna de Baillarger. En la corteza motora primaria las neuronas de Betz dan origen a parte del haz corticoespinal
6	Fusiforame o Multiforame	N. Fusiformes, N. Piramidales modificadas, N. de Martinotti	Estrato de asociación interhemisférico , cuyos axones van a formar parte del cuerpo calloso

Tabla 1. Descripción de las capas de la neocorteza. En general se podría decir que las capas 1, 2 y 3 funcionan fundamentalmente como **asociación intracortical**. La capa 4 recibe la mayoría de las proyecciones específicas del tálamo. Y las capas 5 y 6 son fundamentalmente **capas eferentes** de la corteza.

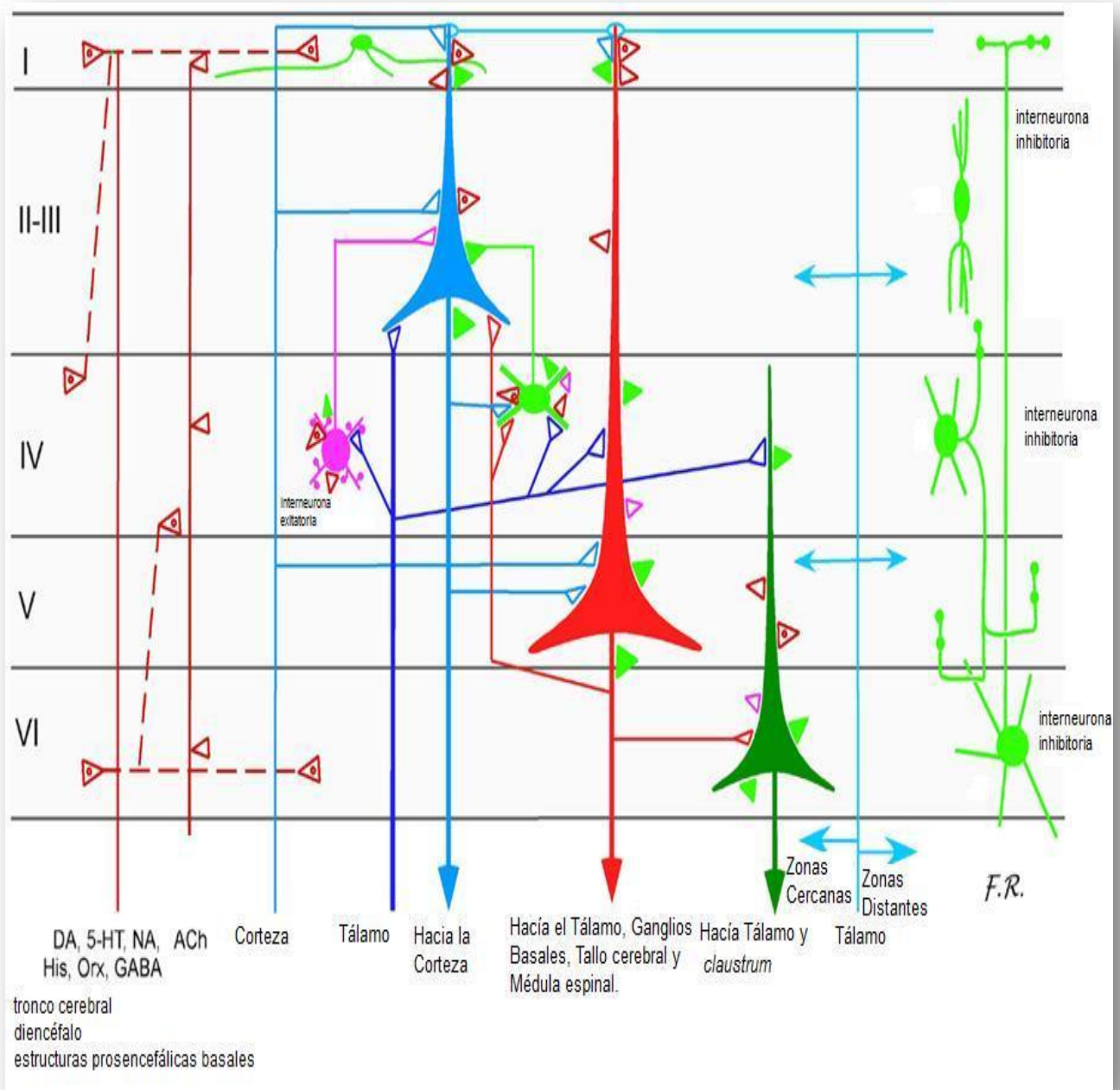


Figura 5. Representación esquemática de las conexiones y organización de las neuronas en corteza cerebral. Las células piramidales están representadas en diferentes colores dependiendo su origen y proyección. También se representan 2 tipos de interneuronas: 1) en color rosa la neurona excitatoria y 2) en verde claro la neurona inhibitoria (Modificado de Reinoso-Suarez y cols., 2011)

1.2 NEURONA PIRAMIDAL

Los estudios de Golgi en la etapa del desarrollo prenatal de la corteza motora en hámsters, ratones, gatos, ratas y seres humanos han proporcionado información esencial sobre las características únicas y comunes de la neurona piramidal de la corteza motora entre los mamíferos (Marín-Padilla, 2014). Estas neuronas representan el tipo fundamental de célula cortical; poseen axones de proyección fuera de la propia corteza. La cantidad de células excitables son aproximadamente 70-80% de la población neuronal de la corteza cerebral, el otro 20-30% corresponden a células inhibitoras o interneuronas (Feldman, 1984); y están divididas comúnmente en dos grupos principales: células piramidales y células espinosas estrelladas. Las células piramidales están situadas en la capas II-VI y las espinosas estrelladas se encuentran dentro de la capa IV de las áreas sensoriales (Valverde, 2002). Las células piramidales tienen un aspecto claramente diferencial: muestran una dendrita apical que, en la mayoría de los casos alcanza la capa I, donde se ramifica en numerosas colaterales divergentes y un abanico de dendritas (Valverde, 2002, Marín-Padilla, 2014).

Estudios realizados en el corteza motora de rata, han encontrado que la capa II/III, donde se encuentran células piramidales proyectan hacia otras áreas corticales; la capa V de células piramidales hacia estructuras subcorticales, tales como médula espinal y cuerpo estriado; y las células piramidales de la capa VI hacia núcleo talámico (Tsubo, 2013). Estas células utilizan los aminoácidos glutamato o aspartato como principal neurotransmisor (Valverde, 2002).

2. GLUTAMATO

El Glutamato (Glu) es un aminoácido no esencial que no atraviesa la barrera hemato-encefálica y se sintetiza en la mitocondria de la neurona a partir de glucosa y varios precursores (Flores, 2011). Esta molécula se encuentra ampliamente distribuida en las neuronas y en la glía, y participa en actividades consideradas no sinápticas. Una de las principales funciones es la de participar en el metabolismo de las células. Por esta razón, es importante distinguir entre el pool de Glu dedicado a la neurotransmisión y aquel que forma parte de las rutas metabólicas comunes a todas las células (Medina, 2002).

Casi el 80% de la energía consumida por el cerebro es producida por el sistema de señales de neurotransmisión glutamato/ glutamina. Este es sintetizado a partir de la glutamina por acción de la glutaminasa y reconvertido en glutamina, después de ser recapturado dentro de las células gliales, por acción de glutamina sintetasa (Fig.6) (Télez, 2006).

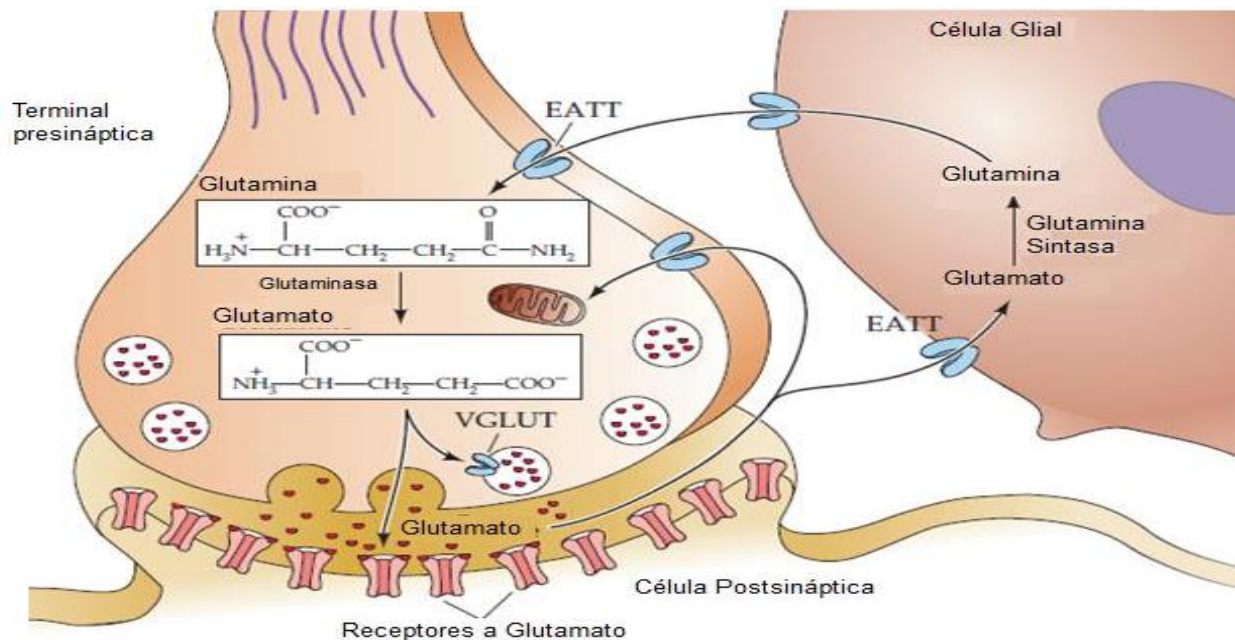


Figura 6. Síntesis del neurotransmisor Glutamato (Purves, 2008)

Después de sintetizarse se libera hacia el citoplasma en donde se acumula en vesículas sinápticas por un proceso dependiente de Mg^{++}/ATP . La propagación del impulso nervioso hacia la terminal axónica, promueve la liberación de Glu en la sinápsis a través de un mecanismo dependiente de la concentración intracelular de Ca^{++} , mediante un proceso de exocitosis, para interactuar con sus receptores específicos (Flores, 2011).

Cuando el Glu es liberado al espacio extracelular se necesita remover de la hendidura para limitar su acción en el tiempo y no se prolongue el potencial postsináptico innecesariamente y esto desensibilice el sistema. Existen dos alternativas para manipular este Glu liberado: primero, puede ser recapturado por los astrocitos. Segundo, que sea capturado por las terminales nerviosas y en las mitocondrias transaminado por aminotransferasas o deaminado por la glutamato deshidrogenasa y convirtiéndolo a alfa-cetoglutarato que posteriormente es oxidado a succinato, fumarato y malato. Se calcula que el ciclo del glutamato consume alrededor de 3% del total de la energía obtenida del metabolismo de la glucosa (Medina, 2002).

Las funciones del Glu son realizadas a través de los receptores a glutamato (GluRs) desempeñando un papel fundamental en los procesos excitatorios del SNC, así como de diferenciación neuronal y del desarrollo del SNC; además tiene un papel importante en la excitotoxicidad y en diversas enfermedades neurodegenerativas como la corea de Huntington, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, los accidentes vasculares cerebrales, la epilepsia, la demencia por VIH, la enfermedad de Creutzfeld-Jakob y la hipoglicemia, así como enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia, la depresión, los trastornos de ansiedad y la enfermedad por estrés postraumático (Moreno, 2006).

2.1 RECEPTORES A GLUTAMATO

Los receptores a Glu (GluRs) están distribuidos en todas las regiones del SNC y se les ha clasificado en dos grandes familias. La primera formada por los receptores ionotrópicos a Glu (iGluRs) o canales ligando dependientes, los cuales permiten el paso selectivo de iones a través del canal, siendo permeables a Ca^{++} , Na^+ y K^+ (Moreno, 2006). Dependiendo de las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas de este receptor, están clasificados en tres familias: los receptores a ácido amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA), los receptores a Kainato (KA) y los receptores N- metil-D-aspartato (NMDA) (Moreno, 2006). Estos receptores muestran numerosas diferencias bioquímicas, farmacológicas y modulatorias. El receptor AMPA muestra una cinética de apertura del receptor rápida, una fuerte desensibilización, son poco permeables a Ca_{2+} y son bloqueados por poliaminas intracelulares, mientras que los receptores NMDA presentan una apertura de receptor mucho más lenta, una desensibilización débil, son altamente permeables al Ca^{++} y se bloquean extracelularmente por Mg^{++} en una fuerte dependencia de voltaje (Fig. 7) (Lonnie, 2004).

La segunda familia está formada por los receptores metabotrópicos (mGluRs), que son proteínas de membrana del tipo de los receptores ligados a proteínas G. Se han dividido en tres grupos: El grupo I incluye mGluRs1 y mGluRs5, el grupo II mGluRs2 y mGluRs3 y el grupo III mGluRs4, mGluRs6, mGluRs7 y mGluRs8. Los mGluRs1 y 5 se asocian a proteínas G_q y G_{11} , es decir, activadores de la enzima fosfolipasa C y, por lo tanto, de PKC y de los canales de Ca^{++} del retículo endoplásmico, este último por medio de la acción del inositol trifosfato (IP3). Los mGluRs2 a 8 pueden asociarse a proteínas G_i o G_o . Esta interacción puede llevar, en el primer caso, a inhibir a la adenilatociclase y, en segundo, a la activación de canales de K^+ (Medina, 2002, Nicoletti 2011). La acción del Glu sobre los receptores ionotrópicos es siempre excitadora, mientras que la de los receptores metabotrópicos puede producir excitación o inhibición (Kandel, 2000).

