



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neuromodulación



“Efecto de la acetilcolina sobre la modulación de la corriente de NMDA por dapsona en ausencia de glicina en neuronas piramidales de la corteza motora primaria”

Tesis que para obtener el título de:

Licenciada en Biomedicina

Presenta

Ruíz González Eunice del Refugio

Director de tesis

DC. Jorge Luis Valente Flores Hernández

Co-directora

MC. Erika Lorena Arroyo Ríos

Puebla, Pue. Julio 2024

Índice

I.	Índice de figuras.	1
II.	Índice de tablas.....	3
III.	Índice de gráficas.....	4
IV.	Índice de ecuaciones.	5
V.	Abreviaturas.	6
1.	Resumen.	8
2.	Introducción.....	10
3.	Antecedentes.	11
3.1.	Antecedentes generales.	11
3.1.1.	Corteza motora.	11
3.1.1.1.	Capas celulares.....	12
3.1.1.2.	Columna cortical como unidad funcional.	13
3.1.1.3.	Células piramidales.....	13
3.1.2.	Receptor NMDA.	15
3.1.2.1.	Mecanismo de acción del NMDAR.....	18
3.1.3.	Dapsona.	19
3.1.3.1.	Estudios en humanos.	20
3.1.3.2.	Estudios en modelos animales.....	20
3.1.4.	Neuroprotección.	21
3.1.5.	Acetilcolina.	22
3.1.5.1.	Interacción Acetilcolina y el NMDAR.....	23
3.2.	Antecedentes específicos.....	23
3.2.1.	Excitotoxicidad por glutamato.....	23
3.2.2.	La excitotoxicidad vinculada al receptor NMDA.....	24
3.2.2.1.	Excitotoxicidad a través del NMDAR.....	24
3.2.2.2.	Efectos de la dapsona en la INMDA en presencia de glicina.	24
4.	Planteamiento del problema.	25
5.	Objetivos	28
5.1.	Objetivo general.	28
5.2.	Objetivo específico.....	28
6.	Material y métodos.	29
6.1.	Bioética.....	29

6.2.	Preparación.....	29
6.3.	Disociación.....	31
6.4.	Registro electrofisiológico.....	32
6.4.1.	Técnica de fijación de voltaje en célula completa (<i>Whole-cell</i>).....	32
6.4.2.	<i>Patch Clamp "Whole-cell"</i>	32
6.4.3.	Protocolos electrofisiológicos.....	33
6.4.3.1.	Rampa de voltaje.....	33
6.4.3.2.	Aplicación de dapsona en ausencia de glicina.....	34
6.4.3.3.	Aplicación de dapsona + ACh 10 nM.....	35
6.4.3.4.	Cálculo del porcentaje de cambio.....	36
6.5.	Análisis estadístico.....	36
6.5.1.	Diseño del estudio.....	36
6.5.2.	Diseño y tipos de muestreo.....	38
6.5.3.	Método de recolección de datos.....	38
7.	Resultados.....	39
7.1.	Micrografías.....	39
7.2.	Capacitancias.....	39
7.3.	Protocolo de rampa.....	40
7.4.	Aplicación de dapsona en ausencia de glicina.....	41
7.4.1.	Trazos representativos de las concentraciones de dapsona.....	41
7.4.1.1.	Dapsona 100 μ M.....	42
7.4.1.2.	Dapsona 30 μ M.....	42
7.4.1.3.	Dapsona 10 μ M.....	43
7.4.1.4.	Dapsona 3 μ M.....	44
7.4.1.5.	Dapsona 1 μ M.....	44
7.4.1.6.	Dapsona 300 nM.....	45
7.4.1.7.	Dapsona 100 nM.....	46
7.4.1.8.	Dapsona 30 nM.....	46
7.4.1.9.	Dapsona 10 nM.....	47
7.4.1.10.	Dapsona 1 nM.....	48
7.4.2.	Curva dosis-respuesta dapsona en ausencia de glicina.....	48
7.5.	Coaplicación de ACh 10 nM en dapsona 1, 100 nM y 1 μ M.....	50
7.5.1.	Trazos representativos de la ACh 10 nM.....	50

7.5.1.1.	Dapsona 1 μ M + ACh 10 nM.	50
7.5.1.2.	Dapsona 100 nM + ACh 10 nM.	51
7.5.1.3.	Dapsona 1 nM + ACh 10 nM.	52
7.5.2.	Curva dosis-respuesta ACh 10 nM.	52
8.	Discusión.	54
8.1.	Efecto de la dapsona en ausencia de glicina.....	54
8.1.1.	Modulador alostérico.....	54
8.1.2.	Coagonismo por glicina.	55
8.1.3.	Doble función del NMDAR.	56
8.1.4.	Arreglo de subunidades del NMDAR.....	57
8.1.5.	Distribución del NMDAR.....	58
8.2.	Efecto de la ACh 10 nM.....	58
9.	Conclusiones.....	61
10.	Bibliografía.....	62
11.	Anexos.	69
11.1.	Oficio de la aprobación del protocolo por el CICUAL.	69
11.2.	Tablas análisis estadísticos.....	70
11.2.1.	Aplicación de dapsona en ausencia de glicina.	70
11.2.2.	Aplicación de las concentraciones de dapsona con ACh 10 nM en ausencia de glicina.	70

I. Índice de figuras.

Figura 1. Representación de la corteza motora primaria en el cerebro humano. A) Vista lateral. B) Vista superior. C) Vista sagital.	111
Figura 2. Comparación de las capas celulares de la corteza cerebral.	13
Figura 3. Esquema de la morfología de las neuronas piramidales en las diferentes capas de la neocorteza.	14
Figura 4. Estructura cristalizada del NMDAR donde se observan los sitios de unión al ligando en las subunidades GluN1 y GluN2.	16
Figura 5. Posibles combinaciones en permutación de un NMDAR para la subunidad GluN2.	16
Figura 6. Perfil de desarrollo de la expresión de la subunidad GluN en el cerebro de ratón.	17
Figura 7. Representación tridimensional de la unión de glutamato a la subunidad GluN2A y glicina en GluN1.	18
Figura 8. Estructura tridimensional de la dapsona (4, 4'-diamino-difenil sulfona).	19
Figura 9. Estructura tridimensional de la ACh.	22
Figura 10. Mecanismos neuro y citoprotectores de la dapsona.	26
Figura 11. Representación de la corteza motora primaria en rata.	31
Figura 12. Representación del protocolo de rampa.	34
Figura 13. Micrografías de las neuronas piramidales de las capas V y VI de la corteza motora primaria.	39
Figura 14. Trazo representativo del protocolo de rampa de voltaje.	41
Figura 15. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 100 μ M.	42
Figura 16. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 30 μ M.	43
Figura 17. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 10 mM.	43
Figura 18. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 3 μ M.	44
Figura 19. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 1 μ M.	45
Figura 20. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 300 nM.	45
Figura 21. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 100 nM.	46
Figura 22. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 30 nM.	47

Figura 23. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 10 nM.	47
Figura 24. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 1 nM.....	48
Figura 25. Trazo representativo de la aplicación de ACh 10 nM en dapsona 1 μ M....	51
Figura 26. Trazo representativo de la aplicación de ACh 10 nM en dapsona 100 nM.	51
Figura 27. Trazo representativo de la aplicación de ACh 10 nM en dapsona 1 nM. ...	52

II. Índice de tablas.

Tabla 1. Comparación múltiple por pares de la post prueba de Dunn en las concentraciones de dapsona en ausencia de glicina.....	70
Tabla 2. Comparación múltiple por pares de la post prueba de Dunn de la ACh 10 nM con dapsona 1 μ M, 100 y 1 nM en ausencia de glicina.	70

III. Índice de gráficas.

Gráfica 1. Histograma de las capacitancias de las neuronas registradas.....	40
Gráfica 2. Curva dosis-respuesta de la dapsona en ausencia de glicina, dividida en potenciación e inhibición.....	49
Gráfica 3. Comparación del efecto de la dapsona en concentraciones 1 μ M, 100 y 1 nM en ausencia de glicina, respecto al de ACh 10 nM en las mismas concentraciones. de dapsona.	53

IV. Índice de ecuaciones.

Ecuación 1. Fórmula para analizar efecto en cada INMDA	36
Ecuación 2. Ecuación para la curva dosis respuesta	37

V. Abreviaturas.

nM= nanomolar.

μ M= micromolar.

μ m= micrómetro.

ACh= Acetilcolina.

BaCl₂ = Cloruro de bario.

Ca²⁺= Ion calcio.

CaCl₂= Cloruro de calcio.

CICUAL= Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio.

CsCl = Cloruro de cesio.

DMSO = Dimetilsulfóxido.

EBSS= Solución balanceada de Earl.

EC₅₀= Concentración efectiva 50.

EGTA= ácido etilenglicol-bis (β -aminoetil éter)- N, N, N', N'- tetraacético

E_{max}= Efecto máximo.

GluNR1= Subunidad 1 del receptor de NMDA.

GluN2A=Subunidad 2A del receptor a NMDA.

GluN2B=Subunidad 2B del receptor a NMDA.

GluN2C=Subunidad 2C del receptor a NMDA.

GluN2D=Subunidad 2D del receptor a NMDA.

GluN3= Subunidad 3 del receptor a NMDA.

GluN3B=Subunidad 3B del receptor a NMDA.

HBSS= Solución balanceada de Hanks.

H_2SO_4 = Ácido sulfúrico.

ICa^{2+} = Corriente de calcio.

iGluR= Receptores ionotrópicos de glutamato.

INa^+ = Corriente de sodio.

INMDA= Corriente de N-metil-D-aspartato.

KCl= Cloruro de potasio.

M1= Corteza motora primaria.

MgCl_2 = Cloruro de magnesio.

MgSO_4 = Sulfato de Magnesio.

Na^+ = ion sodio.

NaCl= Cloruro de sodio.

NAMs= Modulador alostérico negativo.

NaHCO_3 =Bicarbonato de sodio.

NaH_2PO_4 = Fosfato de Sodio Monobásico.

NMDG= N-Metil-D-Glutamina.

NMDAR= Receptor de N-Metil-D-aspartato.

PAMs= Modulador alostérico positivo.

1. Resumen.

La dapsona es un antibiótico patentado como un neuroprotector con propiedades antiinflamatorias, antiapoptóticas y antioxidantes, por lo que se ha considerado un fármaco potencial para el tratamiento de ciertas enfermedades (Diaz-Ruiz, y otros, 2022). Se ha investigado el efecto de la dapsona en la corriente de NMDA (INMDA) por su relación con la excitotoxicidad, donde se ha demostrado una disminución (Rios, y otros, 2003).

Tradicionalmente se ha propuesto que la INMDA requiere obligatoriamente la presencia de glicina como coactivador del canal (Johnson & Ascher, 1987). Por otro lado, un estudio muestra que tras la aplicación de 10 μ M de acetilcolina, la actividad del canal se potencia, revelando que la acetilcolina se une de forma similar al sitio de glicina en la subunidad GluN1 (Islas, y otros, 2022).

El proyecto experimental se realizó en apego a los lineamientos establecidos por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio con una revisión exhaustiva, quedando registrado con la clave 100317188-UALVIEP-24/2. Se registraron las capas V y VI de la corteza motora primaria de ratas macho Wistar prepúberes de 30 días. Todos los procesos experimentales se realizaron en ausencia de glicina, aplicando dapsona a concentraciones 1, 10, 30, 100, 300 nM, 1, 3, 10, 30, y 100 μ M para establecer si el efecto era dosis dependiente y posteriormente acetilcolina 10 nM (correspondiente a una concentración fisiológica) en las concentraciones 1 nM, 100 nM y 1 μ M de dapsona para comparar su efecto en la INMDA.

Se registraron un total de 72 neuronas piramidales mediante la técnica de *patch clamp* en la modalidad de *whole cell*, de las cuales 59 se emplearon para la curva dosis respuesta de la dapsona. Se obtuvo un mayor efecto de potenciación en 1 nM, con diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones 1 y 30 nM respecto a 1, 3 y 10 μ M. Para determinar el efecto que ejerce la acetilcolina 10 nM, se registraron un total de 13 células, coaplicando las concentraciones 1 μ M, 100 y 1 nM de dapsona. Los resultados muestran una diferencia con significancia estadística entre 100 nM

respecto a 1 nM y 1 μ M, así como una disminución de la potenciación a 1 nM y un aumento de la potenciación a 100 nM y 1 μ M respecto al efecto de la dapsona.

El NMDAR ha demostrado un efecto dual tras la aplicación de dapsona en ausencia de glicina, ya que se observaron potenciaciones e inhibiciones de la INMDA. Estos resultados pueden atribuirse a la ausencia del coagonista, al arreglo de subunidades y ubicación del receptor a nivel sináptico y extrasináptico, así como a un efecto de modulación alostérica por parte de la dapsona. Por otra parte, la acetilcolina podría estar ejerciendo su efecto como un plausible modulador alostérico.

2. Introducción.

Gómez-Gómez (2018) demostró que la dapsona en concentraciones 1, 3, 10, 100, 300 nM, 1, 3, 10, 30, 100 μ M disminuyen la corriente de NMDA (INMDA) en neuronas piramidales de la capa V y VI de la corteza motora primaria (M1), con un efecto máximo en 1 μ M, sin embargo, la metodología empleada para realizar dichos experimentos se contempló el uso del aminoácido glicina como el coagonista clásico del receptor NMDA (NMDAR). Por otra parte, se ha demostrado que los metabolitos de la dapsona sobre el NMDAR disminuyen la corriente sin que dicha modulación sea voltaje dependiente; además, se observó que el efecto de los derivados de la dapsona es reversible y sugirieron que dicha modulación es mediada por la subunidad GluN1 (García-Palafox, y otros. 2021).

Por otra parte, un estudio *in silico* reveló que la ACh podría estar ejerciendo su modulación mediante la interacción directa con el NMDAR, específicamente en el sitio de unión al coagonista en la subunidad GluN1 y observaron que la aplicación de acetilcolina a una concentración de 10 μ M aumenta la INMDA en ausencia del coagonista (Islas, y otros, 2022).

En vista de las anteriores investigaciones, el objetivo principal de este proyecto experimental fue determinar el efecto de la dapsona a diferentes concentraciones en las capas V y VI de la M1 de rata en ausencia de glicina, realizando una curva dosis respuesta para determinar si la reducción de la corriente ejercida por la dapsona y sus metabolitos es consistente cuando se estudia el efecto del NMDAR en ausencia del coagonista clásico. De este modo, dado que la acetilcolina ejerce un efecto modulador sobre el receptor estudiado, se evaluó el efecto de su coaplicación con la dapsona.

Para llevar a cabo esta investigación, se utilizaron ratas macho Wistar prepúberes de 30 días de edad con un peso aproximado de 100-120 g, de las que se utilizó la M1 para aplicar en las neuronas agudamente disociadas concentraciones 1, 10, 30, 100, 300 nM, 1, 3, 10, 30, y 100 μ M de dapsona, así como coaplicar una concentración 10 nM de Acetilcolina, ambas en ausencia de glicina para realizar una curva dosis respuesta y establecer el efecto de la acetilcolina en la INMDA, respectivamente.

3. Antecedentes.

3.1. Antecedentes generales.

3.1.1. Corteza motora.

La corteza motora ejerce control sobre los músculos axiales y apendiculares del cuerpo, se clasifica en la corteza premotora, la corteza motora primaria y el área motora suplementaria (Figura 1). La corteza motora primaria (M1) se localiza en el giro pre central y parte del lóbulo paracentral anterior, contiene células piramidales (Betz) e interneuronas; generalmente no controla músculos individuales directamente, sino que parece controlar los movimientos individuales o la secuencia de movimientos que requieren la actividad de múltiples grupos neuronales (Arslan & Orhan, 2016; Knierim, 2020).

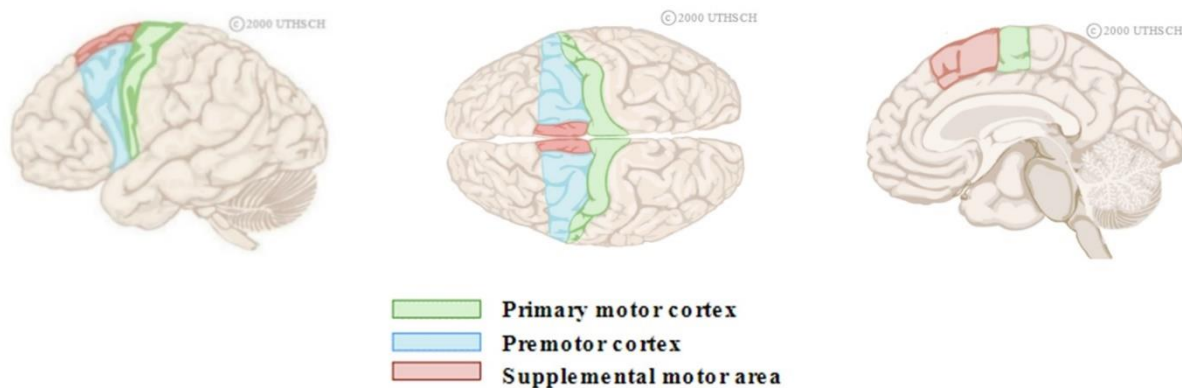


Figura 1. Representación de la corteza motora primaria en el cerebro humano. A) Vista lateral. B) Vista superior. C) Vista sagital. Se representa la corteza motora primaria, la corteza premotora y el área motora suplementaria, en la vista lateral, superior y sagital del cerebro humano para representar. (Tomada de Knierim, 2020)

La organización funcional de la M1 sugiere una característica especial para las columnas corticales representadas en esta zona que permite controlar en estos casos la acción de músculos particulares donde, además, tractos individuales o en conjunto integran movimientos más complejos (Purves, y otros, 2001).

La incertidumbre de la intrincada red de comunicación neuronal ha generado una investigación con la finalidad de identificar y catalogar diferentes tipos celulares y sus conexiones neuronales mediante un censo celular multimodal y un atlas de la corteza motora primaria de los mamíferos. Este estudio colectivo demostró que la estructura

se conserva en múltiples especies como el ratón, el mamífero tití y el humano, estableciendo un marco unificador y mecánico de la organización neuronal a este nivel de la corteza de múltiples capas (BRAIN Initiative Cell Census Network (BICCN), 2021).

3.1.1.1. Capas celulares.

La corteza motora primaria es agranular con neuronas motoras superiores que generan potenciales de acción hasta la médula espinal conectándose a la neurona motora inferior a través del glutamato; se divide en 6 capas diferenciadas por su citoarquitectura y función cortical, la capa I es molecular o plexiforme, la capa II granular externa, la capa III piramidal externa, la capa V granular interna y la capa VI fusiforme (Figura 2) (Yip & Lui, 2022; Jacobson y otros, 2014).

La capa V contiene neuronas piramidales de tamaño mediano y grande, con ápices dendríticos que se extienden hasta la superficie exterior del cerebro. En la corteza motora primaria se conocen como células piramidales de Betz por ser muy grandes; estas neuronas dan lugar a la mayor parte de los axones y fibras que se proyectan a regiones subcorticales. Por otro lado, la capa VI se compone por neuronas pequeñas que pueden ser estrelladas, piramidales o fusiformes que también dan lugar a fibras que terminan principalmente en el tálamo (Cechetto & Topolovec, 2002).

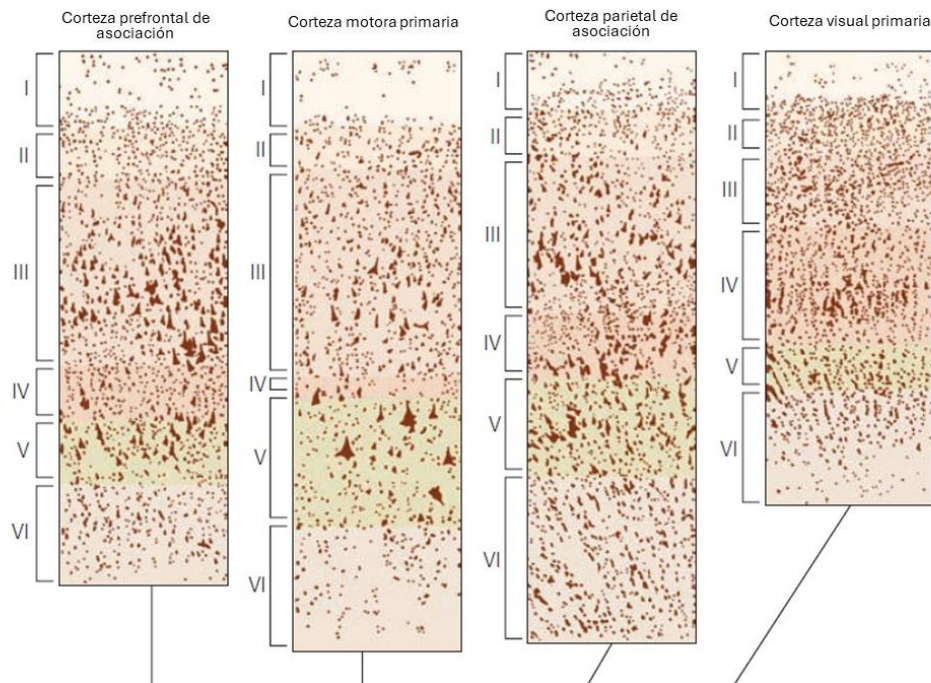


Figura 2. Comparación de las capas celulares de la corteza cerebral. Representación esquemática para diferenciar el tipo celular entre las capas I a la VI entre la corteza prefrontal de asociación la corteza motora primaria, la corteza parietal de asociación y la corteza visual primaria. (Modificada de Amaral & Strick, 2013)

3.1.1.2. Columna cortical como unidad funcional.

Las columnas corticales son un patrón de conectividad, donde las neuronas se distribuyen en un arreglo vertical y se dividen en diferentes capas ayudando a considerar que todas las neuronas dentro de la misma columna son una población única. Este arreglo columnar sugiere que las poblaciones localizadas de neuronas pueden agruparse, considerando cada una como un grupo homogéneo de neuronas con propiedades intrínsecas y campos receptivos similares (Gerstner, y otros, 2013; Molnár, 2013).

3.1.1.3. Células piramidales.

Las células piramidales predominan en la corteza motora, se caracterizan por una morfología piramidal o de lágrima con alrededor de 20-120 μm de diámetro, dendritas apicales y basales, así como un axón que proyecta a la corteza cerebral (Johnns, 2014). A pesar de que la mayor población celular está dada por las neuronas

piramidales, existen algunas variaciones morfológicas entre las diferentes capas de la columna cortical para la corteza motora, caracterizando la capa V con arborizaciones basales y apicales, a diferencia de la II, III y VI con ramificaciones más prominentes (Figura 3) (Feldmeyer, 2015; Bekkers, 2011).

La variación entre las dendritas basales y apicales para las neuronas piramidales de la capa V permite una mayor cantidad de proyecciones y patrones en el procesamiento de la información (Takata, y otros, 2021).

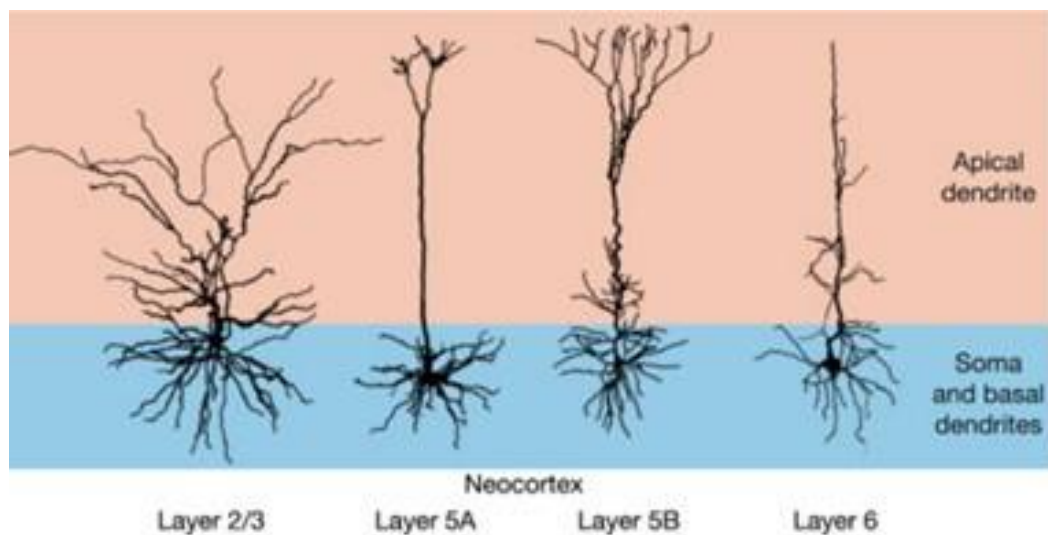


Figura 3. Esquema de la morfología de las neuronas piramidales en las diferentes capas de la neocorteza. Representación de la morfología neuronal piramidal en las capas 2/3, 5 y 6 de la neocorteza donde se observan las diferencias entre las dendritas basales y las apicales. En las capas 2/3 hay una mayor proyección de las dendritas a diferencia de las capas 5 y 6 que se caracterizan por mayor proyección a nivel del soma. (Tomada de Bekkers, 2011)

Las neuronas piramidales son el mayor tipo de población celular considerada excitatoria en la corteza de los mamíferos, recibe entradas tanto excitatorias (glutamatérgicas) como inhibitorias (GABAérgicas) y conforman dos tercios de las neuronas en la corteza cerebral de un mamífero (Fröhlich, 2016).

Al ser el tipo celular más abundante, se sugiere que son necesarias para procesar señales externas y el control motor, así bien son células variables a nivel estructural

incluyendo somato dendrítico, lo que les provee de diferentes patrones de conectividad y adaptación a tareas específicas de señalización (Feldmeyer, 2015).

Uno de los principales neurotransmisores involucrados en el control de la corteza motora es el glutamato, cuyo mecanismo de acción se ejerce a través de receptores dependientes de ligando y receptores metabotrópicos; la descripción estructural de los receptores ionotrópicos como el AMPA, NMDA y Kainato revela un conjunto complejo de múltiples dominios extracelulares unidos a un elemento formador de poros que en su activación permite la entrada de iones mono y bivalentes (Traynelis, y otros, 2010).

3.1.2. Receptor NMDA.

El receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDAR) es un canal ionotrópico cuyo ligando endógeno es el glutamato, caracterizado por mediar el paso de cationes como el Ca^{2+} , el Na^+ y el K^+ que llevan a la neurotransmisión excitatoria en el Sistema Nervioso Central; puede encontrarse en la neurona pre y post sináptica e intervenir en la plasticidad, el aprendizaje y la memoria, así como en procesos fisiopatológicos (Hansen, y otros, 2018).

Estructuralmente, el NMDAR dispone de un arreglo heterotetramérico de dímeros compuestos por las subunidades GluN1-GluN2 donde cada subunidad se conforma por cuatro dominios funcionales que le proporciona una variedad de propiedades. Dependiendo de la conformación estructural del NMDAR dadas por la combinación de las subunidades mencionadas, contribuyen a las características, cambios conformacionales y funciones; por otra parte, el receptor posee un sitio de magnesio, uno de unión al glutamato, uno de reconocimiento al coagonista y uno de poliamidas () (Paoletti, y otros, 2013; Flores-Soto, y otros, 2012).

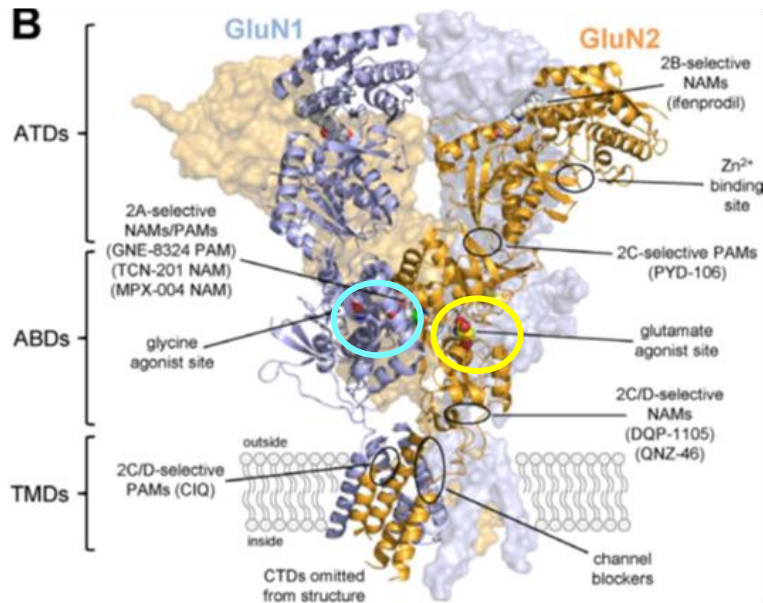


Figura 4. Estructura cristalizada del NMDAR donde se observan los sitios de unión al ligando en las subunidades GluN1 y GluN2. Representación estructural del NMDAR resaltando en un círculo azul el sitio de unión a glicina en la subunidad GluN1 y resaltando en un círculo amarillo el sitio de unión al glutamato en GluN2. (Modificada de Hansen, y otros, 2018)

Las diferentes subunidades del NMDAR son codifican por genes, para NR1 hay al menos ocho isoformas variantes y cuatro genes que codifican para las subunidades GluN2A, GluN2B, GluN2D (Llansola, y otros, 2005). Esta diversidad genética permite una variación en el arreglo del receptor, que al realizar diferentes permutaciones con la subunidad (Figura 5), obtenemos distintos conjuntos que podrían tener diferentes efectos o expresarse en ciertas áreas.

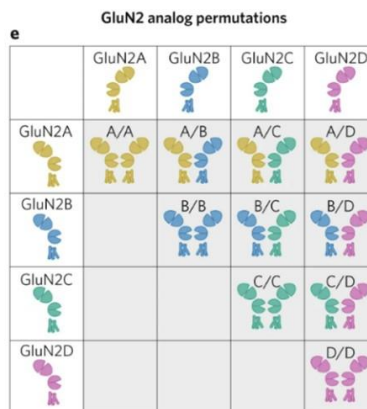


Figura 5. Posibles combinaciones en permutación de un NMDAR para la subunidad GluN2. Representación de las posibles permutaciones para la subunidad GluN2 (A, B, C, y D) para la formación del homodímero o heterodímero. (Tomada de Hanson, y otros, 2024)

La expresión de la subunidad GluN2 y GluN3 en el cerebro de ratón depende de su etapa de desarrollo, en el nacimiento a nivel de la M1 hay arreglos de subunidades GluN3B y GluN2B a diferencia de la etapa adulta con una mayor expresión de subunidades GluN2A y GluN2B con GluN1 (Figura 6); por otro lado, la expresión de GluN3B aumenta lentamente a través del desarrollo y en la etapa adulta se expresa en altos niveles en las neuronas motoras (Paoletti, y otros, 2013).

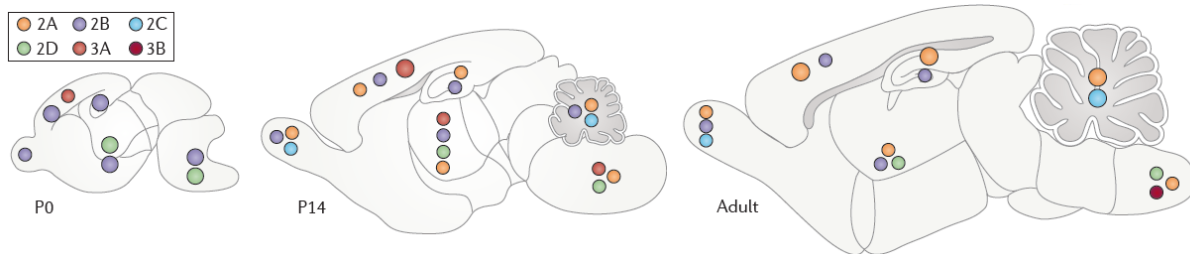


Figura 6. Perfil de desarrollo de la expresión de la subunidad GluN2 y GluN3 en el cerebro de ratón. Perfil de desarrollo de la expresión de la subunidad GluN en el cerebro de ratón desglosando el día de nacimiento el día postnatal (P0), 2 semanas después del nacimiento (P14) y la etapa adulta. (Tomada de Paoletti, y otros, 2013)

El arreglo estequiométrico del NMDAR le otorga una diferente permeabilidad al Ca^{2+} , una sensibilidad al Mg^{2+} extracelular que actúa como un antagonista y una variedad de sitios de unión para ligandos endógenos o agentes farmacológicos que pueden actuar en el receptor. Estos son sitios potenciales para posibles moduladores extracelulares que se han unido a las subunidades GluN2A y GluN2B con una alta afinidad; de este modo, el receptor presenta diferentes propiedades biofísicas y farmacológicas que le confieren características fundamentales para su función (Paoletti & Neyton, 2007).

Así como el NMDAR es un canal permeable a Ca^{2+} gracias a la función del glutamato como agonista, puesto que el NMDAR es un canal permeable a Ca^{2+} dependiente del glutamato para su activación, un exceso de este neurotransmisor se ve implicado en la fisiopatología al aumentar el influjo del catión que bajo diversos mecanismos llevan a la excitotoxicidad y posterior efecto patológico como la isquemia, enfermedades neurodegenerativas, por mencionar algunas (Chaffey & Chazot, 2008).