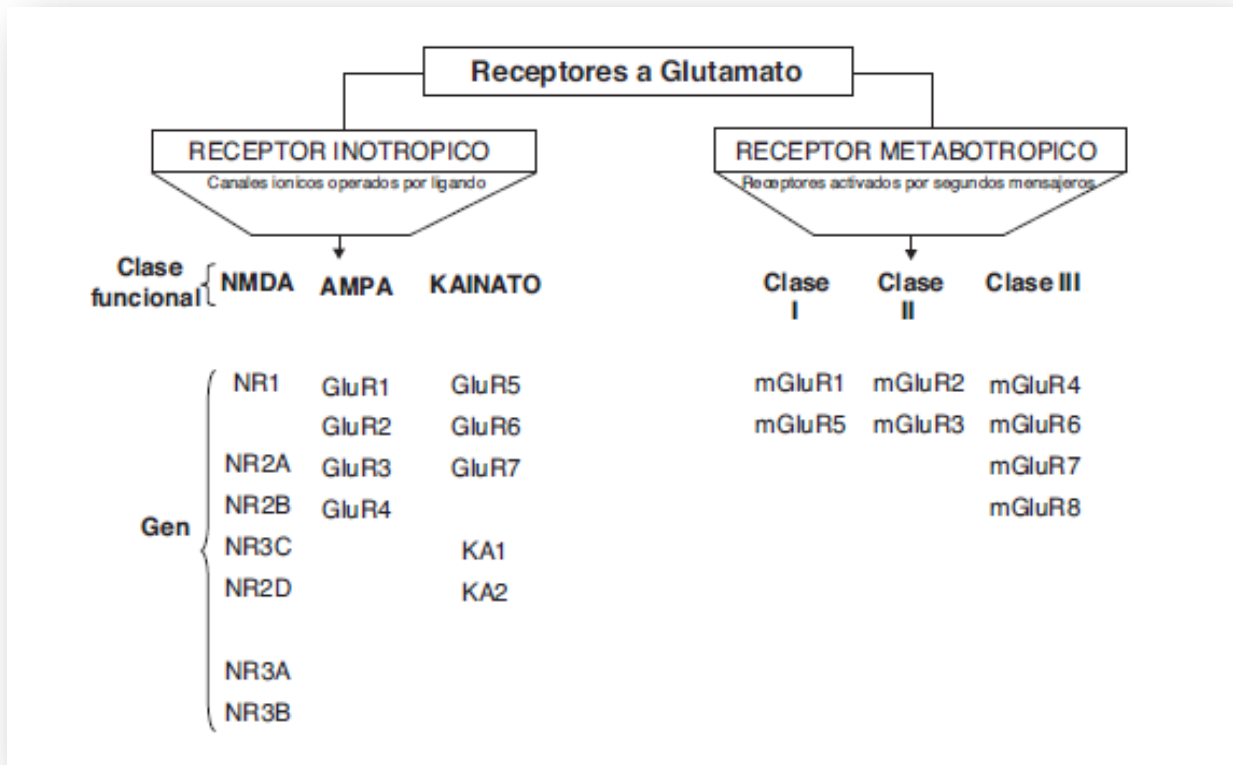


Figura 7. Clasificación de los receptores a glutamato (Flores, 2011)

Debido a la cinética ya antes mencionada del receptor glutamatérgico tipo NMDA, la atención de este estudio se centrará en la modulación del mismo.

2.2 RECEPTOR NMDA

El receptor NMDA se considera uno de los receptores principales en el cerebro debido a su participación en funciones esenciales como la neurotransmisión excitatoria hasta las más complejas como el aprendizaje y la memoria. Es llamado así por su potente agonista exógeno N-Metil-D- aspartato. Este receptor ha sido caracterizado por técnicas electrofisiológicas y farmacológicas, así como manipulaciones moleculares (Zito, 2009). Si bien, estos receptores están

expresados principalmente en SNC, también las células de los islotes pancreáticos expresan receptores de glutamato que modulan la secreción de insulina. Existe evidencia, además, de presencia de receptores NMDA y no-NMDA (AMPA y Kainato) en pequeñas terminales nerviosas sensoriales amielínicas. Estos hallazgos crean la posibilidad de que haya expresión de receptores periféricos a Glu (Dingledine, 1999).

Estructuralmente el receptor NMDA consta de tres dominios transmembranales (M1, M3 y M4) y un dominio dispuesto en forma de horquilla, entrando y saliendo de la bicapa lipídica desde la cara intracelular (M2). El dominio amino (N) terminal se encuentra en la parte extracelular junto con el dominio de unión para el ligando, mientras que el dominio carboxilo (C) está en la región intracelular (Fig. 8) (Flores, 2012, Dingledine, 1999, Lema, 1997).

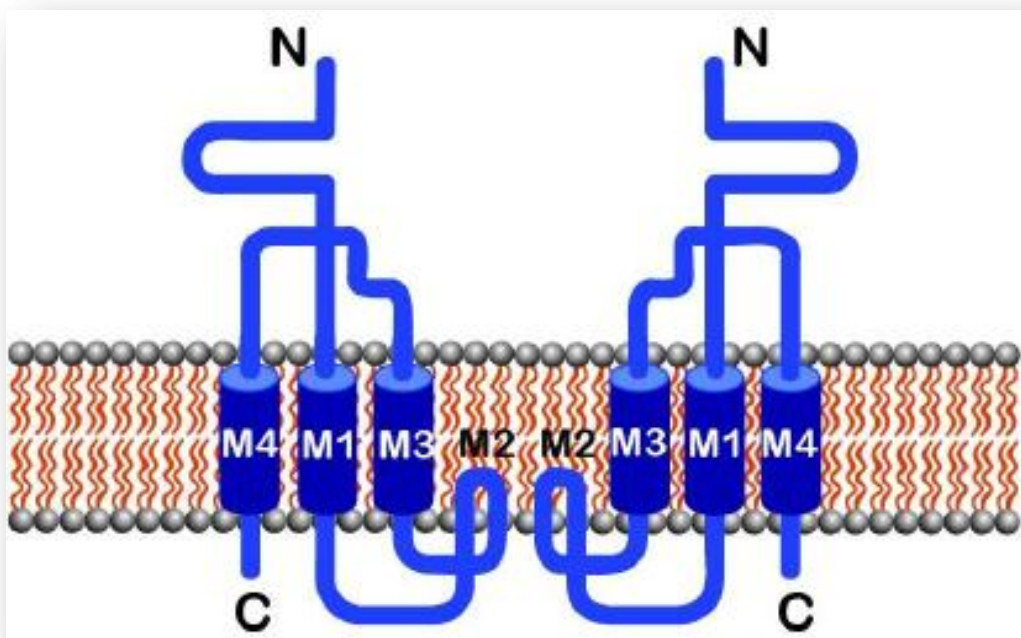


Figura 8. Estructura del receptor a glutamato tipo NMDA. Formado por tres dominios hidrofóbicos (M1, M2, M3, M4). El dominio M2 forma el poro del receptor. El extremo amino terminal (N) es extracelular y el extremo carboxilo terminal (C) intracelular (Nasiripoudori, 2011)

Se han identificado tres subunidades constitutivas del complejo iGluR – NMDA reconocidas como NR1, NR2 y NR3. La subunidad NR1 tiene 8 isoformas codificadas por un solo gen, las NR2 tienen 4 subunidades codificadas cada una por su propio gen y las subunidades NR3 están constituidas por dos subunidades codificadas por dos genes. Los diferentes arreglos del complejo iGluR-NMDA están ensamblados por lo menos con una copia de una de las variantes de la subunidad NR1; una o más copias de la subunidad NR2 y una o más copias de la subunidad NR3 (Albarracín, 2007).

Los receptores NMDA funcionales generalmente se forman por heterotetrámeros integrados por dos dímeros conformados por las subunidades NR1- NR2. La subunidad NR1 posee un sitio de unión para glicina, cada una y en la subunidad NR2 se encuentra el sitio de unión para Glu en cada una de ellas, es decir, dos sitios de unión para glicina (S1) y dos para Glu (S2) en cada receptor. Por tanto, el dímero NR1 y NR2 se considera la estructura base de la organización funcional en cada receptor en donde se localizan los diversos sitios de unión y de reconocimiento para diferentes ligandos, tanto fisiológicos como farmacológicos (Fig. 9) (Flores, 2012, Jocoy, 2011). Las subunidades NR1 son obligatorias para un receptor funcional. Los receptores de NMDA que se pueden expresar consisten de NR1, NR2 y /o subunidades NR2, permitiendo así diheterómeros (NR1/NR2A o NR1/NR2B) y triheterómeros (NR1/NR2A/NR2B) (Jocoy, 2011). Las subunidades NR2A y NR2B son altamente expresadas en la corteza y en hipocampo, confiriendo muchas de las propiedades distintas en los receptores NMDA (Sanz, 2013).

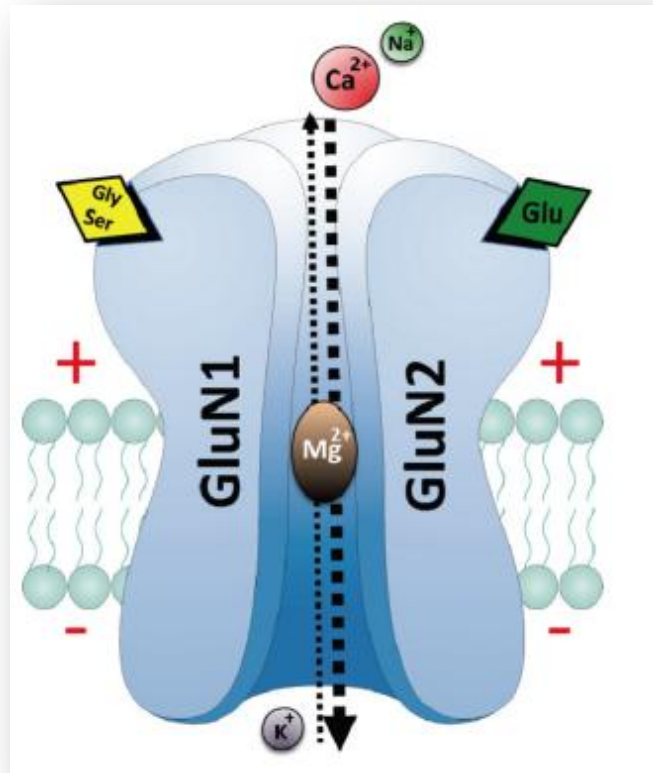


Figura 9. Estructura del receptor NMDA. El receptor NMDA está compuesto por dos subunidades NR1(GluN1) y dos NR2 (GluN2). Es permeable a Ca⁺⁺, Na⁺ y K⁺. Para ser activado necesita la unión de glutamato (GluN2) y glicina (GluN1), así como la liberación del Mg⁺⁺ dependiente de la despolarización debido a que está bloqueando el poro del canal (Sanz, 2013)

2.3 FISIOLÓGIA DEL RECEPTOR NMDA

El receptor NMDA es permeable a Na⁺ y Ca⁺⁺, es dependiente de voltaje al Mg⁺⁺ y requiere la unión concomitante de glicina y Glu para poder ser activado. Se ha comprobado que la glicina aumenta la activación del receptor de forma dosis dependiente. Además, diversos estudios muestran que la localización del

receptor NMDA es predominantemente en las células post-sináptica (Musante, 2011, Lerma, 1997).

El receptor NMDA es el único conocido que necesita de la presencia conjunta de dos ligando para ser activo. Adicionalmente en la región extracelular de la subunidad NR2 posee sitios de unión para ligandos endógenos como las poliaminas. Igualmente se conoce la existencia de un lugar modulador negativo que une Zn^{++} , inhibiendo la activación del receptor y disminuyendo o incrementando el flujo de Ca^{++} bajo condiciones fisiológicas o patológicas. Los ligandos exógenos para esteroides, etanol, ifenprodil así como algunas moléculas sintéticas sirven como herramientas experimentales para el estudio de las propiedades del receptor y además facilitan el desarrollo de antagonistas de utilidad terapéutica (Lerma, 1997, Flores, 2011).

El receptor NMDA forma un canal catiónico que es bloqueado por concentraciones fisiológicas de Mg^{++} . La activación de este receptor a voltajes cercanos al potencial de reposo no permite el flujo de Ca^{++} debido a este bloqueo. Solo con una despolarización significativa (aproximadamente en $-30mV$), que puede ser causada por la activación de receptores AMPA, puede conducir al desbloqueo del canal por el Mg^{++} y permitir la entrada de Ca^{++} a través del poro. La dependencia de voltaje que presenta este canal mediante la interacción que tiene con Mg^{++} puede ser explicada por el sitio de unión de éste que se ubica dentro del poro del canal (Maxim, 2012, Lerma, 1997, Wang, 1995).

En el SNC de los vertebrados, la liberación en la hendidura sináptica del neurotransmisor excitatorio L-glutamato resultará en la activación del receptor NMDA en la membrana postsináptica. Esta apertura del canal puede durar varios milisegundos, aproximadamente 10 milisegundos (Jeffrey, 1996). El flujo de Ca^{++} puede disparar numerosos procesos intracelulares fisiológicos y patológicos tales como la excitotoxicidad (Maxim, 2012).

3. EXCITOTOXICIDAD

Dentro de los procesos patológicos se encuentra la excitotoxicidad, que es la consecuencia de la estimulación excesiva de los aminoácidos excitatorios sobre sus receptores, lo cual lleva a una respuesta metabólica exagerada que puede ocasionar daño neuronal (Medina, 2002). El receptor NMDA permite la entrada del ión Ca^{++} , el cual a su vez, activa señales de transducción para segundos mensajeros, dentro de las cuales incluyen la activación de enzimas proteasa, proteín-quinasas y endonucleasas, proteínas involucradas en el equilibrio redox y la Oxido Nítrico sintasa neuronal (nNOS), la cual juega un papel fundamental en la excitotoxicidad (Rogers, 2009).

El exceso de Glu en la hendidura sináptica puede producirse por varios mecanismos: a) aumento de la exocitosis por activación de receptores presinápticos. b) exocitosis no dependiente del potencial de acción y c) liberación de este neurotransmisor por las células gliales (Medina, 2002).

El daño puede ser tan grave que la célula rápidamente cesa su función y pierde su integridad; se manifiesta como una pérdida drástica y abrupta del suplemento energético por privación de oxígeno y de glucosa llevando a la célula a la muerte celular. La apoptosis (muerte celular programada) se caracteriza por cambios morfológicos que incluyen encogimiento celular, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear (Medina,2002).

Este fenómeno está asociado a diversos estados patológicos del SNC, entre los que se incluyen: epilepsia, hipoxia/isquemia y trauma. Además, está implicado en Huntington, Alzheimer y el Parkinson. También la sobreactivación de estos receptores, principalmente el tipo NMDA es uno de los procesos implicados en la neurodegeneración y muerte celular presente en estas patologías (Fig. 10) (Flores, 2011).

3.1 RELACIÓN ENTRE ISQUEMIA Y EXCITOTOXICIDAD

El Choque isquémico es la causa principal de la discapacidad en adultos y es la tercera causa más común de muerte en países industrializados (Cheng, 2004). En México el TCE (traumatismo craneoencefálico) ocupa la cuarta causa de muerte (Estrada, 2012). El tratamiento para la protección y recuperación de los insultos isquémicos se ocupan fármacos que se denominan neuroprotectores. El empleo de este término es relativamente reciente, aunque desde la antigüedad se empleaban técnicas que pudieran considerarse como neuroprotectoras (Estrada, 2012).