Se ha buscado modular el NMDAR como diana terapéutica para el tratamiento de problemas donde interviene el receptor ya que son pocos los que se han aprobado clínicamente, es por lo anterior que ha incrementado el interés en la investigación farmacológica de los sitios de unión en las subunidades, la fisiología y estructura del receptor para su modulación, donde las sustancias potenciales serían tratamientos prometedores y específicos para ciertas enfermedades (Strong, y otros, 2014; Ahmed, y otros, 2020).

3.1.2.1. Mecanismo de acción del NMDAR.

La asociación de ciertos ligandos a los sitios de unión en canales ionotrópicos genera una activación de estos, que se transfiere como una señal entre neuronas; la unión del agonista glutamato a la subunidad GluN2A y el coagonista a la subunidad GluN1 generan un cambio conformacional en el NMDAR (Figura 7). En el estudio del NMDAR, se ha encontrado que tienen mecanismos de acción distintos, probablemente por sus diferentes funciones fisiológicas donde se ha correlacionado al glutamato como un neurotransmisor y a la glicina como un modulador (Yu & Lau, 2018).

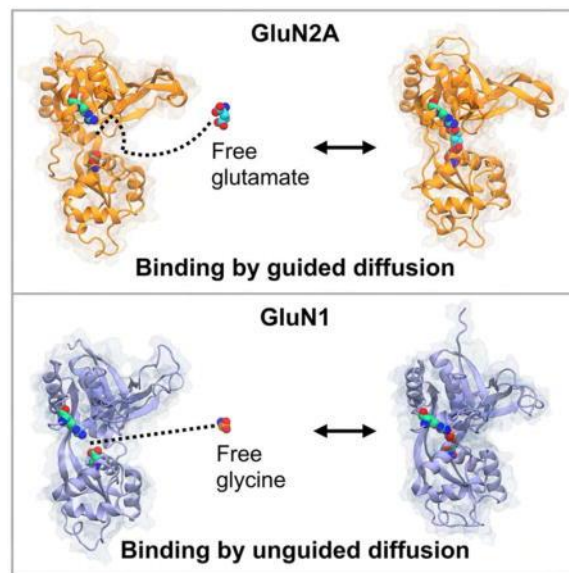


Figura 7. Representación tridimensional de la unión de glutamato a la subunidad GluN2A y glicina en GluN1. Representación de la interacción del glutamato a la subunidad GluN2A y el coagonista en GluN1, resaltando el sitio de unión al ligando en la subunidad. (Tomada de Yu & Lauc, 2018)

Inicialmente, el poro del NMDAR se encuentra bloqueado por Mg^{2+} del líquido extracelular, que perderá su afinidad conforme inicia la despolarización, sin embargo, clásicamente se ha propuesto que el NMDAR también requiere de la unión del glutamato y coagonistas como los aminoácidos glicina y serina para activarse y permitir el flujo catiónico; cabe destacar que la función fisiológica del sitio del coagonista no se ha esclarecido, pero, es asociada como diana farmacológica (Nestler, y otros, 2017).

3.1.3. Dapsona.

La dapsona (4, 4'-diamino-difenil sulfona) (Figura 8) es un compuesto derivado de las sulfonas usualmente descrito por su actividad antimicrobiana, sin embargo, diversos estudios han demostrado que la dapsona regula o disminuye los principales mecanismos de daño, así como los involucrados en la muerte celular, concluyendo en sus efectos neuro y citoprotectores (Diaz-Ruiz, y otros, 2022).

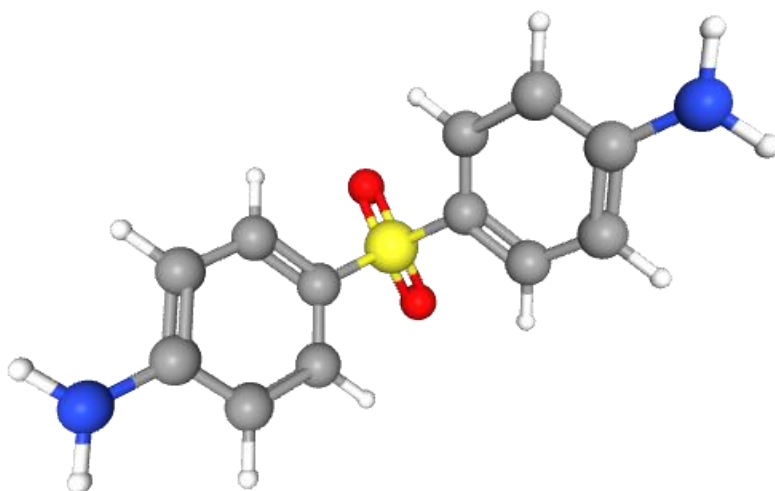


Figura 8. Estructura tridimensional de la dapsona (4, 4'-diamino-difenil sulfona). Representación de la estructura tridimensional de la dapsona, representando el azufre (amarillo), el oxígeno (rojo), el grupo amino (azul), los carbonos (gris) y los hidrógenos (blanco). (Tomada de PubChem)

Esta sulfona es considerada como un agente terapéutico multifuncional que inició con efectos a nivel dermatológico gracias a los cuales se comercializó. Con el transcurso del tiempo, se han demostrado sus propiedades antiinflamatorias, neuroprotectoras, antiapoptóticas y antioxidantes al inhibir la producción de especies reactivas de oxígeno y disminuir el daño mitocondrial, por lo que se considera un fármaco potencial para promover la salud (Ghaoui, y otros, 2020; Khalilzadeh, y otros, 2022).

En 2003 la dapsona fue patentada en México como un agente neuroprotector, después de haber sido evaluada en un modelo de infarto cerebral y demostrar su capacidad para disminuir del 70 a 90% las consecuencias adversas tras el infarto (Rios, y otros, 2003).

3.1.3.1. Estudios en humanos.

En un estudio clínico de pacientes con accidente cerebrovascular isquémico agudo se reporta una recuperación funcional más rápida de quienes se les administró dapsona dentro de las primeras 8 a 10 horas después del derrame, por lo tanto, el tratamiento con este fármaco es asociado con efectos neuroprotectores que requieren de mayor investigación (Nader-Kawachi, y otros, 2007).

De esta manera, se ha buscado definir la incidencia de la isquemia cerebral tardía en pacientes después de la administración de dapsona y un tratamiento placebo, donde un estudio ha determinado que la dapsona puede funcionar como un agente profiláctico en pacientes en riesgo de sufrir una isquemia cerebral tardía tras una hemorragia subaracnoidea por aneurisma, donde es relevante profundizar en la investigación (García-Pastor, y otros, 2022).

3.1.3.2. Estudios en modelos animales.

Se ha evaluado el efecto de la dapsona en la alodinia táctil e hiperalgesia mecánica, así como determinado los efectos antioxidantes en el daño a nivel de la médula espinal en un modelo de rata, donde se sugiere que el efecto antinociceptivo de la dapsona es regulado a través de la disminución de estrés oxidativo y excitotoxicidad que se asocia con la activación de NMDAR (Mata-Bermudez, y otros, 2021).

Existen estudios que han profundizado en el mecanismo de acción de la dapsona en ratas macho Wistar en edad adulta a través de inhibir las proteínas pro apoptóticas y su efecto, demostrando que después del tratamiento logra prevenir la lesión isquémica, mejorar las funciones neuroconductuales y la viabilidad celular; sugiriendo así el potencial de la dapsona para limitar el daño después de la salida de glutamato en horas tardías a través de la represión de proteínas pro apoptóticas de la isquemia cerebral en conjunto a la activación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Mahale, y otros, 2020).

Por otro lado, se ha demostrado que la dapsona previene de manera significativa la mortalidad con efectos antiapoptóticos e inhibitorios de la mieloperoxidasa que protegen la medula espinal del daño tisular y mejoran la recuperación motora después de una lesión en un modelo de rata (Ríos, y otros, 2015; Díaz-Ruíz, y otros, 2011).

El efecto neuroprotector de la dapsona se ha evaluado con técnicas de imagen como la imagen de resonancia magnética (IMR) y correlacionado con la función motora y el estrés oxidativo después de una reperfusión isquémica (I/R), obteniendo como resultado que los animales administrados con dapsona presentaron una mayor recuperación funcional y menor tejido dañado que los del grupo control (Díaz-Ruiz, y otros, 2016).

En vista de los efectos neuroprotectores demostrados por la dapsona para diferentes enfermedades, un estudio decidió evaluar el efecto de la misma en el tratamiento de la neuropatía periférica inducida por vincristina durante las quimioterapias del cáncer en ratas macho Wistar, donde se demostró que la dapsona puede ser utilizada como un tratamiento protector al lograr mejorar las sensaciones térmicas y mecánicas al reducir los factores de inflamación, oxidación y apoptosis (Shayesteh, y otros, 2022).

3.1.4. Neuroprotección.

Se ha definido la neuroprotección como el conjunto de procesos utilizadas por el organismo que buscan prevenir la lesión neuronal y la degeneración en el sistema nervioso central, que son resultado de trastornos agudas o enfermedades crónico-degenerativas (MeSH, 2016).

La neuroprotección desde la actividad física implica la estimulación de factores de crecimiento neuronal, promueve la supervivencia neuronal y la neuroplasticidad, así como la mejora en la memoria y el aprendizaje (Mahalakshmi, Maurya, Lee, & Kumar, 2020).

La investigación de los fármacos que aparentemente actúan como neuroprotectores solo han llegado a etapas preclínicas para su uso en derrames cerebrales; sin embargo, actualmente los estudios se enfocan en toda la unidad vascular, ayudando a delimitar su mecanismo de acción y seleccionar aquellos más prometedores,

permitiendo así encontrar un agente neuroprotector de mayor efectividad (Chamorro, y otros, 2021; Haupt, y otros, 2023).

3.1.5. Acetilcolina.

La Acetilcolina (ACh) es un mensajero químico característico por ser un mediador excitatorio. Su estructura química está conformada por un grupo éster de ácido acético en conjunto con la colina a través de un enlace carbono-oxígeno (Figura 9). Sus receptores se dividen en nicotínicos y muscarínicos, que son canales iónicos para Na^+ y Ca^{2+} o acoplados a proteínas G, respectivamente. Los receptores nicotínicos se subdividen en tipo muscular (N1) que se encuentran en la superficie de las células musculares y el neuronal (N2) en el sistema nervioso central y periférico; los receptores muscarínicos van del M1 al M5 y se encuentran en el sistema nervioso central, pero, del M1-M4 pueden encontrarse en otros sistemas de órganos (Sam & Bordoni, 2023).

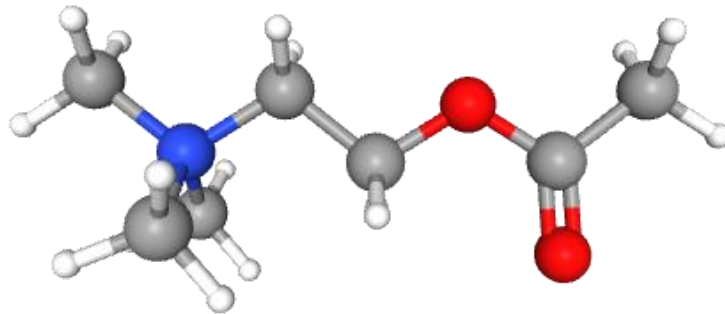


Figura 9. Estructura tridimensional de la ACh. Representación de la estructura tridimensional de la acetilcolina con el grupo amino (azul), el oxígeno (rojo), los carbonos (gris) y los hidrógenos (blanco). (Tomada de Pubchem)

La ACh es un neurotransmisor y neuromodulador con diversos efectos en el sistema nervioso y muscular dependiendo del subtipo de receptores, el sitio de liberación y la población neuronal a la que se dirija; es capaz de potenciar comportamientos adaptativos a los estímulos ambientales, coordinar la respuesta de las redes neuronales dependiendo del área, de disminuir la reacción a los estímulos que no requieren una respuesta inmediata, entre otras funciones (Piccioto, y otros, 2012).

La ACh se origina principalmente del prosencéfalo basal y el área tegmental mesopontina (núcleos de Meynert y el núcleo septal medio) y actúa a nivel de las

uniones neuromusculares, liberándose a través de las motoneuronas y afectando los movimientos voluntarios (Sam & Bordoni, 2023).

La colina se encuentra en el plasma a concentraciones de 10 mM y es transportado al citosol celular de neuronas colinérgicas a través de la proteína simporte de Na⁺/ colina; cerca de 10,000 moléculas de ACh son empaquetadas en cada vesícula por su respectivo transportador (Purves, y otros, 2001).

3.1.5.1. Interacción Acetilcolina y el NMDAR.

Resultados experimentales y computacionales sugieren que la ACh actúa como un competidor en el sitio de la glicina, como un agente potenciador submáximo del NMDAR, constituyendo una posible molécula base para desarrollar fármacos encaminados a ser multiblanco como para el tratamiento del Alzheimer, así como podría ayudar a un mejor entendimiento de la neurotransmisión glutamatérgica (Islas, y otros, 2022).

3.2. Antecedentes específicos.

3.2.1. Excitotoxicidad por glutamato.

La excitotoxicidad se ha definido como el daño y posterior muerte neuronal causada por una exposición prolongada a aminoácidos excitatorios. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central relacionado con la excitotoxicidad al producir disfunción y degeneración neuronal ocasionado por un desbalance en la homeostasis del Ca²⁺ que produce la disfunción mitocondrial, la activación de la vía de las caspasas, la neuroinflamación y el estrés oxidativo, por mencionar algunos (Binvignat & Olloquequi, 2020; Lau & Tymianski, 2010).

En la isquemia cerebral se presentan mecanismos de muerte neuronal que implican un aumento en la exocitosis del glutamato e inhibición de su recaptura, resultando en un metabolismo anormal del neurotransmisor que promueve una sobreexcitación del NMDAR y el consecuente aumento intracelular del Ca²⁺ (Shen, y otros, 2022).

En vista de la capacidad del glutamato para generar un daño a nivel fisiológico por sus cascadas de señalización, se ha enfatizado en la búsqueda farmacológica en los sitios de unión del NMDAR donde es necesario considerar la diferencia entre un equilibrio a

nivel fisiológico entre la activación y sobre estimulación del receptor para evitar el potencial excitatorio. Lo anterior ha sido investigado en la modulación alostérica negativa que permite disminuir el exceso de activación del NMDAR y la entrada iónica (Wyllie & Bowie, 2022).

3.2.2. La excitotoxicidad vinculada al receptor NMDA.

3.2.2.1. Excitotoxicidad a través del NMDAR.

Un estudio realizado en cultivos neuronales ha demostrado la función sináptica y extra sináptica de las subunidades GluN2B y GluN2A del NMDAR, así como el impacto que tienen al mediar la señalización intracelular del receptor y su excitotoxicidad; por otro lado, en neuronas con sobreexpresión de GluN2A y GluN2B observaron una elevada excitotoxicidad (Zhou, y otros, 2013).

3.2.2.2. Efectos de la dapsona en la INMDA en presencia de glicina.

A nivel cinético del NMDAR, se ha demostrado que la administración de dapsona disminuye la corriente de NMDA en forma dosis dependiente. Este efecto modulador se relaciona con una posible interacción de la dapsona a el sitio de unión del coagonista en la subunidad GluN1 en concentración 1 μ M sin una diferencia estadísticamente significativa respecto a concentraciones μ M de 100, 10, 3 y nM de 300 (Gómez-Gómez, 2018).

Además de los estudios mencionados, al estudiar el efecto de los metabolitos de la dapsona sobre el NMDAR se ha demostrado que disminuye la corriente activada por NMDA, que no es un efecto voltaje-dependiente. Se ha demostrado que existe una recuperación de la corriente tras la aplicación del fármaco que es mediado por la subunidad GluN1 (García-Palafox, y otros, 2021).

4. Planteamiento del problema.

La dapsona se ha indicado como un tratamiento para condiciones dermatológicas y no dermatológicas, si bien el mecanismo de acción para afecciones dermatológicas no ha sido esclarecido, este fármaco es capaz de inhibir el sistema citotóxico mediado por haluro de peróxido de mieloperoxidasa o la vía del ácido fólico, afectando incluso las funciones de los neutrófilos. Por otra parte, ha demostrado efectos adversos en la administración oral como por ejemplo afectaciones en el sistema nervioso a nivel motor, cardíaco, renal, hematológico y generar reacciones de hipersensibilidad si la administración (Kurien, y otros, 2023).

Un ensayo clínico ha investigado el efecto neuroprotector de la dapsona con un estudio aleatorio, doble ciego controlado con placebo en pacientes con hemorragia subaracnoidea aneurismática donde el fármaco tiene un rol como agente profiláctico en pacientes con alto riesgo de desarrollar isquemia cerebral retardada, no obstante, se necesitan más investigaciones para confirmar el efecto observado (García-Pastor, y otros, 2022).