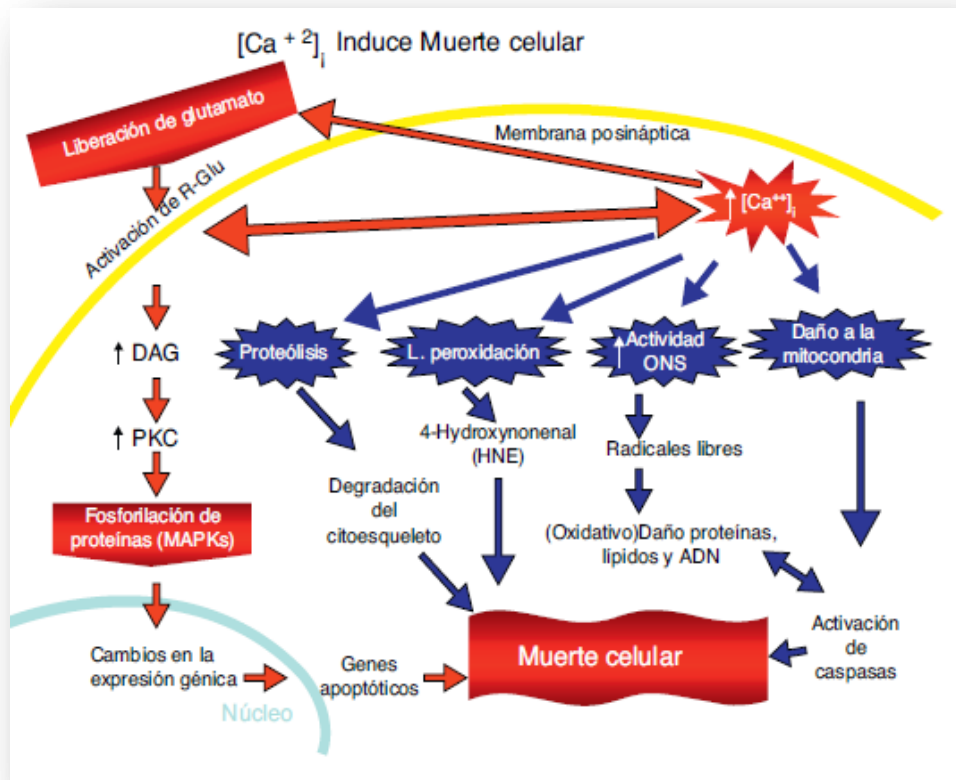


Figura 10. Representación esquemática de la muerte celular. La consecuencia de la excitotoxicidad es la apoptosis o muerte celular. El aumento intracelular de Ca²⁺ promueve la lipoperoxidación (LP) de la membrana citoplasmática, retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria. La lipoperoxidación se debe a la producción de óxido nítrico (NO) y radicales superóxido (O₂⁻), los cuales forman peroxinitritos, también forman 4-hidroxinonenal (HNE) que altera la actividad de los transportadores de membrana y canales iónicos. También la LP induce daño a la ATPasa Na⁺/K⁺, a los transportadores de glucosa y de glutamato como parte del proceso excitotóxico, alterando la homeostasis iónica en el RE y mitocondria; comprometiendo el abastecimiento de ATP (Flores, 2011)

Un clásico choque isquémico comienza con la obstrucción de arteria o vena cerebral, iniciando una cascada de eventos celulares y moleculares dejando como resultado la muerte celular. Inicia con una disminución de oxígeno conduce a una pérdida de ATP y a un desequilibrio en la homeostasis de iones en la membrana. La principal es la homeostasis de iones de Ca^{++} y la despolarización de la membrana celular provoca la liberación masiva de Glu hacia la hendidura sináptica causando la activación extendida de los iGluRs. Esta sobreestimulación resultante activa la cascada de señalización intracelular de la excitotoxicidad y la apoptosis (Harvey, 2011).

3.2 NEUROPROTECCIÓN

El concepto de neuroprotección viene principalmente de estudios patológicos y fisiopatológicos del daño cerebral que ocurre luego de un shock isquémico, se refiere al empleo de cualquier modalidad terapéutica que previene, retarda o “revierte” la muerte celular. Tiene además, como objetivo primario interferir en las alteraciones bioquímicas que se producen en el “área penumbra” con el fin de bloquear la denominada *cascada* isquémica. Este concepto excluye a las estrategias terapéuticas que se dirigen principalmente a la vasculatura cerebral y tienen como objetivo el mantenimiento de la permeabilidad circulatoria o la reversión de la oclusión vascular. Se ha utilizado el término también para referirse a la respuesta de autoprotección que el organismo despliega posterior a un evento traumático y que intenta mantener la integridad y funcionalidad cerebral (Estrada, 2012, Ginsberg, 2008, Cheng, 2004, Laciñana, 2004).

Las lesiones sufridas en la isquemia se diferencian en: núcleo y la penumbra. El núcleo es el área sujeta directamente al impacto físico mostrando pérdida de las células nerviosas debido a la necrosis. La penumbra, se encuentra inmediatamente fuera del núcleo sin presentar lesión directa, ésta sufre la lesión

secundaria dañando a las neuronas y a las células productoras de mielina del SNC, los oligodendrocitos y la despolarización de las células postsinápticas, que ocurre tras la interacción de los receptores iónicos a Glu implicados en la muerte celular (Castillo, 2000).

La inhibición de la excitotoxicidad inducida por Glu, ha sido la diana terapéutica para el tratamiento del choque isquémico durante muchos años. La administración de antagonistas de NMDA o de AMPA reduce el daño isquémico en modelos de roedores. La estructura de estos receptores es bastante compleja, con sitios de unión a cationes divalentes como Ca^{++} y Mg^{++} , sitios de unión para la glicina y las poliaminas, que funcionan como coagonistas y un sitio al que se une al principal agonista, que es el Glu. Existen fármacos que actúan en los diversos sitios de unión, un ejemplo la dizolcipina o MK-801, una de las primeras sustancias empleadas como neuroprotectoras, también el selfotel y dextrometorfam todos ellos antagonistas no competitivos de NMDA. (Tabla 2) (Harvey, 2011, Estrada, 2012).

Fármaco	Mecanismo de acción	Estado Actual
Nimodipina	Antagonista de los canales de Ca^{++} dependientes de voltaje	Suspendido
Dextrometorfam	Antagonista no competitivo del receptor NMDA	Suspendido, efectos adversos
Dizolcipina (MK-801)	Antagonista del receptor NMDA	Suspendido
Cerestat		Suspendido
Selfotel	Antagonista competitivo del receptor NMDA	Suspendido
Magnesio	Antagonista de los canales de calcio dependientes de voltaje y antagonista no competitivo del receptor NMDA	En estudio
GV150526	Antagonista competitivo de Glicina	En estudio
Licostinel	Antagonista competitivo de Glicina	En estudio
Lubeluzol	Bloqueador de canales de Na^+ . Inhibidor de la liberación presináptica del glutamato	Suspendido

Tirilazad	Inhibidores de la peroxidación lipídica. Barredor de radicales libres	En estudio
Ebselen	Actividad glutatión- peroxidasa	En estudio
Clometiazol	Agonista de los receptores GABA	En estudio
NBQX	Antagonista de los receptores AMPA	Suspendido

Tabla 2. Estado actual de neuroprotectores en estudio clínico (Tomado del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, México)

4. DAPSONA (N, N'-4,4'diaminodifenilsulfona)

Dapsona fue sintetizada por primera vez en 1908. En ese momento, no fue concebido como un agente terapéutico, era el resultado de la ambición de la ciencia química. Fue hasta 1937 que la investigación médica de las sulfonas comenzó, cuando dos grupos en Inglaterra, Buttle y cols. y en Francia, Fourneau y cols. investigaron la dapsona como un agente antibacteriano (Wozel, 2013).

Dapsona ha sido el principal fármaco, recomendado por la Organización Mundial de la Salud, para el tratamiento de la Enfermedad de Hansen (Lepra) desde que fue disponible en los años 1940's. Se ha usado también como tratamiento para malaria y en años recientes para la neumonía provocada por *Pneumocystis carinii*, adquirida en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Desde los años de 1950's, este fármaco ha sido reconocido como el único efectivo contra numerosas enfermedades dermatológicas no infecciosas e inflamatorias, la más conocida la dermatitis herpetiforme (Wolf, 2000).

Dapsona es absorbida rápidamente en forma casi completa por vía oral con una biodisponibilidad mayor del 86%. El pico de concentración máxima en el suero es de 1.10 a 2.33 mg/L en .5 a 4 horas. La vida media plasmática es de 12 a 28 horas. La concentración en 24 horas es de .4 a 1.2 mg/L y el rango terapéutico de .5 a 5 mg/L. Se distribuye en todos los órganos incluido piel, hígado, riñón, eritrocitos; pasa la barrera hematoencefálica y la placenta. Se metaboliza a nivel hepático por acetilación e hidroxilación; sus metabolitos son eliminados principalmente por vía renal 85% y biliar 10% (Sánchez, 2008). Es una molécula estructuralmente simple, formada por un átomo de azufre que une a dos átomos de carbono, unidos a un anillo aromático, presenta una fórmula molecular general de $C_{12}H_{12}N_2O_2S$ [R-S(=O)(=O)-R], tiene un peso molecular de 248.30 g/mol, un Pkb de 13.0 y punto de fusión de 175-181°C, con una densidad de 1.33 g/mL a 77.0°F. Es casi insoluble en agua, ligeramente soluble en etanol y muy soluble en acetona. Sus características físicas son: polvo cristalino, blanquizco o amarillo pálido sin olor. Con sabor ligeramente amargo, fotosensible e inodoro (Fig.11) (Sánchez, 2008).

El mecanismo de acción de la dapsona involucra la inhibición de la dihidopteroato sintasa que convierte el ácido paraaminobenzoico en ácido fólico, de esta manera inhibe el crecimiento bacteriano que son dependientes del ácido fólico endógeno. Está clasificada como un fármaco de la clase II de acuerdo con el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica por tener una alta permeabilidad y baja solubilidad en agua. Por lo que a pesar de su potencial terapéutico, la baja solubilidad de dapsona en agua resulta en una baja biodisponibilidad y resistencia microbiana. En cuanto a su acción antiinflamatoria interfiere con la migración de los neutrófilos quimiotácticos y eosinófilos, inhibe la actividad de enzimas lisosomales. Tiene acción inmunomoduladora con disminución del sistema citotóxico de los polimorfonucleares y la concentración del O_2 , reduce los leucotrienos B_4 , inhibe la producción de 5- lipooxigenasa, inhibe la producción de PGD₂, que es un potente quimiotáctico para LTB₄ lo que impediría la llegada al sitio inflamatorio de polimorfonucleares, interfiere con la activación del complemento y su depósito en tejidos. También reduce la adhesión de los

neutrófilos a los anticuerpos IgA fijos en la membrana basal y bloquea las beta-2 integrinas responsables de la adhesión al endotelio. Todos estos mecanismos de acción no explican la forma de actuar en múltiples enfermedades dermatológicas, pero dan una explicación de su acción antiinflamatoria (Debol, 1997, Sánchez, 2008, Monteiro, 2012).

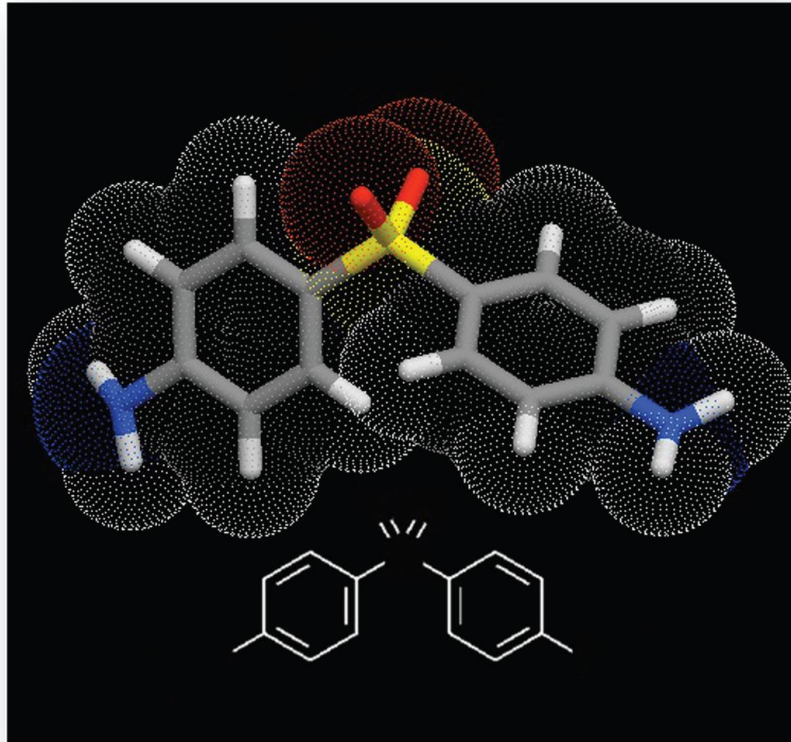


Figura 11. Estructura de dapsona (Monteiro, 2012)

La terapia con dapsona está con frecuencia limitada por su capacidad de inducir anemia hemolítica y metahemoglobinemia. Se ha encontrado que la administración a largo plazo de dapsona (100mg/día) resulta en una metahemoglobinemia en alrededor del 15% de los pacientes. La hemotoxicidad de este fármaco está mediada por sus metabolitos, que tienen acción directa y hemolítica sobre glóbulos rojos aislados de ratas (McMillan, 1998, Moulis, 2010).

5. ANTECEDENTES

Se han descubierto algunas propiedades notables de la dapsona confiriéndole un efecto antagonista contra convulsiones inducidas por ácido kaínico (KA), así como contra la neurotoxicidad o excitotoxicidad. Se ha probado la capacidad de dapsona para proteger el tejido neuronal del daño inducido por isquemia, en un modelo de rata donde se ocluye la arteria cerebral media (MCA), utilizando 9.3 mg/kg y 12.5 mg/kg en otros casos. El resultado de este trabajo revela a través de una evaluación cuantitativa del volumen del infarto cerebral una alta neuroprotección entre el 93% y 92% con las dosis de 9.3 y 12.5 mg/kg respectivamente, comparado con el grupo control (Ríos, 2004). En otro estudio se ocuparon ratas de la cepa Wistar, provocándoles crisis convulsivas con la aplicación de ácido kaínico (Se ha observado que a través de la despolarización causada por ácido KA, los niveles de Ca^{++} intraneural aumentan ocasionando daños neurotóxicos debido a la competencia con los GluR), posteriormente tomaron registro electroencefalográfico. Cabe mencionar que se utilizaron derivados de la dapsona. Estos derivados incluyeron: (I) 4, 42-diaminodifenil sulfona N,N2-diformaldehido sulfoxilato; (II) 4,42-diaminodifenilsulfona N,N2-didextrosa sulfonato; (III) dibisulfito de sodio 4,42-biscinamilidenamindifenil sulfona; y (IV) N, N2-dimetil-4,42-dimetilfenilsulfona. Se ocuparon cuatro grupos de ratas y a cada uno se les dio un derivado de la dapsona en diferentes dosis. Los resultados mostraron disminución de las crisis convulsivas en los grupos III y IV en un 55.6 y 70.78% respectivamente (López, 2003).