Por otro lado, el mecanismo de acción neuro y citoprotector de la sulfona involucra regular la liberación de glutamato, previniendo la activación de receptores para controlar el influjo iónico y regular la cascada de señalización; así bien disminuye la formación del radical superóxido y peróxido de hidrógeno producidos en la mitocondria para evitar la muerte celular y disminuir la producción de óxido nítrico. Se ha reportado que la dapsona regula la formación de inflamomas, el metabolismo del ácido araquidónico y, las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis mediada por la activación de las caspasas con el fin de atenuar la liberación de interleucinas proinflamatorias y reducir la formación de quimioatrayentes como las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Figura 10) (Díaz-Ruiz, y otros, 2022).

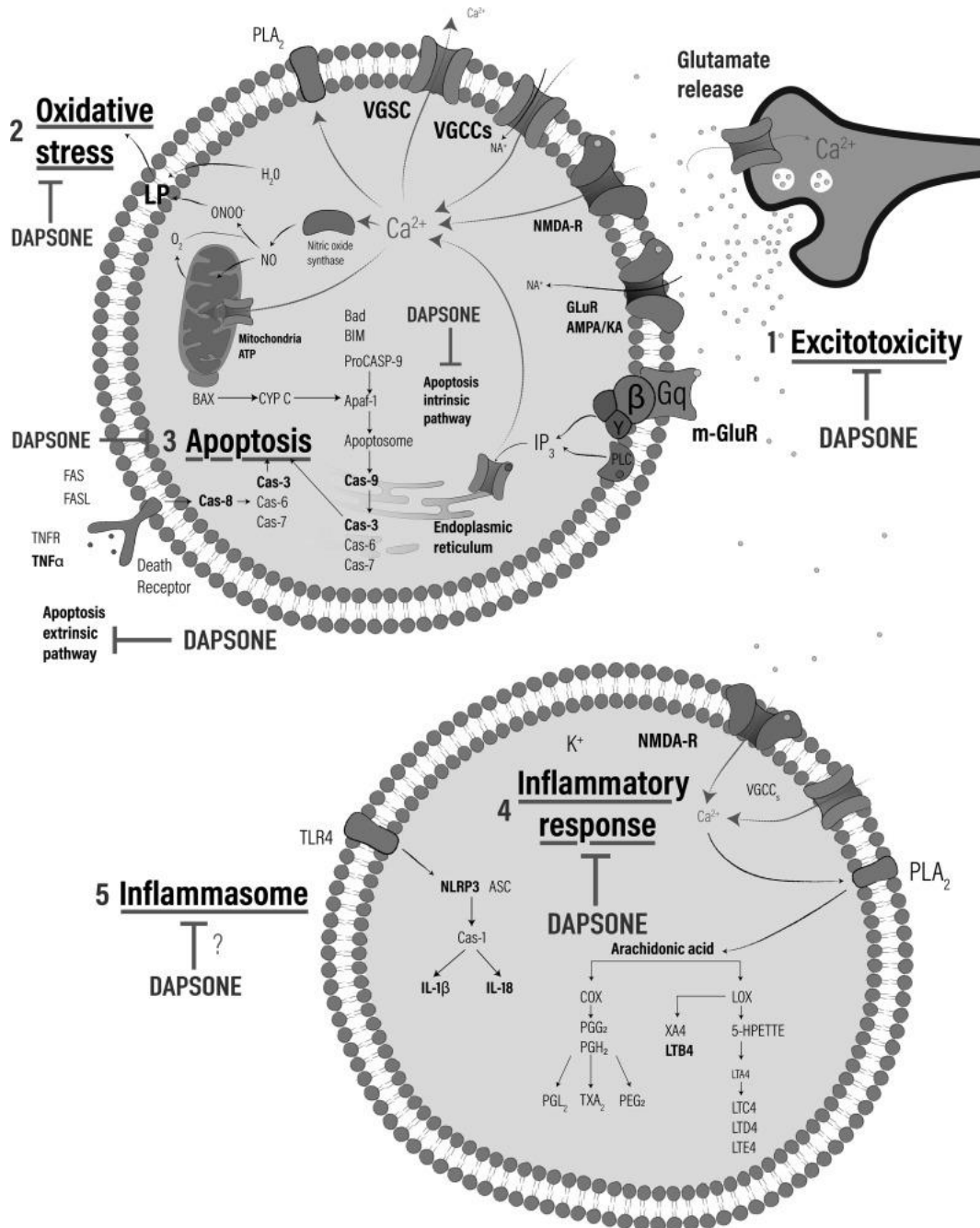


Figura 7. Mecanismos neuro y citoprotectores de la dapsona. Representación de los mecanismos neuro y citoprotectores de la dapsona, desglosando su efecto antiexcitotóxico al regular la liberación del glutamato para prevenir la activación de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos del mismo, el efecto antioxidante al disminuir la formación del radical superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el efecto antiinflamatorio al regular el metabolismo del ácido araquidónico y el efecto antiapoptótico al regular la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis mediada por la activación de diversas caspasas. (Tomada de Diaz-Ruiz, y otros, 2022)

De esta manera, el efecto dual del NMDAR implica un desafío en la búsqueda de moléculas con capacidad neuroprotectora que permitan reducir una excesiva

liberación de glutamato extracelular que conlleva a la muerte celular, sin alterar la transmisión sináptica deseable que desemboca en la plasticidad (Vyklícky, y otros, 2014).

Numerosos receptores se caracterizan por su modulación a través de ligandos, así como su múltiple funcionalidad, por lo que las implicaciones del NMDAR en la plasticidad, el potencial a largo plazo y la excitotoxicidad lo han convertido en un blanco de estudio (Tovar & Westbrook, 2017).

De esta manera, se resalta la importancia de investigar el efecto de la dapsona en la INMDA como un modulador, al comprender el mecanismo de acción en el receptor, lo que podría potenciar su uso como tratamiento.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar a qué concentración la dapsona tendrá un efecto sobre la INMDA en dos casos: en ausencia de glicina y en presencia de ACh, para demostrar que la glicina no es un ligando obligatorio para el NMDAR y que la ACh puede actuar como un posible coagonista del receptor, así como, observar una posible participación de la subunidad GluN1 en la aplicación de dapsona en el NMDAR como lo propuso Gómez y Gómez en el 2018.

Por lo anterior, para la realización de este proyecto se analizó el efecto de diferentes concentraciones de dapsona sobre la INMDA en ausencia de glicina, y compararlo con el efecto de ACh como coagonista.

5. Objetivos

5.1. *Objetivo general.*

Caracterizar el efecto de la dapsona sobre la corriente de NMDA en ausencia de glicina y en presencia de ACh en neuronas piramidales de la corteza motora primaria de rata.

5.2. *Objetivo específico.*

Los siguientes objetivos particulares se llevarán a cabo en neuronas piramidales de la corteza motora primaria de rata agudamente disociadas, bajo las condiciones a) ausencia de glicina y b) presencia de ACh 10 nM.

- Caracterizar la cinética de la corriente de NMDA.
- Evaluar el efecto dosis-respuesta de la dapsona en concentraciones 1, 10, 30, 100, 300 nM, 1, 3, 10, 30, y 100 μ M sobre la corriente de NMDA.
- Determinar la participación de la subunidad GluN1 sobre la neuromodulación de la dapsona en la corriente de NMDA.
- Comparar las curvas dosis efecto de la dapsona sobre la corriente de NMDA.

6. Material y métodos.

6.1. Bioética.

El protocolo se sometió a evaluación por parte del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y fue aprobado con clave de protocolo 100317188-UALVIEP-24/2 y oficio VIEP/DGI/1361/2024. (Anexo 11.1.)

El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) utilizando ratas macho de la cepa Wistar prepúberes de 30 días de edad con un peso aproximado de 100-120g procedentes del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

La técnica descrita a continuación fue retomada y modificada de Flores-Hernández y colaboradores (2009).

6.2. Preparación.

La metodología inició días previos con la preparación de la solución e isetionato bajo en calcio, solución salina balanceada de Earl (EBSS), la solución salina balanceada de Hanks (HBSS), la solución de *TEA-Free*, la solución de *Background* y la solución interna, enlistadas a continuación para desglosar su composición:

- **Solución de isetionato bajo en calcio (en mM):**

140 isetionato de sodio, 23 glucosa, 15 HEPES, 2 KCl, 2 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, y rojo fenol 1 %, pH=7.4, 300-305 mOsm/L. Suplementada con: 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NG-nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico, burbujeada con O₂.

- **Solución salina balanceada de Earl (EBSS) (en mM):**

5.366 KCl, 116.359 NaCl, 1.015 fosfato de sodio monobásico, 1.622 MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 5.549 glucosa, y rojo fenol 1 %, pH=7.4, 300-305 mOsm/L. Suplementada con 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NG-nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico, burbujeada con CO₂/O₂.

- **Solución salina balanceada de Hanks (HBSS, SIGMA) (en mM):**

5.4 stock, amortiguada con 0.3 HEPES pH=7.4, 300-305 mOsm/L. Suplementada con 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NG-nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico, burbujeada con O₂.

- **Solución de *TEA-free* (en mM):**

127 NaCl, 12 glucosa, 10 HEPES, 2 CaCl₂, 20 CsCl, 5 BaCl₂ y rojo fenol 1 %, pH=7.4, 300-305 mOsm/L.

- **Solución de *Background* (en mM):**

140 NaCl, 23 glucosa, 15 HEPES, 2 KCl, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, y rojo fenol 1 %, pH=7.4, 300-305 mOsm/L, burbujeada con O₂.

- **Solución interna (en mM):**

175 N-metil-D-glucamina, 40 HEPES, 2 MgCl₂, 10 ácido etilenglicol-bis (β-aminoetil éter)- N, N, N', N'- tetraacético (EGTA), 12 fosfocreatina, 3 Na₂ATP, 0.35 Na₃GTP y 0.1 leupeptina con un pH= 7.25 ajustado con H₂SO₄, 265-270 mOsm/L.

El día del experimento se suplementaron 100 ml de isetionato bajo en calcio, 50 ml de EBSS y 20 ml de HBSS; como primer paso previo a la obtención del tejido nervioso, se procedió a enfriar la solución de isetionato durante 1 hora.

Después del tiempo de espera, se anestesió a la rata utilizando halotano, se revisaron sus reflejos y se procedió a diseccionar el cráneo. El cerebro se disecó y colocó en la solución fría de isetionato con bajo calcio durante 1 minuto.

Posteriormente se sacó el cerebro para obtener rebanadas coronales de 350 μM con ayuda de un vibratomo (Campden), se disecó la M1 utilizando como referencia anatómica los bulbos olfatorios y el fórceps menor del cuerpo calloso, distinguido por la forma de gota invertida en la parte central de cada hemisferio hasta a observar el claustró lateral al cuerpo calloso (Figura 11).

Se delimitó la M1 con ayuda de un microscopio estereoscópico y agujas de insulina de acuerdo con el "The Rat Brain in stereotaxic coordinates", dividiéndola en aproximadamente 6-8 secciones por rebanada (Paxinos & Watson, 2018). Los

segmentos obtenidos de la M1 se colocaron en la solución de EBSS compuesta y se mantuvieron burbujeando con carbógeno durante todo el experimento.

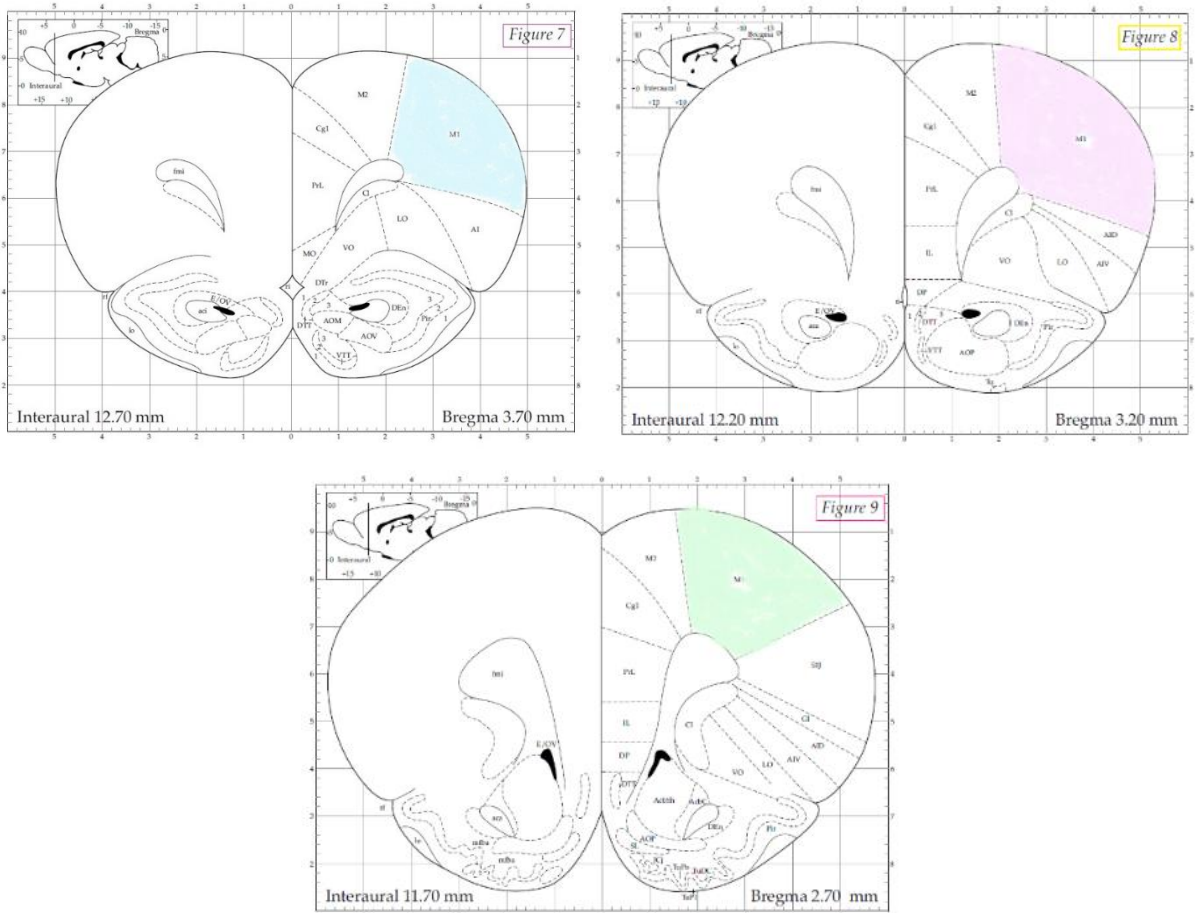


Figura 11. Representación de la corteza motora primaria en rata. Representación esquemática de la M1 resaltada en azul, rosa y verde para ubicar áreas de referencia y delimitar la M1. (Tomada de Paxinos & Watson, 2018)

Después de al menos 1 hora en el EBSS, se colocó una sección de M1 para su tratamiento enzimático, el cual se realizó en el HBSS conteniendo 0.75 mg/ml de papaína (Calbiochem) a $33 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 minutos para posteriormente lavar la enzima 3 veces con solución de isetionato para detener la digestión enzimática.

6.3. Disociación.

La solución de isetionato que contenía la sección de M1 se colocó en un tubo Eppendorf para disociar mecánicamente con pipetas *Pasteur* de distintos calibres pulidas al fuego hasta lograr una mezcla homogénea.

6.4. Registro electrofisiológico.

6.4.1. Técnica de fijación de voltaje en célula completa (*Whole-cell*).

Se ubicó la base de una caja Petri Corning de poliestireno (35mm x 10mm) en la platina del microscopio y se agregó la solución homogénea del área previamente disociada, esperando de 5 a 7 minutos para que las células se asentaran.

Transcurrido el tiempo requerido, se activó el lavado con la solución de *Background*. para su posterior registro por medio de la técnica de fijación de voltaje en célula completa, con una frecuencia de gota por cada 3-5 segundos, y se colocó el electrodo de referencia, así como la succión.

Se utilizó un amplificador para la fijación de voltaje "Voltaje clamp" Multiclamp 700A (Molecular Devices, SunnyVale, CA, USA) y un digitalizador Digidata 1320A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) controlados por el programa pClamp version 9 (Molecular Devices, Sunnyvale tipo AMD, Phenom, de 2.2 GHz, con 3.37GB de memoria RAM y Sistema operativo Windows XP SP3).

En el protocolo de generación de corriente de NMDA se mantuvo un potencial de membrana de -80 mV con una duración de 15 s por trazo y una aplicación de NMDA para generar la corriente durante 3 s después del pulso de prueba de -10 mV.

6.4.2. Patch Clamp "*Whole-cell*".

Al encontrar una neurona piramidal con dendritas apicales visibles, se obtuvo un capilar de registro con el puller (MODEL P-47, SUTTER INSTRUMENT CO.) al que se le agregó solución interna.

Se colocó el capilar de registro en el electrodo, el cual es operado por el micromanipulador y se procedió a verificar que la resistencia de baño estuviera en un rango de 4-7 M Ω . Se comenzó a bajar hasta que la punta tocara ligeramente la membrana celular y se generó un sello entre la punta del capilar de registro y la membrana neuronal al succionar ligeramente, se aplicó un potencial de membrana a -80mV.

Se esperó el momento en que el sello llegara a 1 G Ω y se procedió a romper la membrana generando el “*Whole-cell*” al succionar ligeramente para generar una resistencia axial $\leq 25\text{M}\Omega$.

6.4.3. Protocolos electrofisiológicos.

6.4.3.1. Rampa de voltaje.

Se generó una rampa de voltaje de -100mV a +40mV durante 100 ms para verificar el estado neuronal observando la corriente de Na⁺ y Ca²⁺ dependientes de voltaje (Figura 12) con el objetivo de evaluar la viabilidad de la membrana y observar la respuesta neuronal de acuerdo con su repertorio de canales voltaje-dependientes. Se descartaron aquellas células que no respondieron al cambio de voltaje, indicando que la neurona no se encontraba en condiciones de registro.

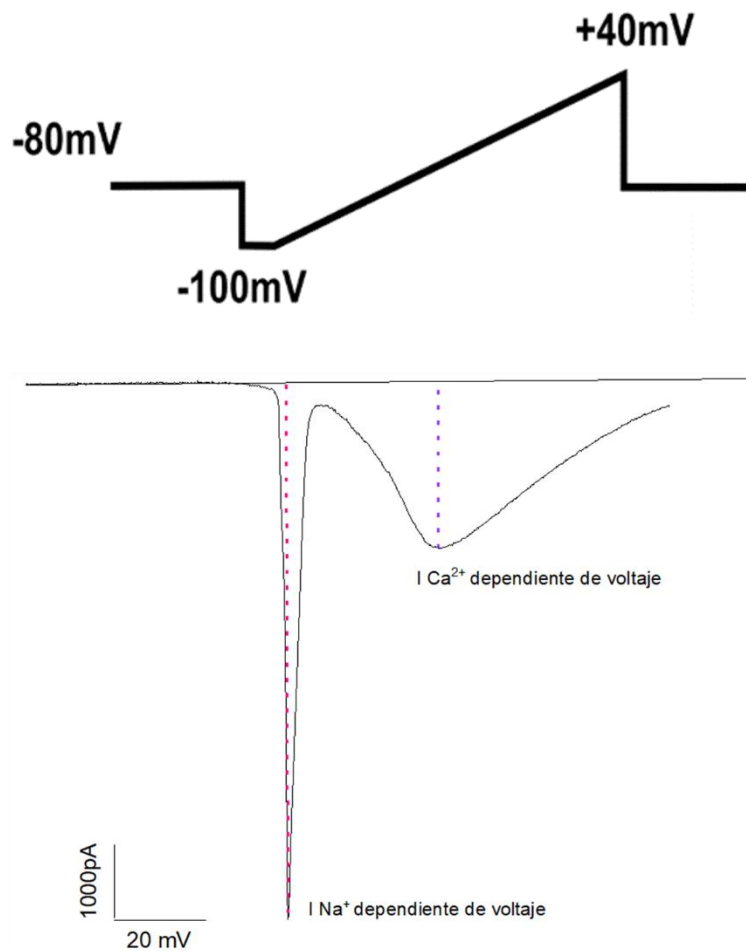


Figura 12. Representación del protocolo de rampa. Representación del protocolo rampa de voltaje donde hay cambios súbitos de voltaje de -80 a -100 y +40 mV para determinar la viabilidad neuronal, observando la I_{Na^+} (línea punteada roja) y $I_{Ca^{2+}}$ (línea punteada morada) gracias a sus respectivos canales dependientes de voltaje.

6.4.3.2. Aplicación de dapsona en ausencia de glicina.

El protocolo se realizó en neuronas piramidales de la M1 con un potencial de mantenimiento de -80mV. Las concentraciones que se probaron de dapsona fueron en 1, 10, 30, 100, 300 nM, 1, 3, 10, 30, y 100 μ M que se prepararon el día del experimento en diluciones seriadas de un stock 100 mM con un vehículo 100 mM de DMSO en solución de *TEA-free*.

El protocolo tuvo una duración de 15 segundos por trazo, de los cuales 3 segundos se aplicó NMDA para activar el NMDAR y observar la corriente entrante. Se establecieron tres condiciones experimentales en cada neurona: (1) control, (2) efecto, y (3) lavado.

De cada condición experimental se obtuvieron de 5-8 trazos estables al pico de la corriente y el estado estacionario para promediar cada trazo.

1. Control INMDA

Se aplicó una concentración 100 μ M de NMDA durante 3s, con un pulso de prueba de -10mV, con la finalidad de evaluar la resistencia del sello entre la membrana y la micropipeta.

2. Condición de efecto

Se aplicaron las diferentes concentraciones de dapsona en conjunto con el NMDA para generar la INMDA y observar el efecto que tiene el fármaco en la corriente ante diferentes concentraciones.

3. Condición de lavado

Se aplicaron las soluciones control y con NMDA al terminar entre cada concentración para “limpiar” el efecto que tuvo cada una y no se mezclaran.

6.4.3.3. Aplicación de dapsona + ACh 10 nM.

El protocolo se realizó en neuronas piramidales de la M1 con un potencial de mantenimiento de -80mV. Las concentraciones de dapsona fueron: 1 nM, 100 nM y 1 μ M así como 10 nM de ACh, que se prepararon el día del experimento en diluciones seriadas de un stock 100 mM de dapsona con un vehículo 100 mM de DMSO en solución de TEA-free y se coaplicaron cada una a la vez con NMDA.

El protocolo tuvo una duración de 15 segundos por trazo, de los cuales 3 segundos fueron de aplicación de NMDA en conjunto de ACh para activar el NMDAR y observar el efecto en la INMDA. Se establecieron tres condiciones experimentales en cada neurona: (1) control, (2) efecto, y (3) lavado. De cada condición experimental se obtuvieron de 5-8 trazos estables al pico de la corriente y el estado estacionario para promediar cada trazo.

1. Control INMDA

Se aplicó una concentración 100 µM de NMDA durante 3 s, con un pulso de prueba de -10mV, con la finalidad de evaluar la resistencia del sello entre la membrana y la micropipeta.

2. Condición de efecto

Se aplicaron las diferentes concentraciones de dapsona más ACh 10 nM en conjunto con el NMDA para generar la INMDA y observar el efecto que tiene el fármaco en la corriente ante las concentraciones.

3. Condición de lavado

Se aplicaron las soluciones control y con NMDA al terminar entre cada concentración para “limpiar” el efecto que tuvo cada una y no se mezclen.

6.4.3.4. Cálculo del porcentaje de cambio.

Las tres condiciones planteadas para dapsona y dapsona más ACh se aplicaron a cada neurona piramidal para posteriormente calcular el porcentaje de cambio de la INMDA en cada concentración aplicada de dapsona, utilizando la siguiente fórmula:

Ecuación 1. Fórmula para analizar efecto en cada INMDA

$$\text{Porcentaje} = 1 - \left(\frac{\text{efecto}}{\left(\frac{\text{control} + \text{lavado}}{2} \right)} \right) * 100$$

Efecto = En presencia de cada concentración de DDS.

Control = En ausencia de DDS.

Lavado = Después del efecto, donde hubo una exposición a DDS.

Se tomó el valor del pico máximo de la corriente en unidades de pico amperios (pA) del promedio de 5-10 trazos estables de la INMDA.

6.5. Análisis estadístico.

6.5.1. Diseño del estudio.

Se midió la amplitud al pico de la INMDA en pA y se reportó la media ± el error estándar de la media (E.E.M) de cada uno de los grupos. Los ajustes y gráficas se realizaron en

los programas Clampfit 11.2, Origin 2022 y Sigma Plot. Se graficaron los valores de la media \pm el error estándar de cada concentración en escala logarítmica para caracterizar la dosis-respuesta de los efectos ejercidos por las concentraciones 1, 10, 30, 100, 300 nM, 1, 3, 10, 30, y 100 μ M de dapsona en al menos 5 neuronas de la M1.

Los datos se ajustaron a una ecuación sigmoidea tipo dosis-respuesta dada la siguiente ecuación:

Ecuación 2. Ecuación para la curva dosis respuesta

$$y = A1 + \frac{A2 - A1}{(1 + 10^{(LOGx0-x)*p})}$$

$A1 = \text{Efecto mínimo}$

$A2 = \text{Efecto máximo}$

$x = \text{Valor de la concentración}$

$$10^{(LOGx0)} = EC_{50}$$

$p = \text{pendiente o coeficiente de Hill}$

Los datos de la ecuación anterior son en función de obtener la concentración efectiva 50 (EC_{50}) y el efecto máximo (E_{max}) en cada una de las áreas de estudio. Estos parámetros nos permitieron conocer si la concentración para llegar al 50% del efecto es diferente en M1 y con cuál concentración existió un mayor efecto (numérico).

Para determinar el efecto de dapsona sobre las neuronas provenientes de M1, se aplicó una prueba ANOVA tomando como factor independiente la concentración de dapsona y la región de la M1. Se analizaron por separado las concentraciones de las INMDA con dapsona y dapsona más ACh por separado. La dapsona constó de concentraciones 1, 10, 30, 100, 300 nM, 1, 3, 10, 30, 100 μ M, por otro lado, la ACh de una concentración 10 nM.

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 Ca^{2+} dependientes de voltaje, una capacitancia de entre 10 y 30 pF, una resistencia de membrana de 1 G Ω y una resistencia de $\leq 25M\Omega$.

6.5.2. Diseño y tipos de muestreo.

Se utilizó un muestreo aleatorio estratificado para dividir la población neuronal total en función de sus diferentes características morfológicas por ser solo neuronas piramidales de la M1. Posteriormente se seleccionaron aleatoriamente las células que cumplan las características mencionadas.

6.5.3. Método de recolección de datos.

Los registros electrofisiológicos se obtuvieron con un amplificador para fijación de voltaje (voltaje clamp) Multiclamp 700 A (Molecular Devices, Foster City, CA), controlado con el programa pClamp Versión 8 (Molecular Devices), ejecutándose en una computadora con procesador Pentium con una interfase tipo Digidata 1320 A (Molecular Devices).

7. Resultados.

7.1. Micrografías.

Durante el proyecto se registraron un total de 72 neuronas, 59 para la curva dosis respuesta de las diferentes concentraciones de dapsona en ausencia de glicina y 13 para analizar el efecto de la Acetilcolina 10 nM y su interacción con 1 nM, 100 nM y 1 μ M, de dapsona en ausencia de glicina. En la Figura 13 se muestran 6 micrografías de las neuronas representativas que se capturaron antes de iniciar el registro electrofisiológico correspondiente, características por su morfología piramidal, dendrita apical y tamaño mínimo de 20 μ m.

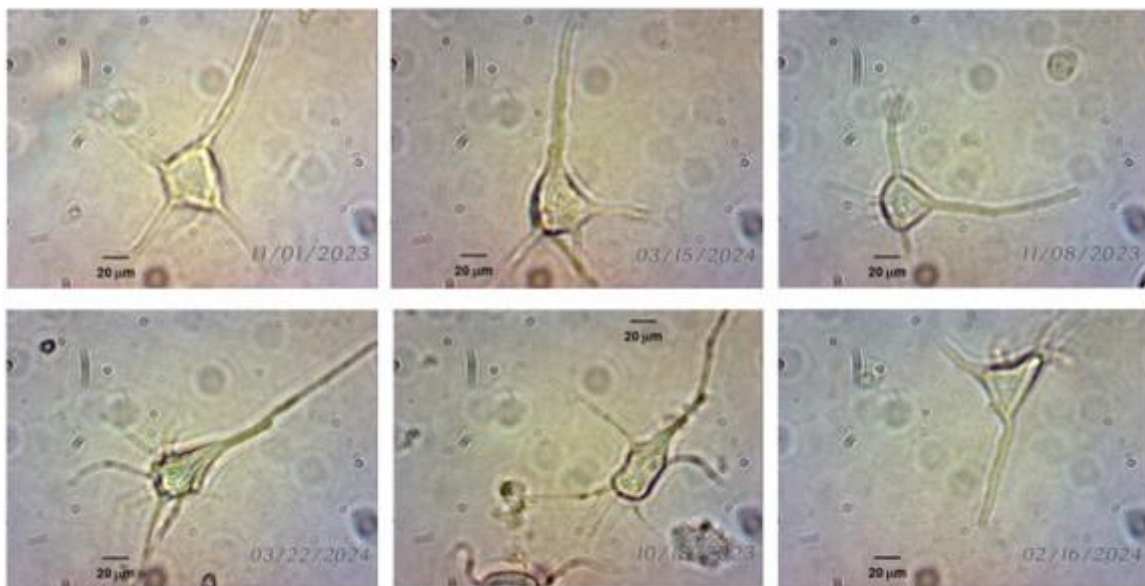
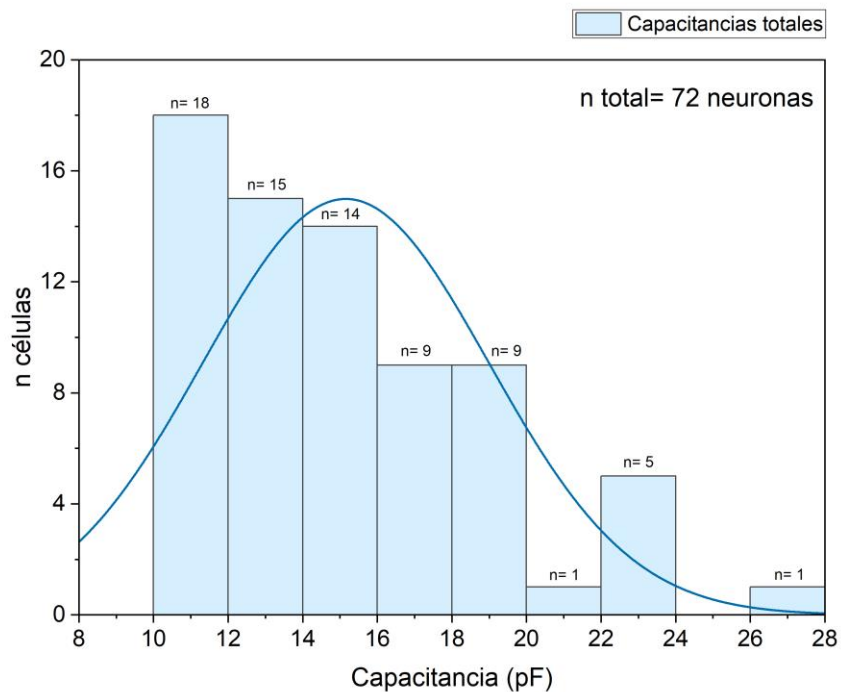


Figura 13. Micrografías de las neuronas piramidales de las capas V y VI de la corteza motora primaria. Micrografías obtenidas a través de un objetivo 40 X de las neuronas piramidales representativas de la corteza motora primaria de la capa V y VI que se registraron a lo largo del proyecto. Se caracterizan por una forma piramidal, con una dendrita apical y un tamaño de soma aproximado a los 20 μ m.

7.2. Capacitancias.

Se registraron aquellas células con una capacitancia >10 pF en relación con un tamaño de soma mínimo de 20 μ m. Se realizó un histograma (Gráfica 1) para representar la distribución de capacitancia de las 72 neuronas utilizadas durante

todo el proyecto experimental. La gráfica muestra que la mayor población de las células registradas se distribuye entre las capacitancias 10 a 16 pF.



Gráfica 1. Histograma de las capacitancias de las neuronas registradas. Histograma de capacitancias de las células totales registradas durante el proyecto experimental. Se caracteriza por una mayor n poblacional distribuida hacia la izquierda en el rango de 10-16 pF.

7.3. Protocolo de rampa.

Se aplicó el protocolo electrofisiológico de “rampa de voltaje”, donde se mantiene el estado de membrana en reposo a -80 mV para generar un cambio de voltaje de - 100 mV y comenzar a despolarizar la membrana hasta llegar a los +40 mV.

Con la aplicación de este protocolo se observa la activación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje a partir de -40 mV, representados con un pico prominente característico por la cinética del canal, por otro lado, la apertura de los canales de Ca^{2+} comienza a partir de -10 mV representada en una curva menos prominente indicando la característica cinética de un cierre lento del canal. Este protocolo nos permite

verificar el estado de membrana de la célula, determinar su viabilidad y respuesta para el registro electrofisiológico de acuerdo con su repertorio de canales (Figura 14).