En un estudio realizado por Rodriguez, et al. en 1999, probó el efecto de dapsona en ratas a las cuales se les administró vía intraestriatal con ácido quinolínico con el fin de evaluar una posible acción protectora de este fármaco en las lesiones estriatales producidas después de la activación excesiva de los receptores NMDA. Se evaluaron las lesiones morfológicas 7 días después de la inyección intraestriatal (quinolinato 240nmol/ μ l) por microscopía de luz, y la proporción del daño neuronal por campo también se estimó como un índice cuantitativo de la toxicidad estriatal. El quinolinato produce una extensa necrosis y pérdida de

neuronas del cuerpo estriado. Se observó que dapsona a dosis de 12.5 y 25 mg/kg previno de manera significativa el cuerpo estriado de la toxicidad. La dapsona no tuvo efecto sobre el tejido del cuerpo estriado de ratas de control. Los hallazgos demuestran la capacidad de dapsona para prevenir el daño neuronal asociado a la acción excitatoria de quinolinato a través de la sobreactivación de los receptores NMDA, y proporcionan evidencias para apoyar la hipótesis de que actúa en contra del patrón de toxicidad provocada por agonistas de los receptores de Glu (Rodríguez, 1999)

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La neuroprotección farmacológica en pacientes que presentan enfermedades o lesiones cerebrales que cursan con un proceso fisiopatológico de excitotoxicidad ha demostrado ser muy útil. Esta rehabilitación que puede prevenir o contrarrestar los efectos celulares provocados en general por excitotoxicidad e inflamación, restaura la integridad del medio lesionado disminuyendo las secuelas. Lo que se busca en la neuroprotección en la mayoría de los casos es la disminución de la liberación de Glu, evitando la consecuente cadena de eventos que termina en apoptosis y con esto la pérdida, en muchos casos de funciones motoras o cognitivas.

A la fecha no existe un neuroprotector ideal, que no tenga efectos colaterales o que demuestre ser el adecuado para cualquier tipo de caso. Se han realizado numerosos estudios y siguen habiendo interrogantes acerca de su mecanismo de acción. Tal es el caso de la dapsona, se han realizado estudios como los de Ríos y colaboradores desde el año 2004 hasta la fecha, donde se ha demostrado que la dapsona tiene buenos resultados como preventivo y tratamiento en los casos de Eventos Cerebro-Vasculares. Sin embargo falta mucho por estudiar acerca de este fármaco. Se hace interesante para este trabajo averiguar de que manera trabaja la dapsona, si su acción neuroprotectora resulta de su actividad

antiinflamatoria, o si tiene alguna participación directa sobre la excitotoxicidad, por eso se realiza este estudio para conocer la participación de este fármaco sobre las corrientes iónicas que inician la excitotoxicidad, las corrientes NMDA. Lo más lógico sería hipotetizar que si las corrientes activadas de NMDA se disminuyen por lo tanto, se disminuye la entrada de Ca^{++} y se logra controlar el proceso fisiopatológico.

7. HIPÓTESIS

La dapsona reduce la corriente activada por NMDA en las células piramidales de la corteza motora de rata

8.OBJETIVOS

8.1 GENERAL

Evaluar el efecto de la dapsona sobre las corrientes activadas de NMDA en las células piramidales de la corteza motora de rata

8.2 PARTICULARES

- Identificar el efecto dosis respuesta de dapsona sobre la corriente activada por NMDA
- Evaluar la participación de glicina sobre la modulación dapsona- NMDA
- Evaluar el efecto de dapsona sobre el bloqueo dependiente de voltaje con Mg^{++} en la corriente activada por NMDA

9. MATERIAL Y MÉTODOS

9.1 MATERIAL:

- Ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 100- 125 gr.
- Halothano
- Vibratomo Campden, modelo VSL, Campden instrument LTD LE12717
- Sistema de gases: oxígeno y carbógeno
- Soluciones: Isetionato de sodio, solución salina balanceada de Earl (EBSS), solución balanceada de Hanks (HBSS), solución externa, solución interna y solución de baño.
- Pipetas Pasteur de punta corta de diferentes calibres
- Tubos de ensayo
- Cajas Petri estériles de poliestireno 35mm de diámetro (Nunclon Surface NUNC)
- Cámara de incubación seca para control de temperatura VWR – Scientific
- Microscopio invertido, marca Leica.
- Válvulas solenoides (The Lee Company, Essex CO LFAA 1201718H)
- Programa pClamp versión 8.0
- Amplificador Multiclamp 700A
- Tarjeta Digidata 1322^a
- Controlador de válvulas selenoides. Diseñado y armado en el laboratorio de Neuromodulación. Micromanipulador
- PC compatible

9.2 MÉTODO

El procedimiento fue llevado a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Estos fueron proporcionados por el Bioterio "Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; las ratas fueron alojadas en jaulas de policarbonato, mantenidas en condiciones de temperatura constante con un ciclo de luz-oscuridad (12 por 12 hrs) con un acceso libre de agua y alimento.

9.2.1 PROTOCOLO DE DISOCIACIÓN

- El protocolo de disociación que se utilizó es el descrito por Flores-Hernandez. et al. en el 2000 y en el 2002:
- Las ratas se anestesiaron con Halothano
- Se decapitaron, se extrajo el cerebro rápidamente
- Se coloca en solución fría de isotionato con bajo calcio (en mM): 140 isetionato de sodio, 2 KCl, 2 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 23 glucosa, 15 HEPES, pH= 7.4, 300 –310mOsm/L y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutation, 0.1 N^G-nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico, gasificada con O₂
- Se obtienen rebanadas coronales de 350µm con ayuda de un vibratomo (Campden) mientras estuvieron sumergidas en la misma solución.
- Las rebanadas se mantuvieron entre 1 a 6 horas a temperatura ambiente (20-22° C) en una solución salina balanceada de Earl (EBSS, SIGMA) amortiguada con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutation, 0.1 N^G-nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico; burbujeadada con 95% O₂/5%CO₂, pH= 7.4 ajustado con NaOH, y una osmolaridad de 300–310mOsm/L.

- Alrededor de 1 hora de incubación se tomó una rebanada de corteza prefrontal para su tratamiento enzimático (Papaina 10mg/ml); en la solución balanceada de Hanks (HBSS, SIGMA) amortiguada con HEPES burbujeada con O₂ a 37° C, 47 -nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico durante 15 minutos. Suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutation, 0.1 N^e-nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico.
- Transcurrido el tiempo de la digestión enzimática, el tejido se lavó con la solución de isetionato sódico y posteriormente se disoció mecánicamente con pipetas Pasteur de diferentes calibres (pulidas al fuego). La suspensión de células se sembró en cajas Petri de poliestireno (Nunclon Surface, NUNC) montadas en el microscopio invertido de registro.
- Después de 10 minutos de incubación la suspensión se lavó con una solución de fondo (en mM): 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, con una Osmolaridad de 300–310mOsm/L; para su posterior registro por medio de la técnica de fijación de voltaje.

9.2.2 TÉCNICA DE PATCH CLAMP EN CONFIGURACIÓN DE CÉLULA COMPLETA (*WHOLE CELL*).

Se empleó la técnica de patch clamp en configuración de célula (Bargas et al.,1994). Los electrodos de registro fueron estirados de tubos capilares de borosilicato tipo Corning 8250 (AM System. Inc, Carlsborg, WA) con una resistencia de 10MΩ.

La solución interna para registro de corrientes de Na⁺ y Ca⁺⁺, se encuentra compuesta de (en mM): 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, una osmolaridad de 265 –270mOsm/L.

La solución externa compuesta de (en mM): 127 NaCl, 20 CsCl, 5 BaCl₂, 2 CaCl₂, 12 glucosa, 10 HEPES, pH= 7.4 ajustada con NaOH, con una osmolaridad de 300-305 mOsm/L.

Los registros se obtuvieron con un amplificador para fijación de voltaje “voltaje Clamp” Multiclamp 700 A, controlado con el programa pClamp versión 10.0 ejecutándose en una computadora con procesador Pentium con una interfase tipo Digidata 1440 A

La resistencia de las micropipetas de registró osciló entre 5-10 MΩ en el baño. Después de la ruptura del sello, la resistencia serial fue menor a 25 MΩ. Los registros se realizaron en neuronas con un diámetro entre 25 a 50 μm. El potencial de membrana se mantuvo en -70mV mientras no hay protocolo activo.

9.2.3. APLICACIÓN DE FÁRMACOS

Para la inducción de corrientes de NMDA se aplicó a través de un sistema de aplicación rápida, se utilizaron dos capilares a una distancia de 200 a 600 μm de la célula a registrar. El intercambio de solución se realizó por la apertura de válvulas solenoides (The Lee Company, Essex CO LFAA 1201718H) comandadas por digidata 1322A de Axón Instruments y un aparato de control fabricado en el laboratorio.

La célula fue bañada por la solución del primer capilar con la solución externa, después del cambio la célula se bañó con la solución del segundo capilar conteniendo el Stock durante 3s 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 3ms. Los fármacos fueron preparados como soluciones concentradas en agua desionizada de al menos 1000 veces la concentración final a utilizar y DMSO (proporción 1:10).

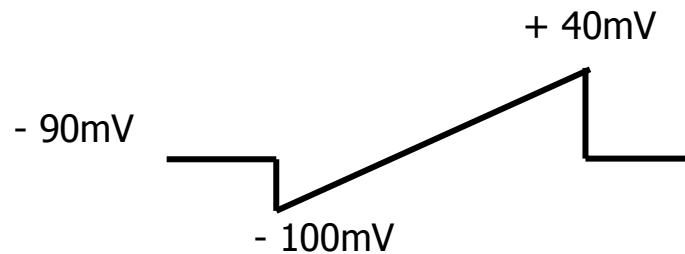
Posteriormente se adicionaron a la solución externa para realizar los registros electrofisiológicos junto con sus ligandos, como sigue:

- 1) Corrientes activadas por NMDA. La solución tanto externa (control) como la que contenía NMDA (100 μ M), estaban suplementadas con 10 μ M de glicina (co-agonista).
- 2) Aplicación de Dapsona. La solución externa, estaba suplementada con 10 μ M de glicina y DMSO (Stock de DMSO en una proporción de 1:10). Las soluciones fueron coaplicadas es decir, el capilar 1 tenía la solución control o la solución con Dapsona (stock de 5mM). Las concentraciones que se utilizaron de Dapsona fueron 1nM, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 μ M; mientras que el capilar 2 tenía el ligando NMDA.
- 3) Aplicación de Mg⁺⁺. La solución externa estaba suplementada con 10 μ M de glicina, DMSO, Tetrodotoxina 500nM (TTX), Cd 300 μ M. Las soluciones fueron coaplicadas, en el capilar 1 tenía la solución control o la solución con Dapsona (30 μ M) o Mg⁺⁺ (50 μ M), según el caso; mientras que el capilar 2 tenía NMDA.
- 4) Aplicación de Glicina. La solución externa estaba suplementada con DMSO. Las soluciones fueron coaplicadas, en el capilar 1 tenía la solución control con glicina o la solución con Dapsona (30 μ M) y glicina, según el caso. Las concentraciones de glicina utilizadas fueron 1,3,10 y 30 μ M; mientras que en el capilar 2 tenía NMDA (10 μ M) o NMA y Dapsona (30 μ M), según el caso.

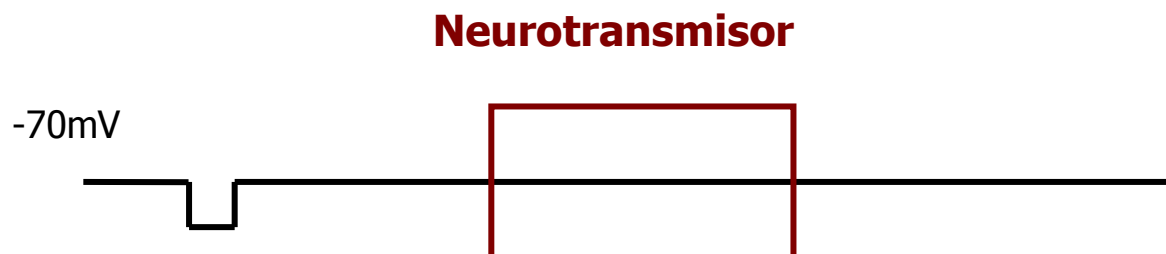
9.2.4 PROTOCOLOS ELECTROFISIOLÓGICOS

Los protocolos empelados para el registro electrofisiológico fueron:

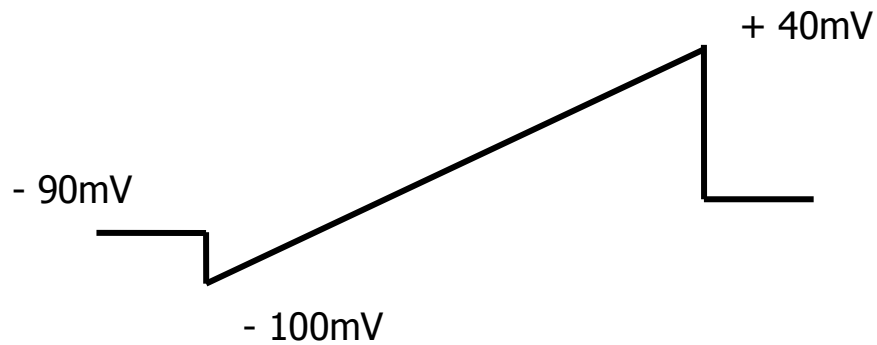
- ⊕ Rampa (-90 mV a +40 mV) con una duración de 200ms para generar las corrientes de Ca^{++} y Na^+ , debido a que la solución externa contiene cesio y bario que bloquean las corrientes de potasio.



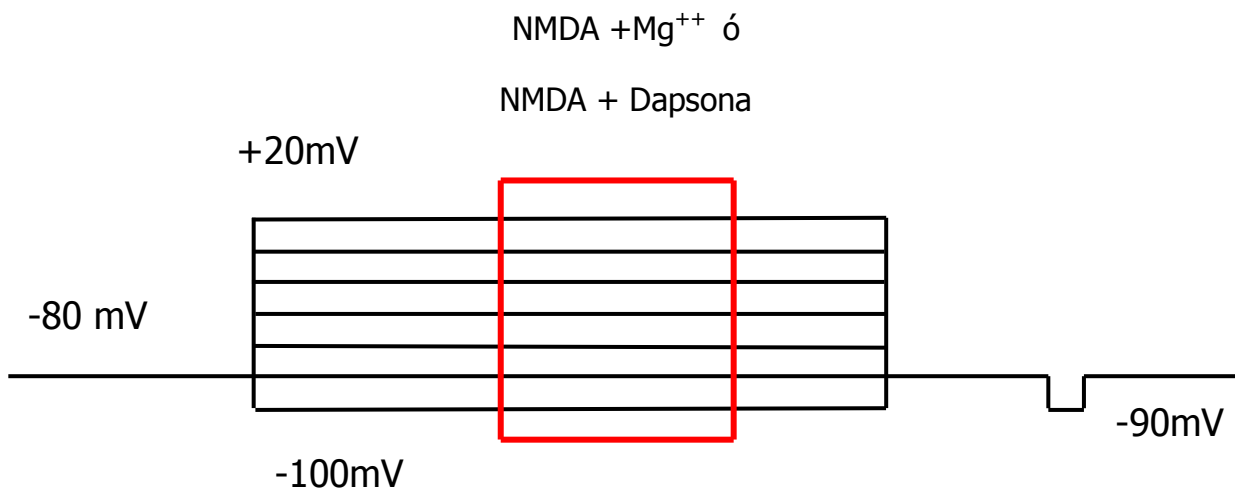
- ⊕ Protocolo de aplicación. El potencial de mantenimiento es de -70mV durante 6s; de los cuales 3s son para la aplicación del neurotransmisor. La duración total del protocolo fue de 15s.



- ⊕ Rampa larga (- 100mV a +40mV) con una duración de 10s, de los cuales 5s dura la aplicación del neurotransmisor. La duración total del protocolo es de 15s.



- ⊕ Protocolo IV con una duración de 20s, se utiliza para observar la dependencia de voltaje. Inicia con un voltaje de -100mV hasta llegar a +20mV.



Con el protocolo de aplicación se efectuó la curva dosis-efecto de dapsona y posteriormente la curva dosis-efecto de glicina. El protocolo de rampa larga se utilizó para obtener la dependencia de voltaje (en estado estacionario) de Mg^{++} y dapsona. Con el protocolo IV se obtuvo la dependencia de voltaje en el pico de la corriente de Mg^{++} y dapsona.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores que se observan en la gráficas y en el texto representan el valor medio de los resultados \pm el error estándar de su media (ESM). Los ajustes y las gráficas fueron realizados en el programa Origin 8 (Microcal Software Inc., Norton Hampton, MA), Sigma Plot 11.0 (Systat Software, Inc. Sigma Plot for Windows) y Graph Pd Software, Inc.

Para el análisis de la curva dosis efecto, se determinó la CE_{50} de Dapsona, (cuyo valor corresponde a la concentración a la cual se observa el 50% de reducción de la corriente, se utilizó el porcentaje de bloqueo. Empleando un ajuste logístico tipo sigmoidal con el programa Origin. La fórmula empleada para el ajuste es la siguiente:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2$$

Donde:

A_1 = Efecto máximo

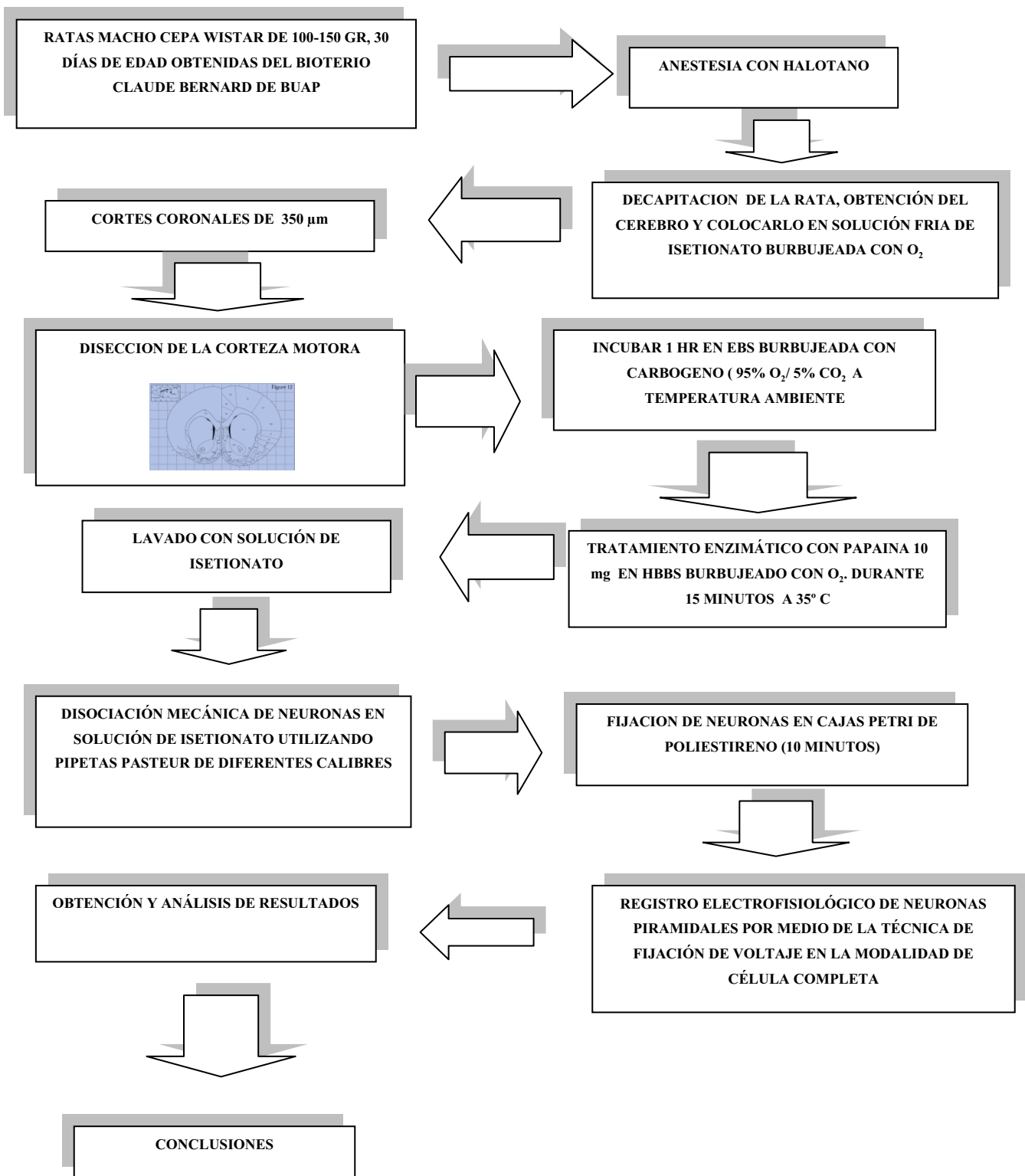
A_2 = Efecto mínimo

x = valor de la concentración

x_0 = CE_{50}

p = pendiente (coeficiente)

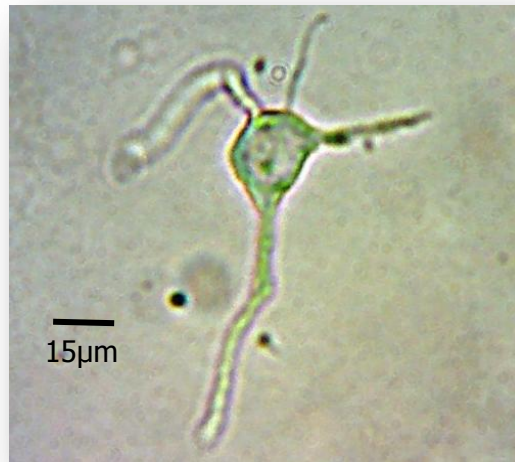
11. DIAGRAMA DE TRABAJO



12. RESULTADOS

12.1 PARÁMETROS

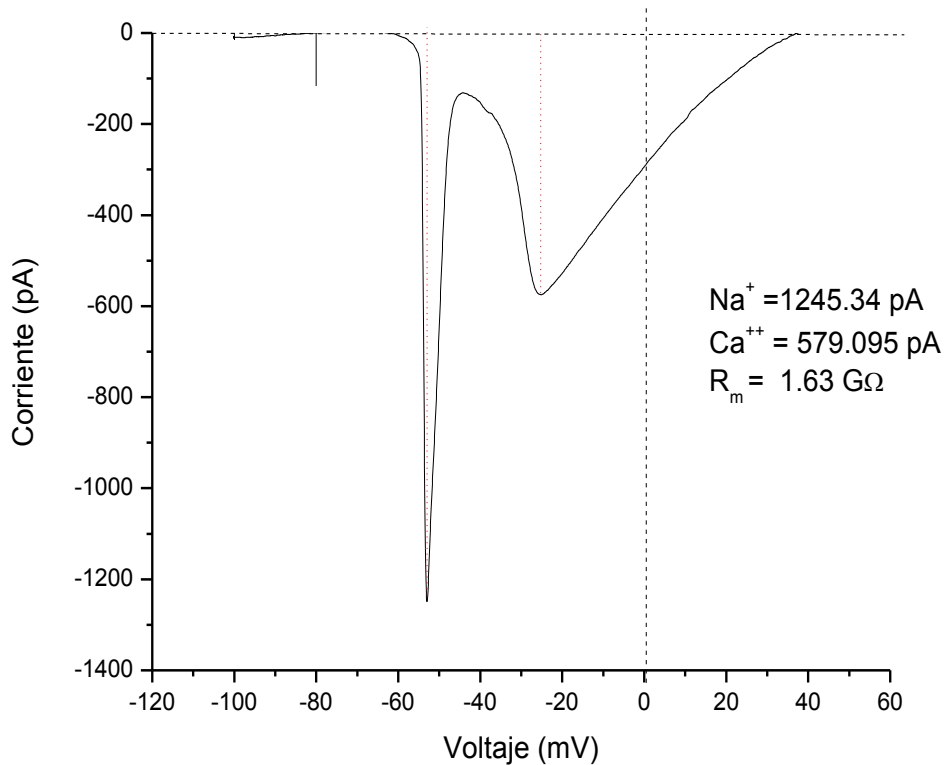
Se registraron un total de 107 células. Se tomó en cuenta solo aquellas células que presentaron una resistencia de membrana mayor a $800\text{M}\Omega$ y una resistencia de acceso menor a $25\text{M}\Omega$. La capacitancia de las células registradas osciló entre 5 y 20pF . En la figura 11 y 12 se muestran fotografías representativas de neuronas de corteza motora de rata, las fotografías fueron tomadas antes y durante del registro, lo cual permitió observar su morfología.



Figuras 11 y 12. En la primera figura se observa a una neurona piramidal. Se distingue el soma y la dendrita apical. En la segunda figura se muestra a una neurona durante el registro electrofisiológico.

12.2 RESULTADOS DE LOS PROTOCOLOS APLICADOS

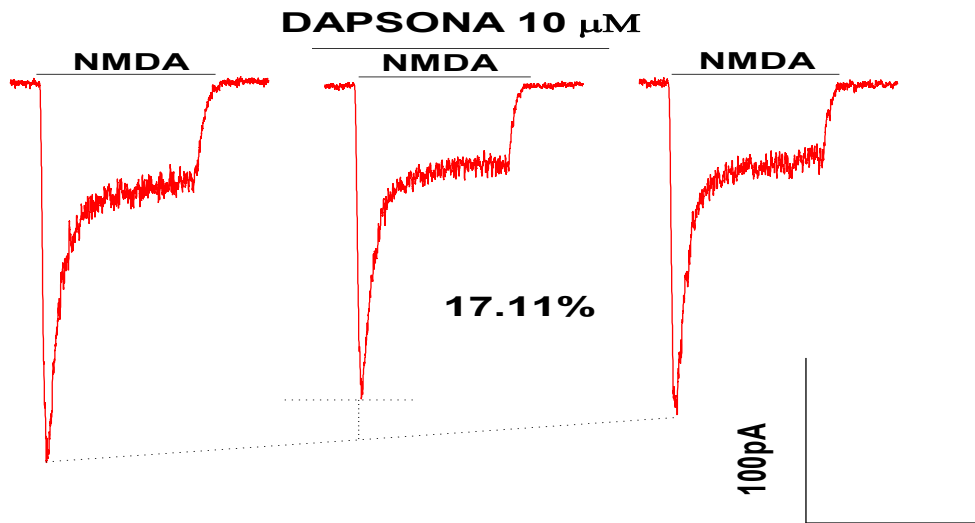
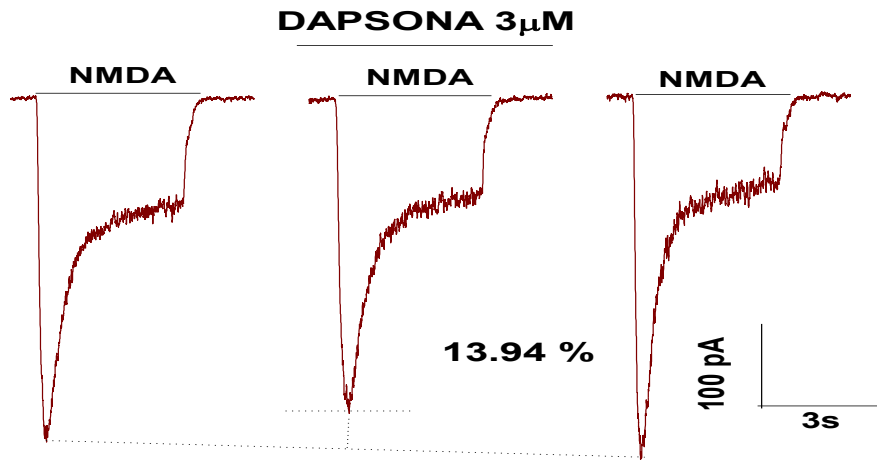
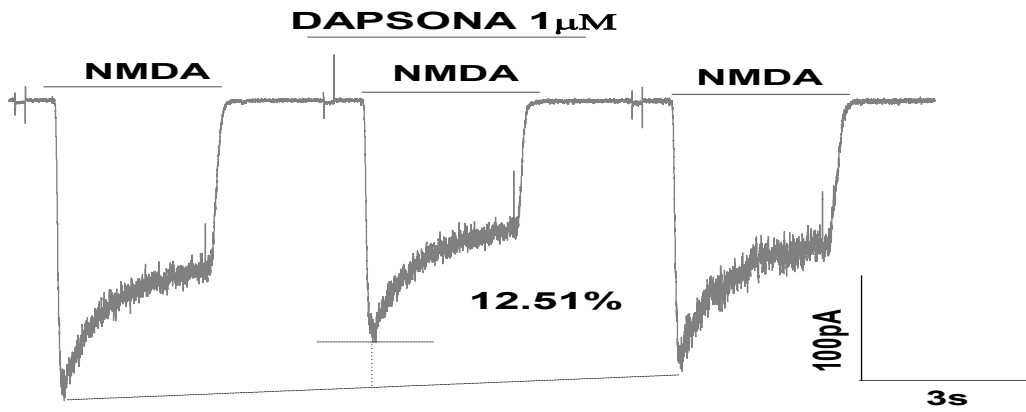
Al inicio del registro electrofisiológico se realizó una rampa de voltaje de -100mV +40mV con una duración de 200ms, como índice de viabilidad celular al estar presente la corriente de Na⁺ y Ca⁺⁺ (Gráf.1)