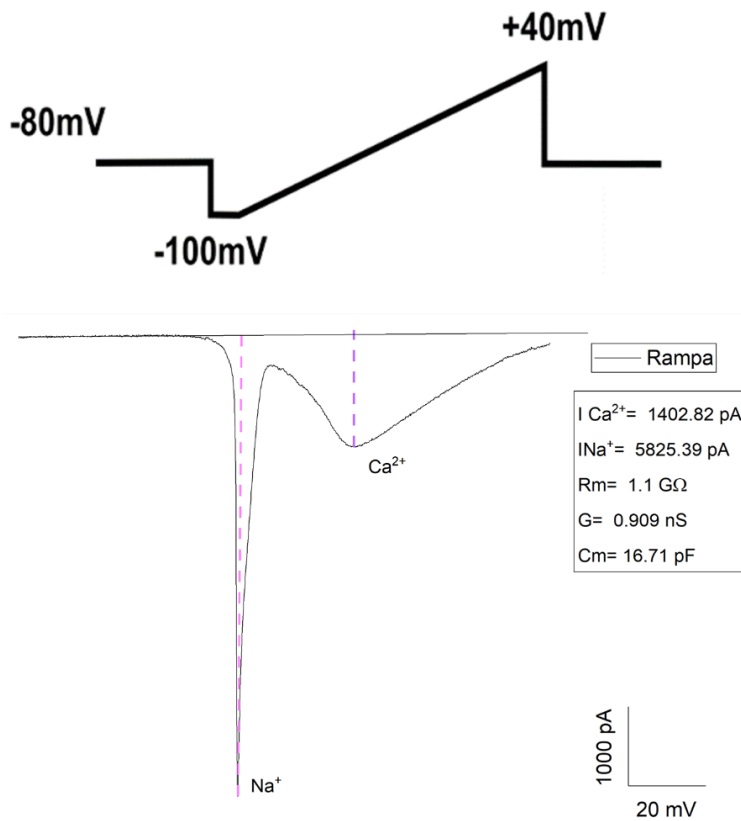


Figura 14. Trazo representativo del protocolo de rampa de voltaje. Representación del protocolo rampa de voltaje indicando cambios súbitos de voltaje de -80 a -100 y +40 mV en función de verificar el estado neuronal, observando la I Na⁺ (línea punteada color rosa) característica por un pico rápido de aproximadamente 6000 pA y una I Ca²⁺ (línea punteada color morada) de aproximadamente 1500 pA.

7.4. Aplicación de dapsona en ausencia de glicina.

7.4.1. Trazos representativos de las concentraciones de dapsona.

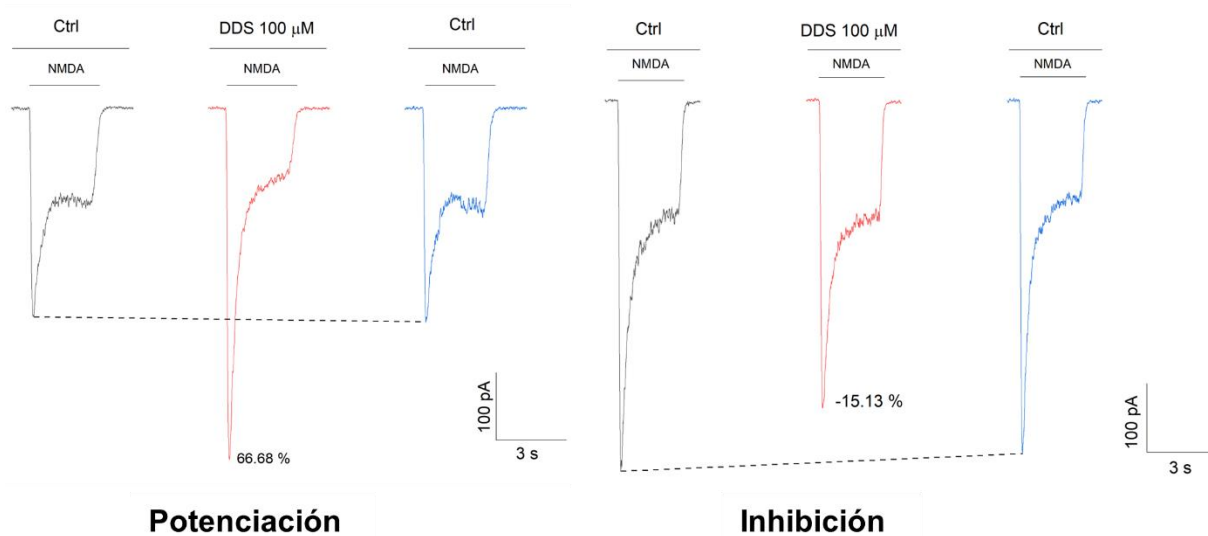
La dapsona se aplicó en concentraciones 1, 10, 30, 100, 300 nM, 1, 3, 10, 30, y 100 μM. en ausencia de glicina a 59 neuronas piramidales. En vista de la obtención de resultados de potenciación e inhibición, se desglosa cada concentración con los trazos representativos de la corriente con cada respuesta.

Todas las concentraciones de dapsona se aplicaron en ausencia del coagonista clásico glicina.

7.4.1.1. Dapsona 100 μ M.

Se aplicó la concentración de dapsona 100 μ M a un total de 19 neuronas piramidales, de las cuales 15 potenciaron con un promedio de potenciación de 40.361 ± 7.91 % y 4 inhibieron con un promedio de -23.285 ± 8.155 %. En la figura 15 se muestran los trazos representativos de la potenciación e inhibición respectivamente.

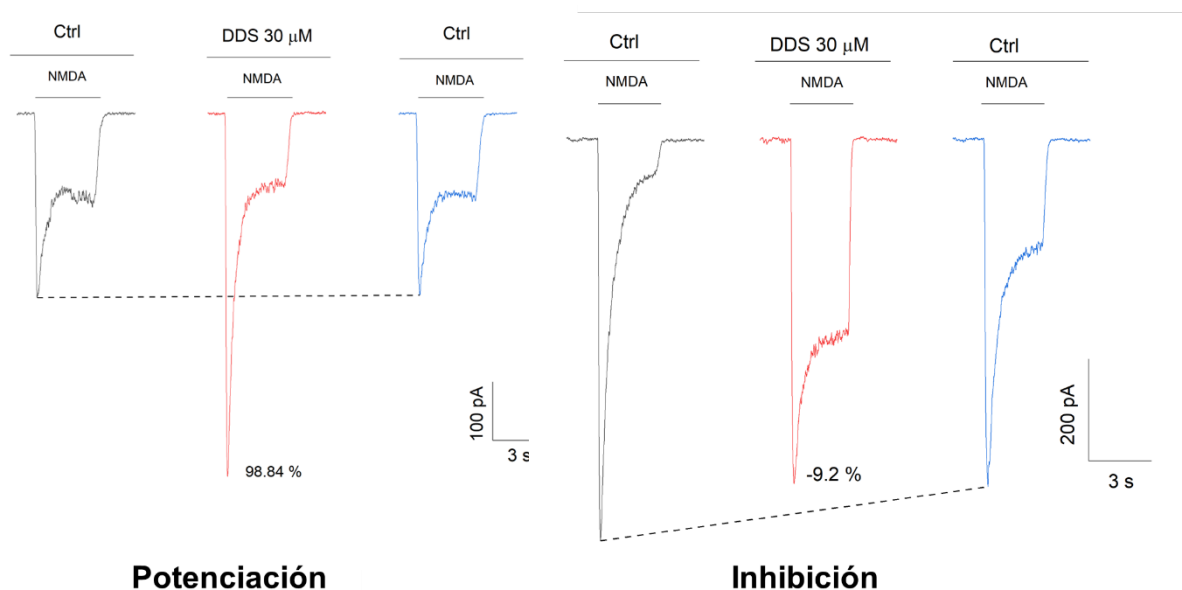
Figura 15. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 100 μ M.



7.4.1.2. Dapsona 30 μ M.

Se registraron un total de 21 neuronas con una concentración de dapsona a 30 μ M, con un promedio de potenciación de 48.446 ± 13.855 % para 16 neuronas y un promedio de inhibición de -10.088 ± 6.378 % para 5 neuronas. En la figura 16 se muestran los trazos representativos de potenciación e inhibición respectivamente.

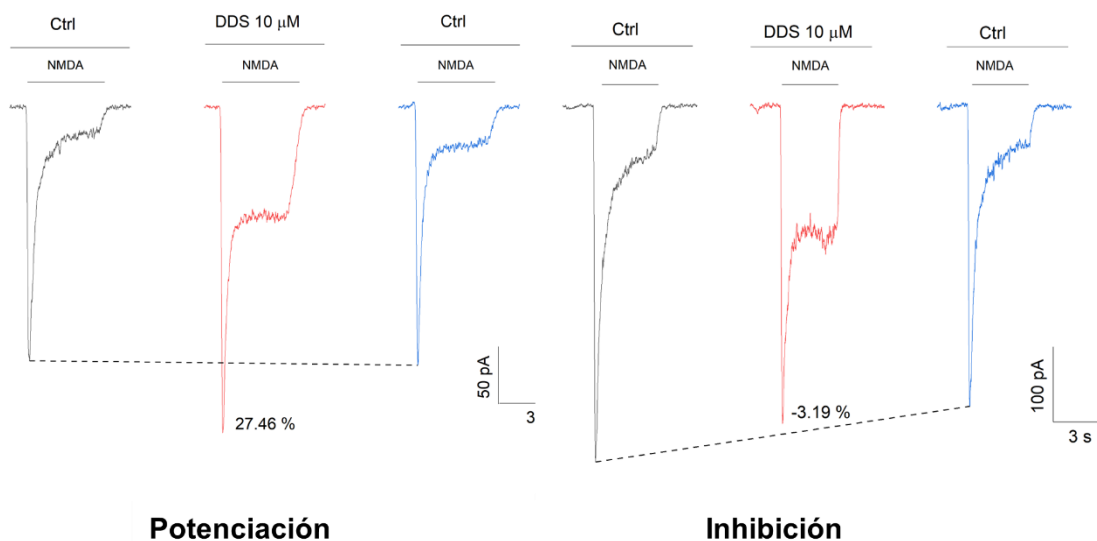
Figura 16. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 30 μM .



7.4.1.3. Dapsona 10 μM .

Para un total de 17 neuronas registradas con la concentración de dapsona 10 μM , 14 células potenciaron y 3 inhibieron, con un promedio de potenciación de 27.01 ± 6.254 % e inhibición de -3.19 %. En la figura 17 se muestran los trazos representativos de potenciación e inhibición respectivamente.

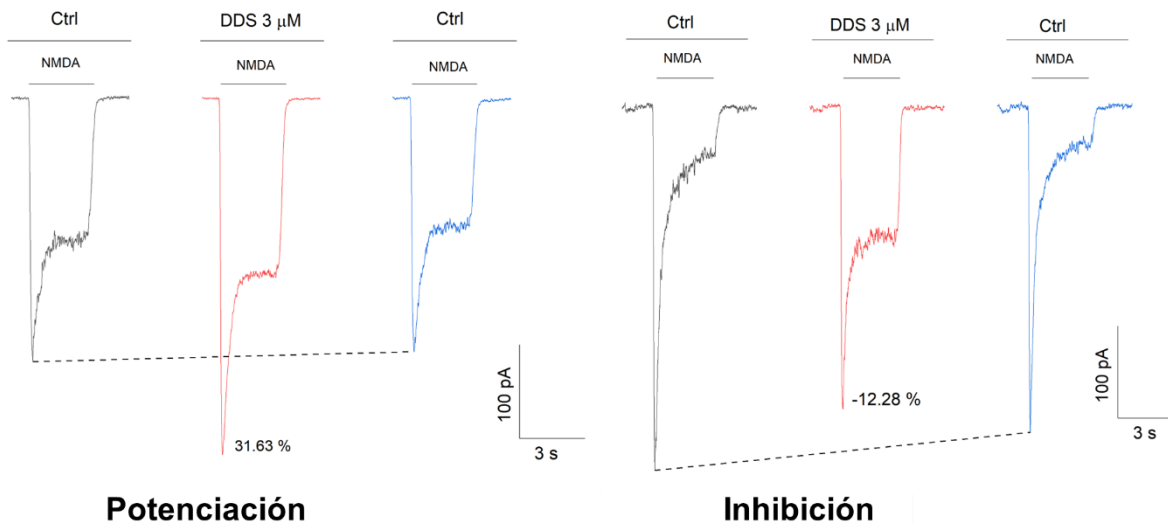
Figura 17. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 10 μM .



7.4.1.4. Dapsona 3 μ M.

Se aplicó la concentración de dapsona 3 μ M a un total de 14 neuronas piramidales, de las cuales 10 potenciaron con un promedio de potenciación de 20.676 ± 5.822 % y 4 inhibieron con un promedio de -12.28 %. En la figura 18 se muestran los trazos representativos de potenciación e inhibición respectivamente.

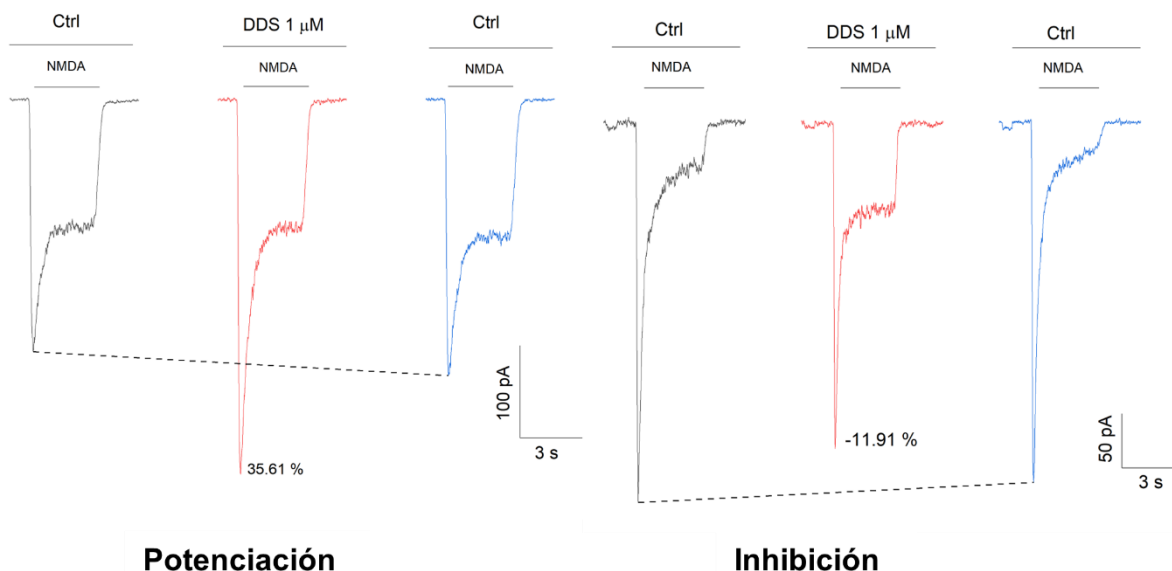
Figura 18. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 3 μ M.



7.4.1.5. Dapsona 1 μ M.

Se registraron un total de 14 neuronas con una concentración de dapsona a 1 μ M, con un promedio de potenciación de 27.876 ± 6.212 % para 10 neuronas y un promedio de inhibición de -11.91 % para 4 neuronas. En la figura 19 se muestran los trazos representativos de potenciación e inhibición respectivamente.

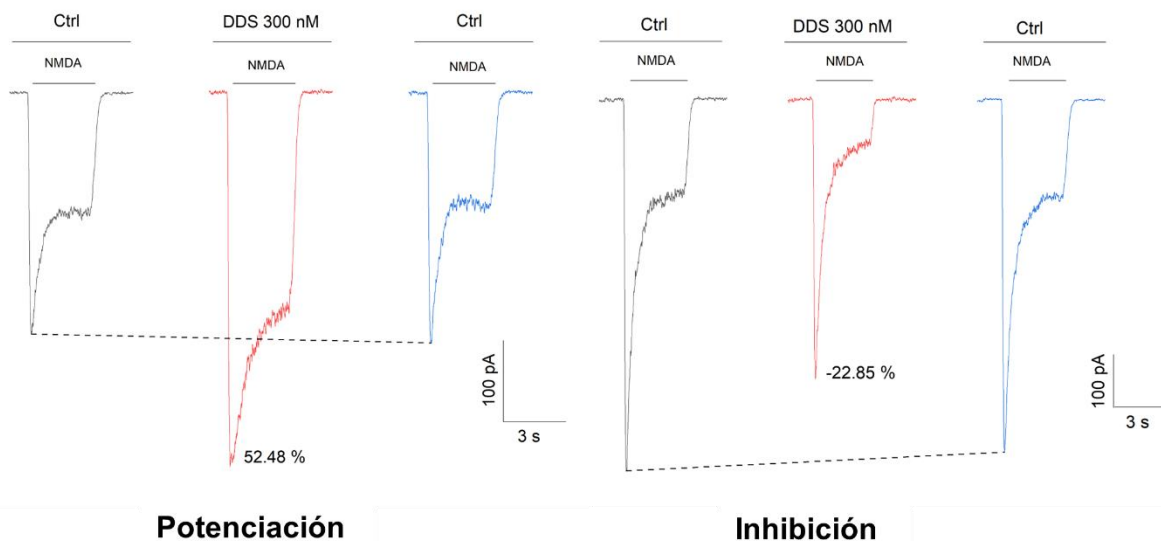
Figura 19. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 1 μ M.