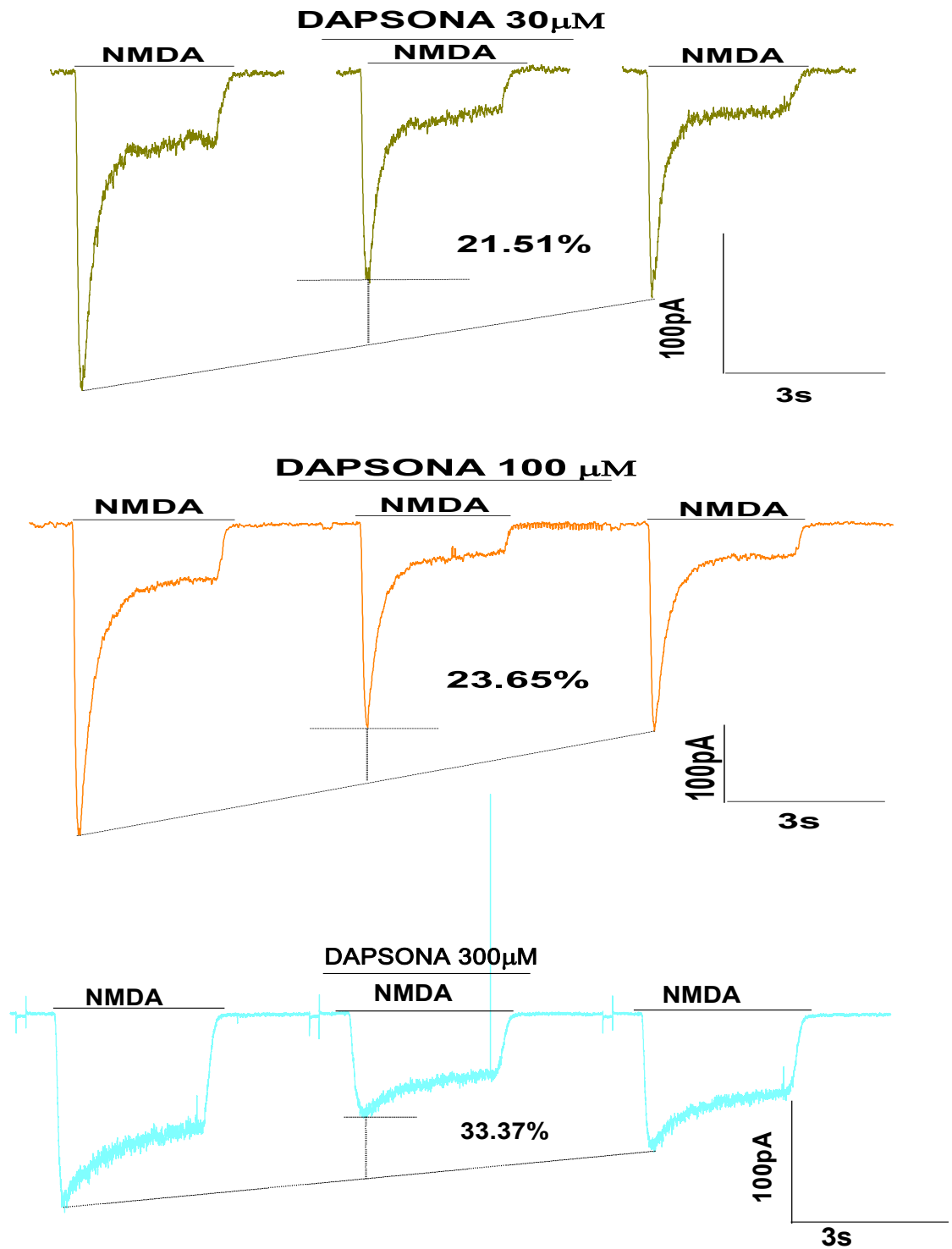


Gráfica 1. Registro de corrientes de Na⁺ y Ca⁺⁺. La corriente tiene un pico máximo a -45mV y luego a -10mV; estos picos corresponderían con la corriente de sodio y de calcio respectivamente.

12.2.1 EFECTO DE DAPSONA SOBRE LA CORRIENTE ACTIVADA DE NMDA

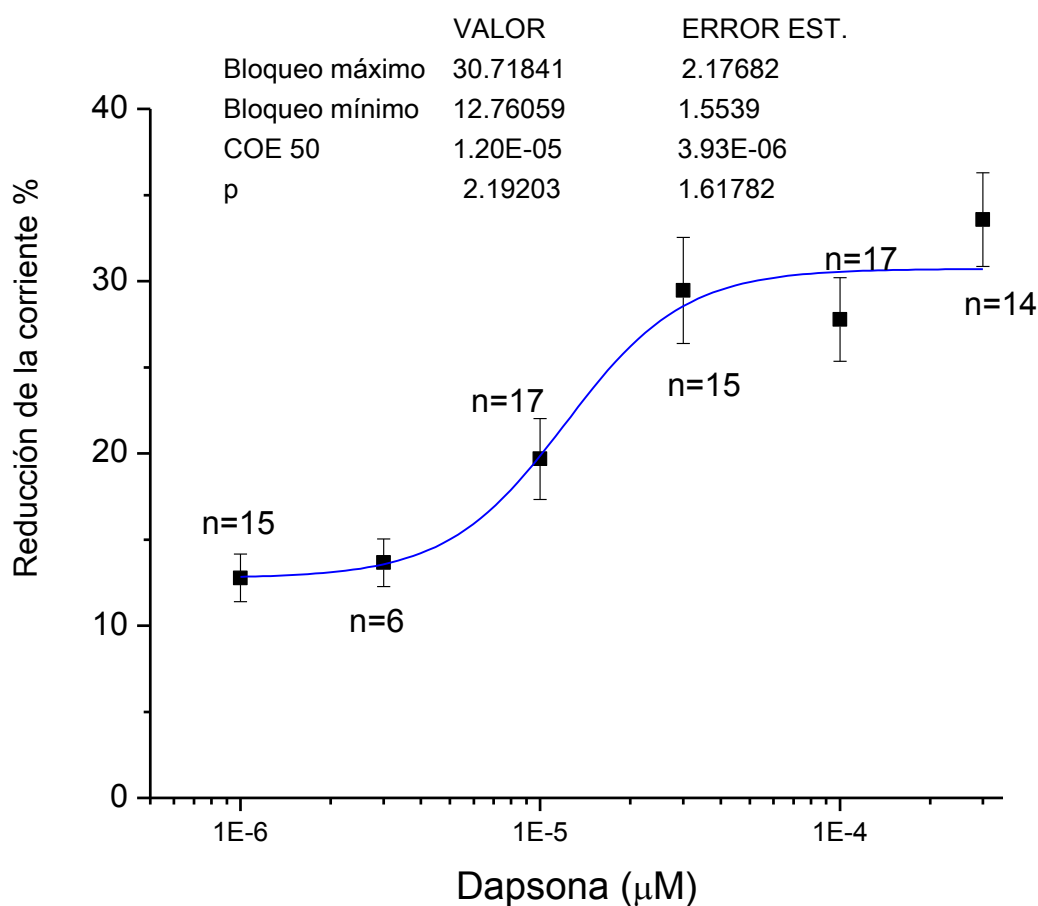
Se evaluó el efecto de la dapsona sobre las corrientes activadas de NMDA. Para lo cual se analizaron 54 células correspondientes a la corteza motora; el protocolo experimental consistió en aplicar dapsona a diferentes concentraciones (1,3,10,30,100 y 300μM) y NMDA (100μM) con glicina (10μM).





Gráfica 2. Trazos representativos del efecto de dapsona sobre la corriente activada por NMDA. Se muestra el porcentaje de bloqueo del pico de la corriente con diferentes concentraciones de dapsona (1, 3, 10, 30, 100, 300 μM) ($n=54$ células)

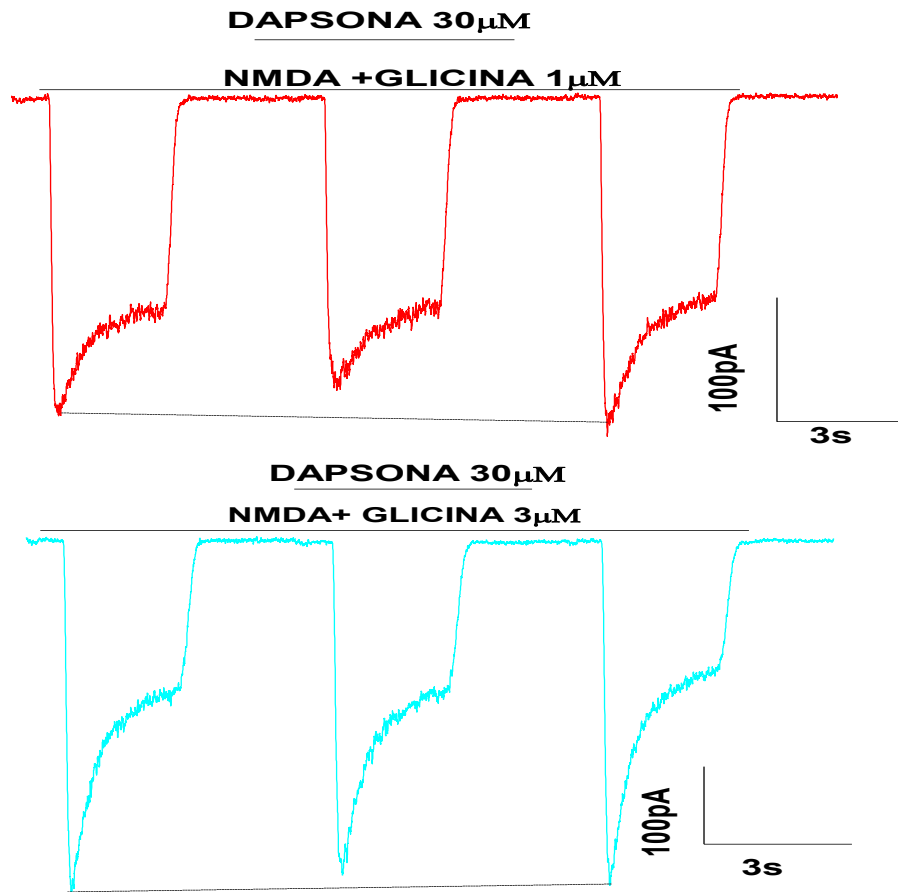
Se graficó el porcentaje de reducción con respecto a la media \pm ESM de cada una de las concentraciones utilizadas (Gráf. 3), mediante un ajuste logístico sigmoideal reportando un bloqueo máximo de $30.71 \pm 2.17\%$, una concentración efectiva al 50 (CE₅₀) de $12 \pm 3.9 \mu\text{M}$. Los datos fueron comparados estadísticamente con la prueba ANOVA de medidas repetidas con una postprueba de Bonferroni ($p < .001$), resultando con una diferencia significativa entre las diferentes concentraciones ($p = < .001$).

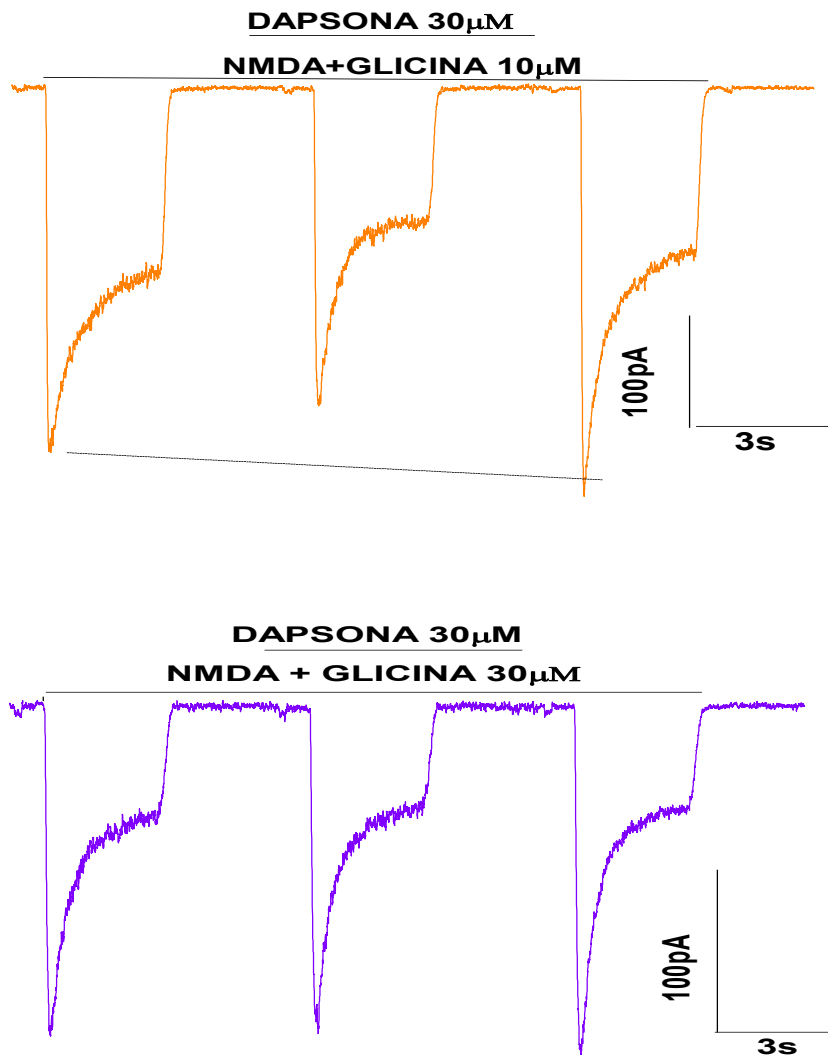


Gráfica 3. Curva concentración- efecto de dapsona en presencia de NMDA $100 \mu\text{M}$. Se graficó el porcentaje de reducción a partir de la densidad de corriente.

12.2.2 EFECTO DE DAPSONA SOBRE LA CORRIENTE ACTIVADA DE NMDA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SU CO-AGONISTA GLICINA

Se registraron 22 células para estudiar el papel de la glicina (que es considerado el co-agonista del receptor NMDA) que ejerce sobre las corrientes activadas por NMDA y en presencia de dapsona. Se utilizó una concentración de NMDA de $100\mu\text{M}$ y de dapsona $30\mu\text{M}$. En ambos casos estas concentraciones tienen un efecto saturante. Las concentraciones de glicina utilizadas fueron $1, 3, 10$ y $30\mu\text{M}$.



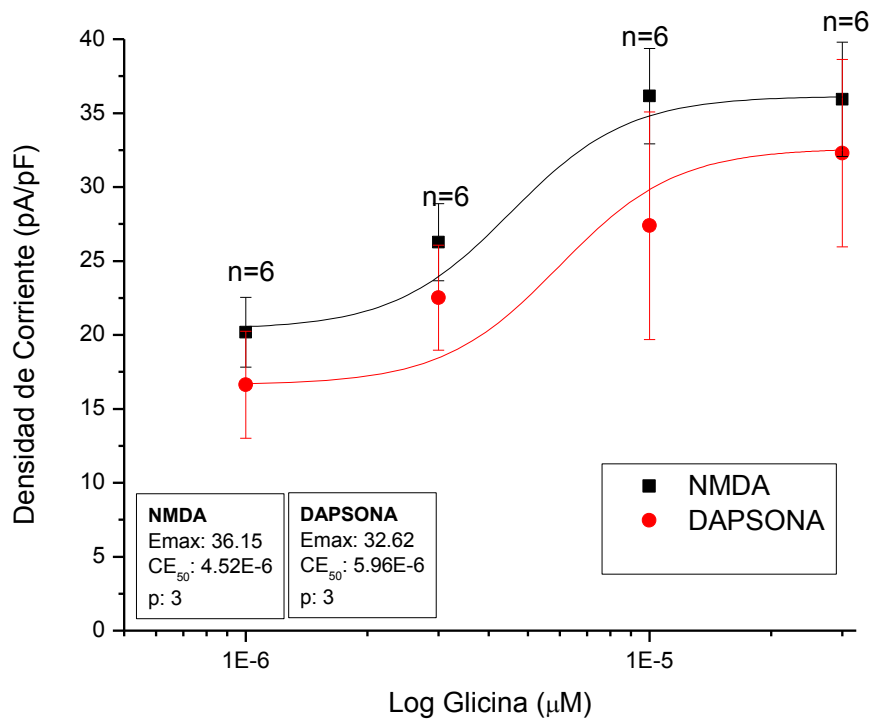


Gráfica 4. Trazos representativos de la corriente de NMDA ($100\mu\text{M}$) + glicina a 1,3,10,30 μM en presencia de dapsona a 30 μM . Se observa el efecto sobre la densidad de corriente (pA/pF)

Se observa que a mayor concentración de glicina hay una potenciación de la corriente activada por NMDA y aquella modulada por dapsona (Gráf.4). Se analizaron 6 células por cada concentración y grupo, mediante un ajuste logístico sigmoïdal se reporta una CE50 para NMDA de $4.52\mu\text{M}$ mientras que para la

dapsona de $5.96\mu\text{M}$, el efecto máximo de la dapsona fue de 32.62 mientras que para NMDA fue de 36.15 (Gráf. 5)

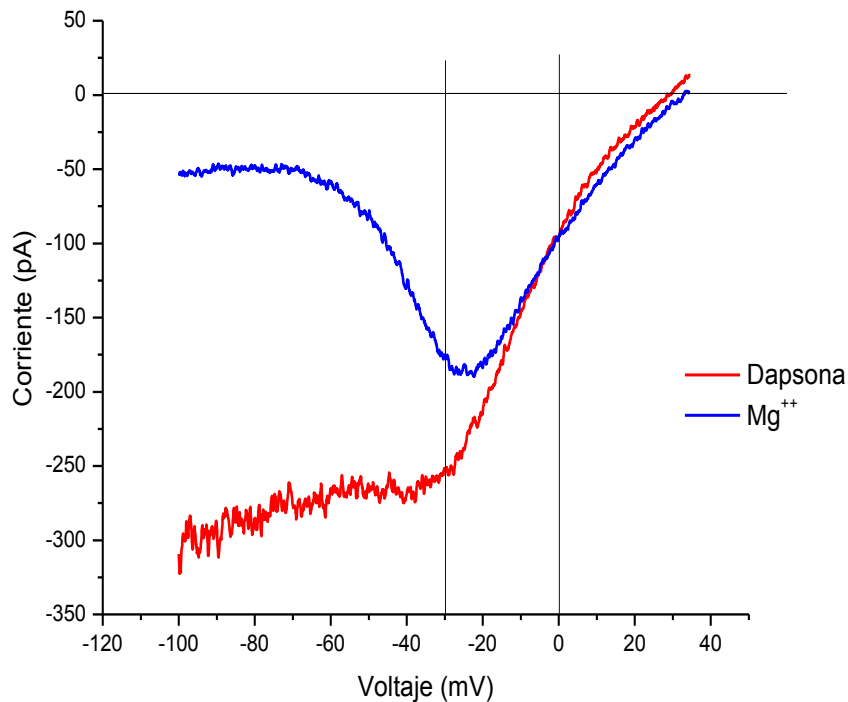
Sin embargo, al comparar la densidad de corriente con respecto a la concentración de glicina en ambos grupos de trabajo, (control y dapsona) mediante una prueba de ANOVA de 2 vías de medidas repetidas y con una postprueba de Bonferroni ($p < 0.05$), indica que no existen cambios significativos entre ambos grupo de trabajo ($F(3,47)=0.157$ y $p= 0.924$); por lo que se puede concluir que la dapsona no interfiere con la funcionalidad de la glicina como coagonista de la corriente activada por NMDA.



Gráfica 5. Curva dosis-efecto de glicina en presencia de NMDA ($100\mu\text{M}$) y dapsona ($30\mu\text{M}$). Se graficó la densidad de corriente contra la concentración de glicina utilizada ($n=6$ células)

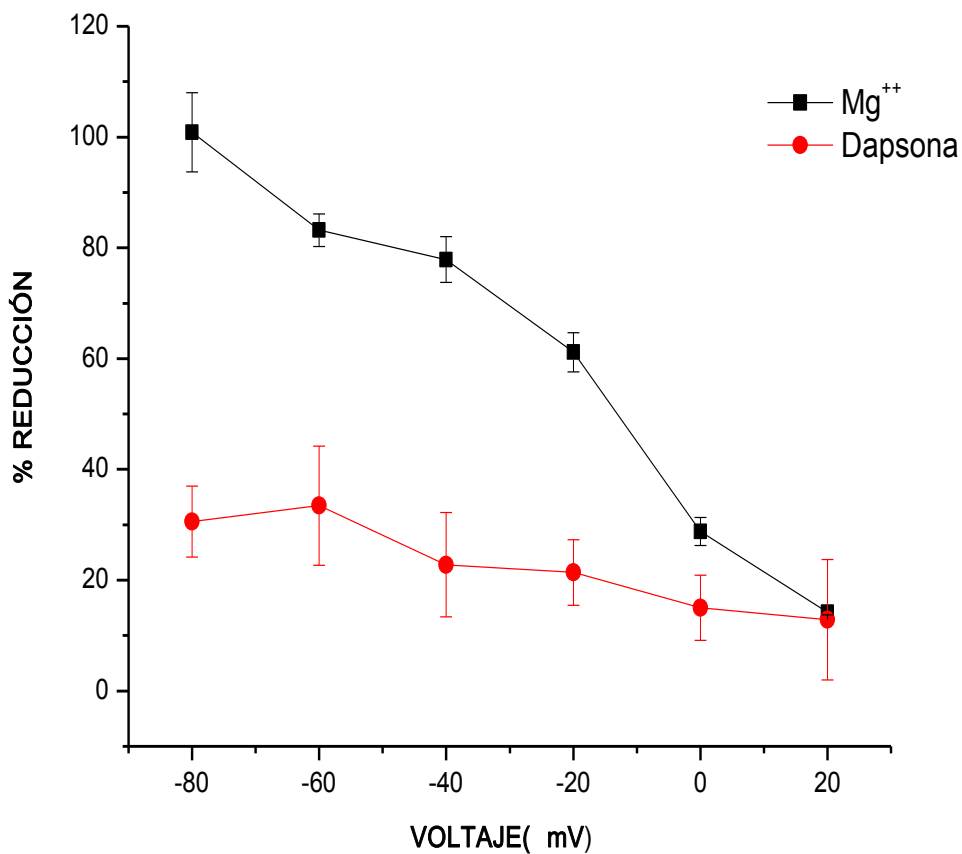
12.2.3 DEPENDENCIA DE VOLTAJE DE DAPSONA SOBRE LA CORRIENTE ACTIVADA DE NMDA

Se registraron 19 células para estudiar la dependencia de voltaje de dapsona sobre la corriente activada de NMDA (100 μ M) con su co-agonista glicina (10 μ M), bajo los parámetros establecidos. Para este estudio se bloquearon los canales de Na⁺ con TTX (500nM) y los de Ca⁺⁺ con Cd (300 μ M). Los resultados muestran que el Mg⁺⁺ bloquea reversiblemente la corriente activada de NMDA. En el estudio del efecto reductor de la dapsona los resultados fueron variable y no podemos confirmar si hay o no efecto con diferentes voltajes. Se utilizó el protocolo de rampa y se graficó el estado estacionario (Gráf. 6).



Gráfica 6. Los trazos muestran el comportamiento de la corriente activada por NMDA en el estado estacionario. El trazo azul es el correspondiente a la reducción dependiente de voltaje por Mg⁺⁺ de la corriente activada por NMDA. El trazo en rojo corresponde al comportamiento de la corriente cuando se aplica dapsona y se observa que la corriente es independiente al cambio del voltaje.

En el análisis de la dependencia de voltaje de dapsona al pico de la corriente, se realizó una ANOVA de una Vía ($p < .05$) reportando que estadísticamente no existe diferencia significativa entre los datos obtenidos a diferentes voltajes ($p = .4$) (Gráfica 7).



Gráfica 7. Comparación del comportamiento al cambio de voltaje del Mg^{++} y de dapsona. Se grafica el porcentaje de bloqueo al pico de la corriente. Se observa el cambio de Mg^{++} , existiendo un bloqueo del 100% a $-80mV$ y conforme aumenta el voltaje va disminuyendo el bloqueo. Reducción del pico de la corriente de NMDA por Dapsona $30 \mu M$ a diferentes potenciales de mantenimiento.

13. DISCUSIÓN

13.1 Efecto de Dapsona sobre la corriente activada de NMDA.

Los resultados presentados en este trabajo representan los primeros estudios acerca del efecto de dapsona sobre las corrientes activadas por NMDA. El efecto inhibitor que provoca se observó de manera clara, el vehículo que se ocupó fue DMSO, y éste penetra las membranas biológicas sin daño significativo a su integridad (Kais, 2013).

Se han realizado estudios histológicos o electroencefalográficos para conocer la participación de este fármaco en procesos patológicos como la isquemia cerebral en rata o crisis convulsivas. El resultado de este trabajo revela a través de una evaluación cuantitativa del volumen del infarto cerebral una alta neuroprotección entre el 93% y 92% con las dosis de 9.3 y 12.5 mg/kg respectivamente, comparado con el grupo control (Ríos, 2004)

En otro estudio se ocuparon ratas de la cepa Wistar, provocándoles crisis convulsivas a través de ácido kaínico, posteriormente tomaron registro electroencefalográfico. Dos de los grupos estudiados y tratados con un derivado de dapsona mostraron disminución en los episodios de crisis convulsivas en un 55.6 y 70.78% (López- Naranjo, 2003). Los estudios de López- Naranjo y Ríos, han revelado una mejoría significativa en comparación al grupo control. Por esta razón, dapsona se ha propuesto como el primer tratamiento eficaz contra las consecuencias incapacitantes asociadas con el infarto cerebral en pacientes (Ríos, 2007).

El efecto neuroprotector que se le atribuye a dapsona podría ser provocado por bloqueo de los canales de NMDA, ya que es conocida la participación de estos canales en el proceso de excitotoxicidad. Los resultados muestran que dapsona si tiene un efecto reductor en la corriente de NMDA, el porcentaje máximo de bloqueo es del 30% en una concentración de 300µM, es importante señalar que en esta concentración dapsona presenta efectos tóxicos para la célula (Lopez-

Naranjo, 2003) ya que se observó que modifica la corriente de tal manera que no se recupera al 100%. En estudios anteriores se ha encontrado que la recuperación parcial de la corriente de NMDA por la aplicación de ketamina (antagonista de NMDA) no dependía del voltaje, esto evidencia que su unión al receptor no puede ser superficial (Kotermanski, 2009).

En otros estudios electrofisiológicos se observó que el bloqueo de NMDA por MK-801 persistió mucho tiempo después de que el fármaco había sido lavado. Esta propiedad significa que el bloqueo por MK-801 es muy estable y podría considerarse como “irreversible” (McKay, 2013). Para obtener la recuperación de la corriente de NMDA por el bloqueo de MK-801 se ha observado que la exposición (10 min) a 100 μ M de NMDA promovió un aproximado de 20% de recuperación, confirmando que el poro del receptor debe permanecer abierto para poder recuperarse (McKay, 2013).

13.2 Dependencia de voltaje de Dapsona.

Al igual que el Mg⁺⁺, los antagonistas no competitivos del receptor NMDA como la ketamina, dextrometorfano, memantina, fenciclidina (PCP) y MK-801 bloquean el canal en el estado abierto, aunque la cinética de bloqueo y dependencia de voltaje de este efecto depende del antagonista (Danisz, 1998)

Se realizaron estudios para observar una posible dependencia de voltaje de dapsona en la corriente de NMDA, encontrando que no tiene una relación con el voltaje, se presenta la misma reducción de la corriente. En otras investigaciones se ha observado que en cuanto a la influencia del Mg⁺⁺ en la disociación de MK-801 a partir de NMDA, el Mg⁺⁺ puede acelerar su disociación, sin embargo en otros estudios no se encontraron ningún efecto del Mg⁺⁺ (McKay, 2013).

Se observó el efecto de Mg^{++} sobre la corriente de NMDA, el cual es muy claro en valores muy negativos de voltaje pero este bloqueo se reduce dramáticamente en un rango de -30 a -10mV, esto significa que este receptor es activado solo después de la despolarización de una membrana postsináptica (Danisz,1998, Yang, 2010). Este bloqueo de Mg^{++} , tanto el magnesio intracelular como extracelular están estrechamente relacionados con la conductancia (la tendencia relativa de los iones permeantes para moverse hacia afuera o hacia adentro), un fenómeno novedoso que indica la existencia de un flujo de acoplamiento o el movimiento acoplado de iones y por tanto la ocupación simultánea del canal de NMDA por múltiples iones (Yang, 2010).