7.4.1.6. Dapsona 300 nM.

Para un total de 18 neuronas registradas con la concentración de dapsona 300 nM, 11 células potenciaron y 7 inhibieron, con un promedio de potenciación de 40.006 ± 10.086 % e inhibición de -23.525 ± 6.931 %. En la figura 20 se muestran los trazos representativos de potenciación e inhibición respectivamente.

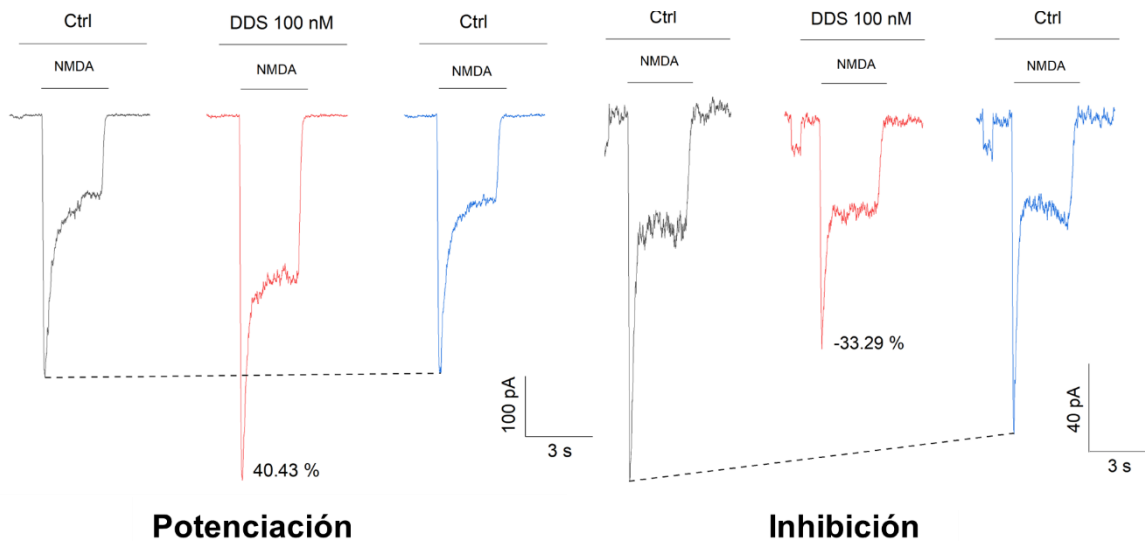
Figura 20. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 300 nM.



7.4.1.7. Dapsona 100 nM.

Se aplicó la concentración de dapsona 100 nM a un total de 26 neuronas piramidales, de las cuales 16 potenciaron con un promedio de potenciación de 74.633 ± 13.053 % y 10 células inhibieron con un promedio de -51.826 ± 10.626 %. En la figura 21 se muestran los trazos representativos de potenciación e inhibición respectivamente.

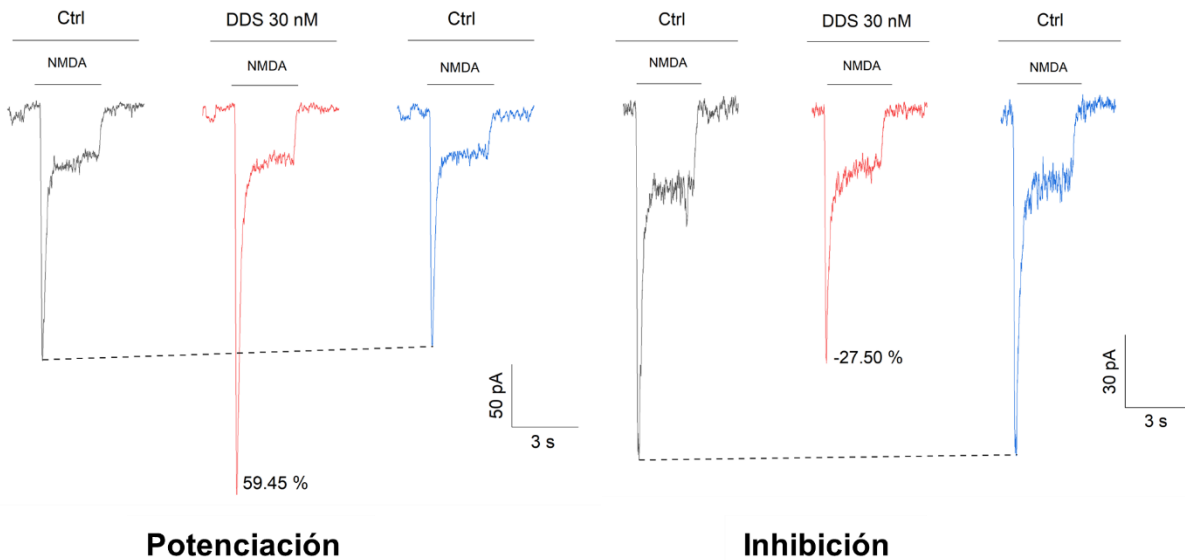
Figura 21. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 100 nM.



7.4.1.8. Dapsona 30 nM.

Se registraron un total de 31 neuronas con una concentración de dapsona a 30 nM, con un promedio de potenciación de 130.23 ± 18.587 % para 24 neuronas y un promedio de inhibición de -30.317 ± 12.334 % para 7 neuronas. En la figura 22 se muestran los trazos representativos de potenciación e inhibición respectivamente.

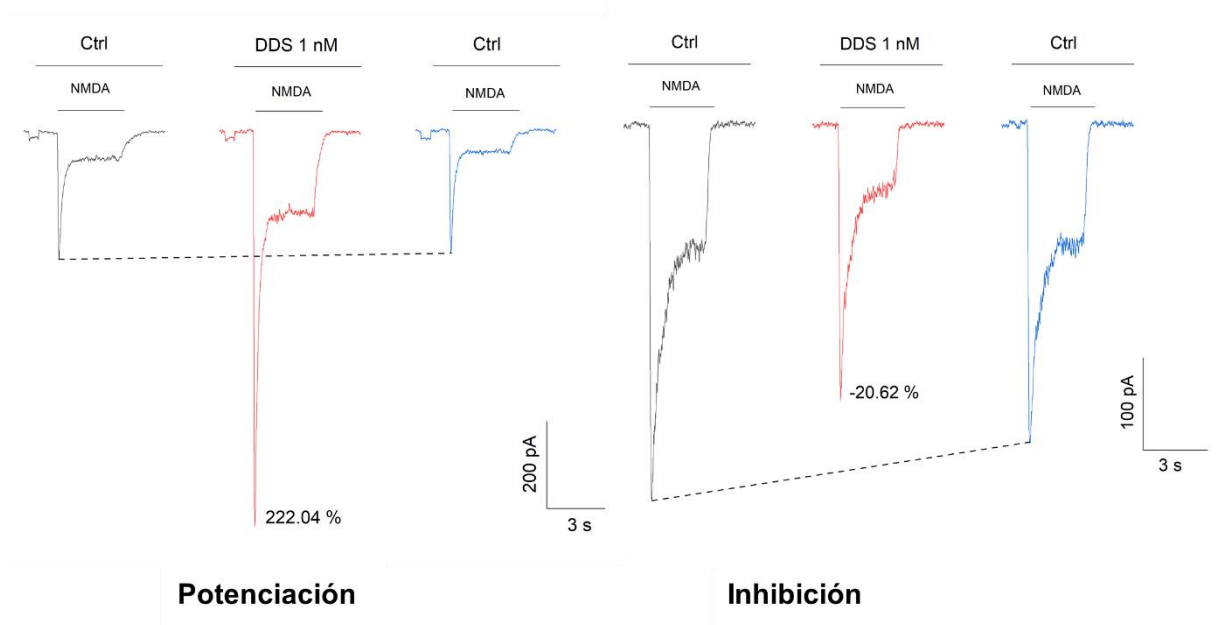
Figura 22. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 30 nM.



7.4.1.9. Dapsona 10 nM.

Para un total de 23 neuronas registradas con la concentración de dapsona 10 nM, 18 células potenciaron y 5 inhibieron, con un promedio de potenciación de 109.496 ± 26.311 % e inhibición de -28.11 ± 14.415 %. En la figura 23 se muestran los trazos representativos de potenciación e inhibición respectivamente

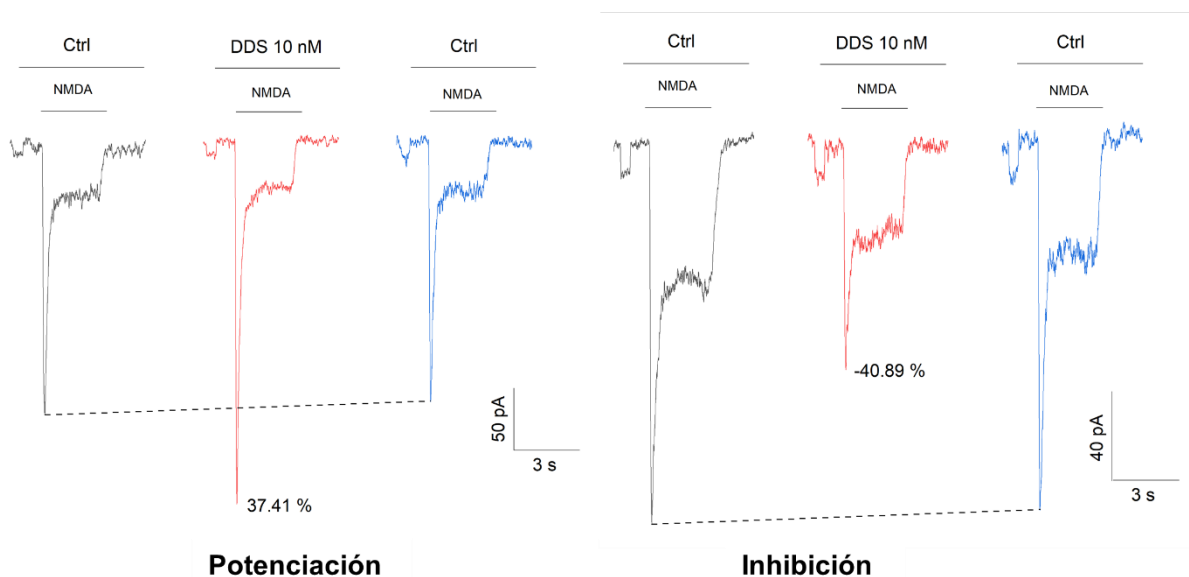
Figura 23. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 10 nM.



7.4.1.10. Dapsona 1 nM.

Se aplicó la concentración de dapsona 1 nM a un total de 26 neuronas piramidales, de las cuales 13 potenciaron con un promedio de potenciación de $169.583 \pm 34.72 \%$ y 13 inhibieron con un promedio de $-33.036 \pm 6.486 \%$. En la figura 24 se muestran los trazos representativos de potenciación e inhibición respectivamente.

Figura 24. Trazos representativos de la aplicación de dapsona 1 nM.

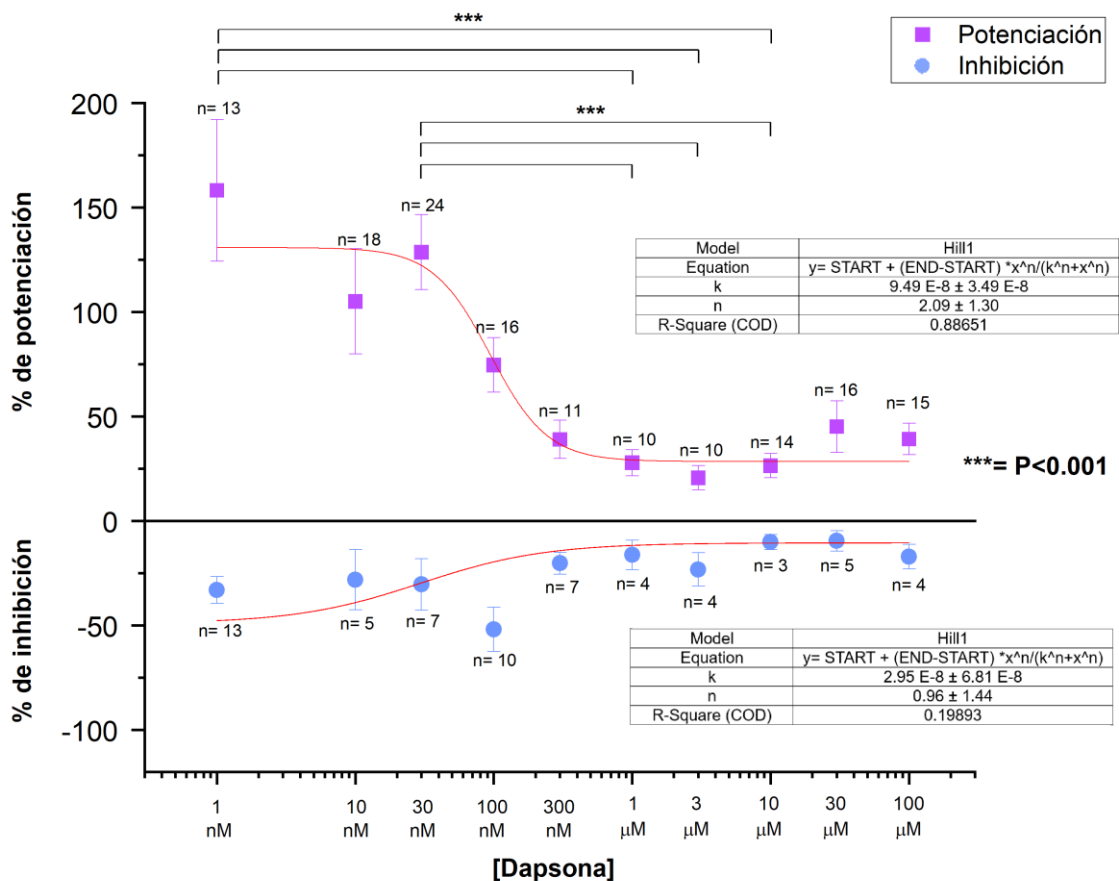


7.4.2. Curva dosis-respuesta dapsona en ausencia de glicina.

Con los resultados previamente descritos se procedió a realizar la curva dosis respuesta (Gráfica 2), con las respectivas concentraciones de dapsona en ausencia de glicina graficando el promedio más o menos el error estándar.

Los datos de la potenciación se ajustaron a una ecuación de Hill con una EC_{50} en $9.49 E-8 \pm 3.49 E-8$ de dapsona. Por otra parte, los resultados de inhibición no se ajustaron a una curva dosis-dependiente, sin embargo, se estimaría la EC_{50} de $2.95 E-8 \pm 6.81 E-8$. Entre la potenciación y la inhibición no hubo diferencia estadísticamente significativa, pero si hubo diferencias entre los datos de potenciación.

Se observó que la dapsona a concentración 1 nM tiene una mayor potenciación a diferencia del rango de 300, 1, 3 nM y 10 μM. Por otra parte, hay una mayor potenciación a concentraciones nM de 1, 10, 30 y 100 en comparación de las concentraciones micromolares. Por otro lado, el porcentaje de inhibición pareciera mantenerse en el rango de -10 a -50% en todas las concentraciones de dapsona.



Gráfica 2. Curva dosis-respuesta de la dapsona en ausencia de glicina, dividida en potenciación e inhibición. Gráfica de la curva dosis respuesta de acuerdo con las concentraciones μM: 100, 30, 10, 3, 1, y nM: 300, 100, 30, 10, 1, de dapsona en ausencia de glicina donde se desglosa la n de aplicaciones dividido en la respuesta de potenciación o inhibición de la INMDA. Se delimitan las concentraciones con un cambio significativo de P < 0.001 y el ajuste a la ecuación de Hill.

Se compararon los resultados de potenciación e inhibición mediante la prueba ANOVA de una vía. Los datos de potenciación fallaron la prueba de normalidad Shapiro-Wilk con un valor P = < 0.050, por lo que se empleó una prueba no paramétrica de Kruskal-

Wallis (ANOVA por rangos) con una diferencia estadísticamente significativa ($P = <0.001$), con una postprueba de Dunn indicando los siguientes resultados:

- DDS 1 y 30 nM tiene diferencia significativa respecto a 1, 3, y 10 μM con $P = <0.001$
- DDS 1 nM no tiene diferencia significativa respecto a 300 nM.
- DDS 10 nM no tiene diferencia significativa respecto a 3 μM .