13.3 Participación de Glicina.

El receptor NMDA está modulado positivamente por glicina (Danisz,1998). Parsons y cols. Demostraron que el aumento de la concentración de glicina a partir de 53nM a 1020nM provocó una progresiva potenciación de la corriente de NMDA (200 μ M) más evidente para la respuesta meseta que para la del pico, es decir, que el grado de desensibilización está inversamente relacionado con la concentración de glicina (Parsons, 1993).

El estudio de Bettinni et al, (2010) sugirió que la acción antagonista de TCN 213 (antagonista selectivo de NMDA para NR2A, NR2B) fue, en parte mediada por glicina en los receptores de NMDA. En una serie de experimentos para determinar si el antagonismo producido por TCN213 era dependiente de la concentración de glicina y/o del Glu, se expresaron los receptores NMDA (100mM), glicina a diferentes concentraciones y TCN 213 (10 μ M). Los resultados mostraron que el antagonismo de TCN 213 es un tanto dependiente de glicina. **1)** La corriente de NMDA con la misma concentración del antagonista, va aumentando conforme aumenta la concentración de glicina. Y **2)** con una concentración de Glu que iba en aumento, la misma concentración del antagonista y una concentración saturante de glicina (50 μ M), se observó que la corriente aumentaba conforme

aumenta la concentración de Glu, sin embargo presenta una ligera disminución en comparación de la corriente en el punto 2 (McKay, 2011)

Los resultados de este trabajo muestran que a mayor concentración de glicina la corriente de NMDA se ve potencializada. Por otro lado cuando a la célula se le aplicó dapsona para observar el comportamiento se encontró una disminución de la densidad de corriente (pA/pF). Aún cuando se observa disminución de la corriente cuando se aplica dapsona y esta disminución conforme la corriente se va potencializando con las distintas concentraciones de glicina se hace mayor; los resultados fueron sometidos a una prueba estadística y no mostraron diferencias significativas, por lo que se puede concluir que la dapsona no interfiere con la funcionalidad de la glicina como coagonista de la corriente activada por NMDA.

14. CONCLUSIÓN

Con base en los objetivos propuestos tenemos:

1.- La N, N'-4,4'diaminodifenilsulfona, dapsona, tiene un efecto bloqueador sobre la corriente activada de NMDA, el bloqueo máximo obtenido fue del 30% de la corriente de NMDA.

2.- Dapsona no interfiere con la funcionalidad de la glicina como coagonista de la corriente activada por NMDA.

3.- Dapsona no tiene relación dependiente de voltaje para bloquear la corriente activada por NMDA.

15. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Albarracín SL., Lareo LR. (2007) Modelo Integrador para las rutas de señalización diferencial del receptor ionotrópico a glutamato activado por N-Metil-D- Aspartato. Revista Ciencias de la Salud. 5(2): 92-105
- ❖ Bannister AP., (2005). Inter and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex. Neuroscience Research 53: 95-103
- ❖ Castillo J. (2000) Fisiopatología de la isquemia cerebral. Revista de Neurología. 30: 447-459

- ❖ Cheng TD., AL-Khoury L., Zivin JA., (2004) Neuroprotection for Ischemic Stroke: Two Decades of Success and Failure. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 1: 36-45

- ❖ Corrales Padilla H. (1967) Diamino Difenil Sulfona en Psoriasis. *Revista Médica de Honduras*. 35: 15-19

- ❖ Danisz H., Parsons C., (1998) Glycine and N-Methyl- D-Aspartate Receptors: Physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacological Reviews*. 50(4): 598-650

- ❖ Debol SM., Herron MJ., Nelson RD. (1997) Anti-inflammatory action of dapsone; inhibition of neutrophil adherence in associated with inhibition of chemoattractan- induced signal transduction. *Journal of Leukocyte Biology*. 62: 827-837

- ❖ Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis SF. (1999) The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacological Reviews*. 51(1): 7-61

- ❖ Estrada Rojo F., Morales Gómez E., Tabla Ramón E., Solís Luna B., Navarro Argüelles HA., Martínez Vargas M., et al. (2012). Neuroprotección y traumatismo craneoencefálico. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 55(4): 16-29

- ❖ Feldmeyer D., (2012) Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*, 6 (24): 1-22

- ❖ Flores-Hernández J., Cepeda C., Hernández- Echegaray E., Calvert CR., Jokel ES., Fienberg AA., Greengard P., Levine MS. (2002) Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *Journal of Neurophysiology*. 88(6): 3010-3020

- ❖ Flores- Hernández J., Hernández S., Snyder GL., Yan Z., Fienberg AA., Moss SJ., Greengard P., Surmeier DJ. (2000) D(1) 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-Soto ME., Chaparro-Huerta V., Escoto-Delgadillo., Vazquez- Valls E., González Castañeda RE., Beas-Zarate C., (2011) Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología* : 1-10

- ❖ Fuster J. (2001) The Prefrontal Cortex-An Update: Time is of the essence. *Neuron*, 30: 319-333

- ❖ Ginsberg MD. (2008) Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future. *Neuropharmacology*. 55(3): 363-389

- ❖ Harvey BK., Airavaara M., Hinzman J., Wires EM., Chiocco MJ., Howard DB., Shen H., Gerhardt G., Hoffer AJ., Wang Y. (2011). Targeted Over-Expression of Glutamate Transporter 1 (GLT-1) reduces Ischemic Brain injury in Rat Model of Stroke. *Plos-one*. 6 (8): 1-7.

- ❖ Herculano Houzelab S., Motaa B., Wongc P., Kaasc JH. (2010) Connectivity-driven White matter sacling and folding in primate cerebral cortex. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 107(44): 19008-19013

- ❖ Hooks BM., Mao T., Gutnisky DA., Yamawaki N., Svoboda K., Shepherd GMG., (2013) Organization of cortical and thalamic input to pyramidal neurons in mouse motor cortex. *Journal Neuroscience*, 33(2): 748-76

- ❖ Jeffrey a., Dzubay., Craig EJ. (1996). Kinetics of NMDA channel opening. *The Journal of Neuroscience*. 16(13): 4129-4134.

- ❖ Jocoy EL., André VM., Cummings DM., Rao SP., Wu N., Ramsey AJ., Caron MG., Cepeda C., Levine MS. (2011) Dissecting the contribution of individual receptor subunits to the enhancement of N-methyl-D-aspartate currents by dopamine D1 receptor activation in striatum. *Frontiers in systems Neuroscience*. 5(28): 1-16.

- ❖ Kais B., Schneider K., Keiter S., Henn K., Ackermann C., Braunbeck T., (2013) DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-Implications for the fish embryo test (FET). *Aquat Toxicol* 140-141C:229-238.

- ❖ Kandel ER., Schwartz JH., Jessell TM. (2000) *Principles of Neural Science*. 248

- ❖ Kotermanski SE., Wood JT., Johnson JW. (2009) Memantine binding to a superficial site on NMDA receptors contributes to a partial trapping. *Journal of Physiology*. 587(19): 4589- 4603.

- ❖ Krubitzer L., Campi KL., Cooke DF., (2011) All Rodents are not the same: A modern Synthesis of Cortical Organization. *Brain Behavior Evolution*, 78:51-93

- ❖ Leciñana Cases M., Pérez GP., Díez Tejedor E. (2004) Recomendaciones para el tratamiento y prevención del ictus. *Guías oficiales de la Sociedad Española de Neurología*. 39: 465- 486

- ❖ Lerma J., (1997) Receptores postsinápticos de neurotransmisores. *Real Academia de Ciencias Exactas Física Naturales (Esp)*. 91: 272-277

- ❖ Levine AJ., Lewallen KA., Pfaff SL., (2012) Spatial organization of cortical and spinal neurons controlling motor behavior. *Curr Opin Neurobiol*, 22(5): 812-821

- ❖ Lonnie p., Wollmuth., Sobolevsky AI., (2004). Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends in Neurosciences* 27(6):321-328

- ❖ López Naranjo F., Castañeda López C., Rojas Oviedo Irma., Altagracia Martínez M., Krazov Jinich J., Manjarrez Marmolejo J. (2003) Anticonvulsant activity of Dapsone Analogs. *Electrophysiologic Evaluación. Archives of Medical Research*. 34: 269-272.

- ❖ Marín-Padilla M., (2014) The mammalian neocortex new pyramidal neuron: a new conception. *Frontiers in Neuroanatomy*, 7(51): 1-9

- ❖ McKay S., Bengtson CP., Bading H., Wyllie DJA., Hardingham GE. (2013) Recovery of NMDA receptor currents from MK-801 blockade is accelerated by Mg^{++} and memantine under conditions of agonist exposure. *Neuropharmacology*. 74: 119-125.

- ❖ McKay S., Griffiths NH., Butters PA., Thurbron EB., Hardingham GE., Willey DGA. (2011). Direct pharmacological monitoring of the developmental switch in NMDA receptor subunit composition using TNC 213, a GluN2A-selective, glycine-dependent. *British Journal of Pharmacology*. 166: 924-937.

- ❖ McMillan DC., Jensen CB., Jollow DJ. (1998) Role of lipid Peroxidation in Dapsone-Induced Hemolytic Anemia. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 287(3): 868-876

- ❖ Maxim A., Nikolaev., Lev G., Magazanik., Tikhonov DB. (2012) Influence of external magnesium ions on the NMDA receptor channel block by different types of organic cations. *Neuropharmacology*. 62: 2018- 2085

- ❖ Medina Marín AM., Escobar Betancourth MI., (2002). Sistema Glutamatérgico. Primera parte: Sinaptología, Homeostásis y Muerte. *Revista Colombiana de Psiquiatría* 31(3):187-212

- ❖ Monteiro ML., Lione VF., Do Carmo FA., Do Amaral LH., Da Silva JH., Nasciutti LE., Rodrigues CR., Castro HC., De Sousa VP., Cabral LM. (2012) Development and characterization of a new oral dapsone nanoemulsion system: permeability and in silico bioavailability studies. *International Journal of Nanomedicine*. 7: 5175-5182

- ❖ Moreno-González G., Zarain-Herzberg A., (2006). Papel de los receptores de Glutamato durante la diferenciación neuronal. *Salud Mental* 29(5):38-48

- ❖ Moulis G., Bagheri H., Martory Saint J., Bernad P., Monstastruc JL. (2010) Very late relapse of dapsone-induced methaemoglobinemia. *Eur J. Clin Pharmacology*. 66: 645- 646.

- ❖ Musante V., Summa M., Cunha RA., Raiteri M., Pitalugga A. (2011) Pre-synaptic Glycine Glyt1 transporter - NMDA receptor interaction: relevance to NMDA autoreceptor activation in the presence of Mg²⁺ ions. *Journal of Neurochemistry*. 117: 516-527.

- ❖ Nasiripourdori A., Taly V., Grutter T., Taly A. (2011) From Toxins targeting ligand gated Ion Channels to therapeutic Molecules. *Toxins*. 3: 260-293

- ❖ Nicoletti F., Bockaert J., Collingridge GL., Conn PJ., Ferraguti F., Schoepp DD., Wroblewski JT., Pin JP., (2011) Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* 60(0): 1017-1041

- ❖ Nieuwenhuys R., Voogd J., Van Huijzen C. (2009) El Sistema Nervioso Central Humano. 617

- ❖ Paxinos G., (2004) The Rat Nervous System. 730, 735

- ❖ Pimienta J, H. (2004) La Corteza Cerebral más allá de la Corteza. *Revista colombiana de Psiquiatría*, 1, XXIII.

- ❖ Ríos C., Nader- Kawachi J., Rodriguez Payán AJ., Nava Ruiz C. (2004) Neuroprotective effect of dapsone in an occlusive model of foral ischemia in rats. *Brain Research*. 999: 212- 215

- ❖ Ríos Castañeda L., Martínez MA., Kawachi JN, Kravzov Jinich J (2007).
Uso de la dapsona como neuroprotector en el infarto cerebral. Oficinas Española de patentes y marcas. 1-10.

- ❖ Rodríguez E., Méndez Armenta M., Villeda Hernández J., Galván Arzate S., Barroso Moguel R., Rodríguez F., Ríos C., Santamaría A. (1999) Dapsone prevents morphological lesions and lipid peroxidation induced by quinolinic acid in rat corpus striatum. *Toxicology*. 139 (1-2) 111-118

- ❖ Rogers N., Bustos B., González R. (2009). Neuroprotección mediada por BDNF y Óxido Nítrico frente a excitotoxicidad en neuronas corticales e hipocampales. *Revista ANACEM*. 3(2): 24-27.

- ❖ Sanchez- Saldaña L. (2008) Medicamentos antiguos y vigentes en Dermatología. *Dematología Peruana*. 18 (3): 229-261

- ❖ Sanz-Clemente A., Nicoll RA., Roche KW. (2013) Diversity in NMDA receptor composition: many regulatos, many consequences. *Neuroscientist*. 19(1): 62-75.

- ❖ Tellez Vargas J., (2006) Glutamato, bipolaridad y neuroprotección. *Avances en Psiquiatría Biológica* 7:38-58

- ❖ Tsubo Y., Isomura Y., Fukai T., (2013). Neural dynamics and information representation in microcircuits of motor cortex. *Frontiers in Neural Circuits* 7 (85): 1-10

- ❖ Valverde F., (2002) Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Revista Neurológica*, 34 (8): 758-780
- ❖ Ueta Y., Hirai Y., Otsuka T., Kawaguchi Y., (2013) Direction-anddistance-dependent interareal connectivity of pyramidal cell subpopulations in the rat frontal cortex. *Frontiers in Neural Circuits*, 7 (164): 1-16
- ❖ Wang LY., McDonald JF. (1995) Modulation by magnesium of the affinity of NMDA receptors for glycine in murine hippocampal neurons. *Journal of Physiology*. 486: 83-95
- ❖ Wolf R., Orni- Waserlauf R. (2000) A century of the synthesis of Dapsone: it's anti-infective capacity know and then. *International Journal of Dermatology*. 39: 779-783.
- ❖ Wozel G., Blasum C. (2013) Dapsone in dermatology and beyond. *Arch. Dermatology Research*. 306: 103-124.
- ❖ Yang YC., Lee CH., Kou CC. (2010) Ionic flow enhances low-affinity binding: a revisited mechanistic view into Mg^{++} block of NMDA receptors. *The Journal of Physiologi*. 588 (4): 633-650.
- ❖ Zito K., Scheuss V., (2009) NMDA Receptor Function and Physiological Modulation. Elsevier. 1157-1164