*En los anexos se incluye la tabla de comparación múltiple por pares de la post prueba de Dunn.

7.5. Coaplicación de ACh 10 nM en dapsona 1, 100 nM y 1 μM

7.5.1. Trazos representativos de la ACh 10 nM.

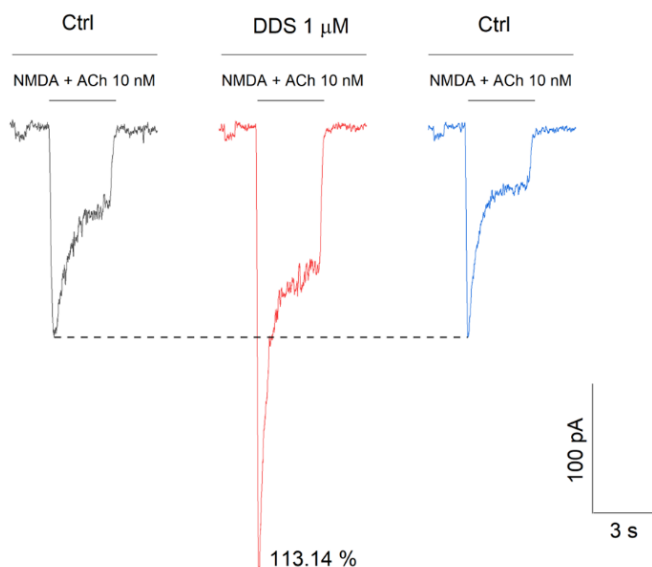
Se utilizó un total de 3 concentraciones de dapsona (1 μM , 100 y 1 nM) que se coaplicaron con ACh 10 nM en ausencia de glicina a 13 neuronas piramidales. A continuación, se desglosa cada concentración con los trazos representativos de la corriente con cada respuesta.

7.5.1.1. Dapsona 1 μM + ACh 10 nM.

Se registró un total de 11 neuronas con una concentración de ACh 10 nM en dapsona a 1 μM en ausencia de glicina, con un promedio de potenciación de $67.976 \pm 8.75 \%$. Se observó un aumento en el promedio de potenciación respecto a la aplicación única de dapsona con un promedio de potenciación de $169.583 \pm 34.72 \%$ respecto a 10 células.

En la figura 25 se muestra un trazo representativo de la aplicación de ACh 10 nM en dapsona 1 μM en ausencia de glicina.

Figura 25. Trazo representativo de la aplicación de ACh 10 nM en dapsona 1 μ M.

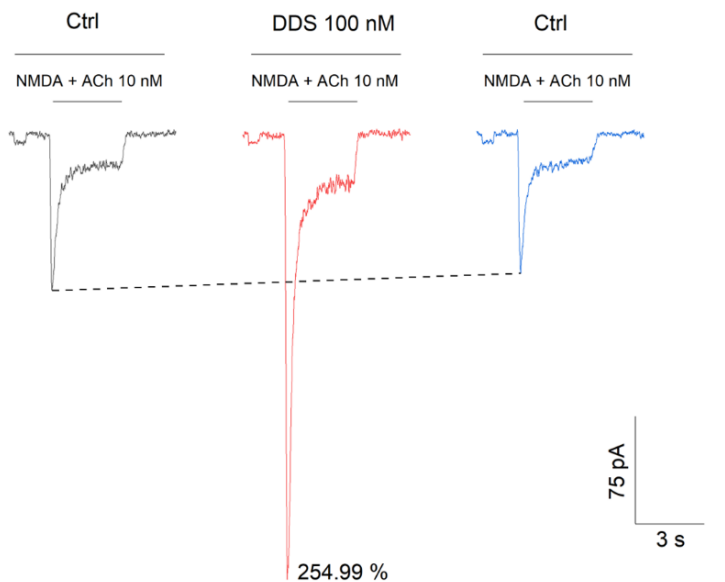


7.5.1.2. Dapsona 100 nM + ACh 10 nM.

Para un total de 10 neuronas registradas con la concentración de dapsona 100 nM con un promedio de potenciación de 162.906 ± 25.087 %, demostrando una mayor potenciación respecto a la única aplicación de dapsona 100 nM donde su promedio de potenciación es de 74.633 ± 13.053 % con un total de 16 neuronas.

En la figura 26 se muestra un trazo representativo de la aplicación de ACh 10 nM en dapsona 100 nM en ausencia de glicina.

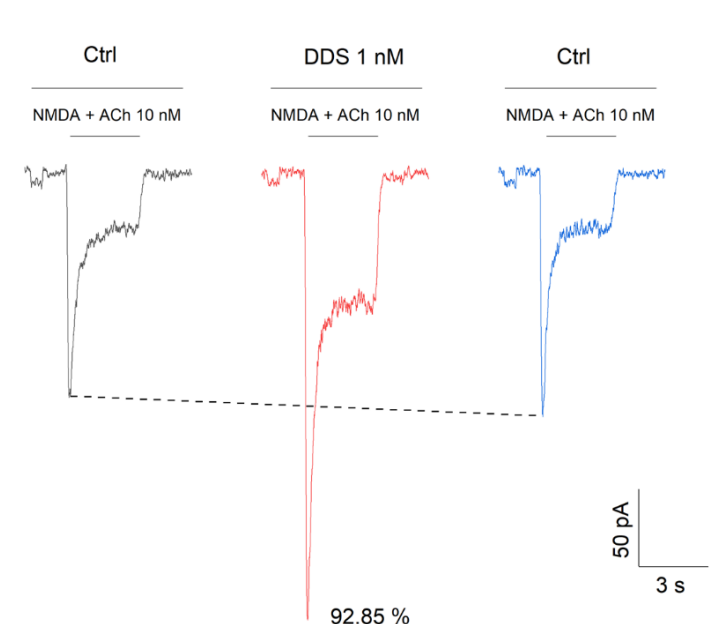
Figura 26. Trazo representativo de la aplicación de ACh 10 nM en dapsona 100 nM.



7.5.1.3. Dapsona 1 nM + ACh 10 nM.

Se aplicó la concentración de ACh 10 nM en dapsona 1 nM en ausencia de glicina a un total de 12 neuronas piramidales, con un promedio de potenciación de $61.015 \pm 4.85 \%$. El promedio de potenciación con ACh es menor que la potenciación observada con la única aplicación de dapsona que es de $169.583 \pm 34.72 \%$ respecto a 13 células. En la figura 27 se muestra un trazo representativo de la aplicación de ACh 10 nM en dapsona 1 nM en ausencia de glicina.

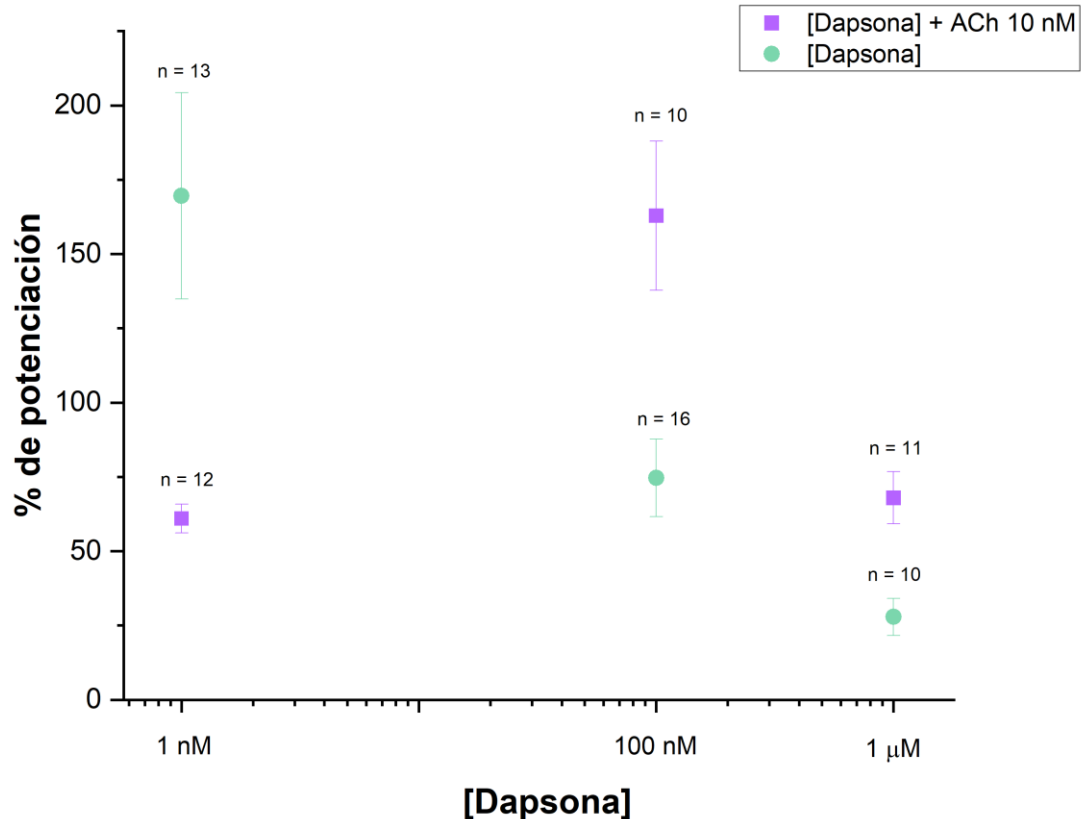
Figura 27. Trazo representativo de la aplicación de ACh 10 nM en dapsona 1 nM.



7.5.2. Curva dosis-respuesta ACh 10 nM.

Se utilizaron las concentraciones 1 μ M, 100 y 1 nM en función de la curva dosis respuesta de la dapsona en ausencia de glicina para analizar el efecto de la ACh 10 nM. La gráfica 3 muestra una vista preliminar del efecto de la unión de ACh con el receptor NMDA, donde teniendo aproximadamente la misma cantidad de células para cada concentración, hay un aumento en la potenciación para 1 μ M y 100 nM donde el promedio de potenciación es de $67.976 \pm 8.75 \%$ y $162.906 \pm 25.087 \%$

respectivamente. Por otro lado, existe una disminución en la potenciación de 1 nM con un promedio de potenciación de $61.015 \pm 4.852 \%$.



Gráfica 3. Comparación del efecto de la dapsona en concentraciones $1 \mu\text{M}$, 100 y 1nM en ausencia de glicina, respecto al de ACh 10nM en las mismas concentraciones de dapsona. Gráfica comparativa del efecto de la dapsona $1 \mu\text{M}$, 100 y 1nM (representada en verde) respecto a su coaplicación de ACh 10nM (representada en morado), ambas en ausencia de glicina.

Se compararon los resultados mediante una prueba ANOVA de una vía, aprobando la prueba de normalidad Shapiro-Wilk con un valor $P = 0.142$, se aplicó la prueba no paramétrica de una vía Kruskal-Wallis (ANOVA por rangos) con una diferencia significativa de $P = 0.004$. Posteriormente se realizó una prueba de Dunn indicando:

- DDS 100nM tiene una diferencia significativa respecto a 1nM y $1 \mu\text{M}$ respecto a $P < 0.05$
- No hay diferencia significativa entre 1nM y $1 \mu\text{M}$ respecto a $P < 0.05$

*En los anexos se incluye la tabla de comparación múltiple por pares de la post prueba de Dunn.

8. Discusión.

En 2018 se demostró que la dapsona disminuye la INMDA en neuronas piramidales de la capa V y VI de la M1 aplicado en concentraciones 1, 3, 10, 30, 100, 300 nM, 1, 3, 10, 30, y 100 μ M, observando un efecto máximo con 1 μ M sin diferencia estadística para 100, 300 nM, 3 y 10 μ M efecto casi nulo con 1 nM (Gómez-Gómez, 2018). Sin embargo, este trabajo fue en presencia de glicina por ser considerado un coagonista obligado para activar el receptor.

Es por lo anterior que se utilizaron 10 concentraciones de dapsona para analizar su efecto en la INMDA mediante una curva dosis-respuesta, así como determinar la participación de la acetilcolina a 10 nM sobre la subunidad GluN1 en la neuromodulación por la dapsona en la INMDA.

En consideración con los resultados anteriores, se estableció como objetivo conocer la respuesta del canal solo con el ligando para la generación de la corriente. A pesar de que clásicamente se propone la coaplicación de un coagonista para el estudio de la corriente, ciertos estudios han demostrado que las neuronas glicinérgicas abundan en la médula espinal y en el tronco encefálico, pero, no en el prosencéfalo, donde los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR) abundan (Zeilhofer, y otros, 2004). Por el contrario, uno de los neurotransmisores con cuerpos celulares ubicados en el cerebro es la ACh, por lo que se buscó coaplicar 10 nM de ACh que ha demostrado potenciar la INMDA en ausencia de glicina (Islas, y otros, 2022).

8.1. Efecto de la dapsona en ausencia de glicina.

8.1.1. Modulador alostérico.

A pesar de haber eliminado la variable del coagonista para la activación del receptor, se observaron resultados contrastantes respecto a los estudios anteriores obteniendo potenciaciones e inhibiciones de la corriente de estudio en presencia de diferentes concentraciones de dapsona, a diferencia de la inhibición de la INMDA reportada por Gómez-Gómez (2018) en todas las concentraciones utilizadas de dapsona.

Una de las posibles explicaciones a nuestros resultados engloba al efecto de las moléculas alostéricas, que se ha reportado son capaces de unirse a un sitio diana de

una proteína y afectar su actividad. Esta interacción ocurre a través de la unión de una molécula en las proteínas para modular su energía conformacional (Kenakin, 2012).

El NMDAR ha representado una diana terapéutica por sus diversos sitios de unión de actividad potenciadora e inhibitoria, por lo que la identificación de nuevos agentes como moduladores alostéricos positivos y negativos (PAMs y NAMs) ofrecen un control farmacológico significativo sobre la actividad del receptor (Burnell, y otros, 2019). Por ejemplo, un estudio coaplicó un modulador alostérico negativo en el arreglo GluN1/GluN2A empleando la técnica de patch-clamp en la configuración outside-out, concluyendo que reduce tanto la corriente general de la activación del receptor, como el flujo iónico de Ca^{2+} en comparación con los cationes monovalentes (Perszyk, y otros, 2021).

Algunos compuestos son capaces de modular la actividad del NMDAR a través del sitio de unión al glutamato, al coagonista, al poro del canal iónico, al dominio regulador del amino terminal, o a través de múltiples sitios de unión del receptor; se han probado antagonistas dirigidos a GluN1 y GluN2 que demuestran las diferentes formas en que las conformaciones del dominio de unión al ligando (LBD) pueden ser reguladas y acoplarse a la inhibición del receptor. Esto promueve la búsqueda de compuestos con selectividad de subtipos en el receptor que sean potenciales dianas terapéuticas (Monaghan, y otros, 2012; Jespersen y otros, 2014).

Por lo anterior, se sugiere que la dapsona en ausencia de glicina podría actuar como un modulador alostérico positivo al aumentar la INMDA, probablemente regulando las propiedades biofísicas y conformacionales del receptor a través de la subunidad GluN1.

8.1.2. Coagonismo por glicina.

Un estudio sobre la selectividad de subunidades para antagonistas competitivos del NMDAR con preferencia en las subunidades GluN2A sobre GluN2B sugiere que esta característica al sitio de unión del glutamato puede estar mediada su interacción con los residuos de contacto para la afinidad de unión, así como por diferentes mecanismos (Lind, y otros, 2017). Lo anterior sugeriría un mecanismo similar para el sitio de unión a glicina en la subunidad GluN1.

A pesar de haberse demostrado que la glicina puede actuar como un regulador para evitar el daño de la sobreactivación prolongada del NMDAR (Stroebelel, y otros, 2021), estudios han determinado que el glutamato disminuye la afinidad del receptor por la glicina, evidenciando una cooperatividad negativa entre ambas moléculas, ejerciendo un cambio conformacional en vista de la proximidad de las subunidades GluN1 y GluN2, dependiente de la conexión entre ambos dímeros (Mayer, y otros, 1989; Durham, y otros, 2020). Sin embargo, la unión de la acetilcolina al NMDAR genera una mayor estabilidad al ser enérgicamente más favorables, lo que podría beneficiar energéticamente la conformación del receptor y su respuesta (Islas, y otros, 2022).

El coagonismo del NMDAR GluN1/GluN2 tiene una alta sensibilidad al microambiente y potencial para ajustar su actividad global, donde el sitio de unión a glicina actúa como un sitio alostérico regulador, más que como un sitio verdaderamente ortostérico, evitando así el daño potencial de la sobreactivación prolongada del NMDAR. La influencia de la glicina en la biología del iGluR modifica el entendimiento de la diversidad de señalización y complejidad con implicaciones neurofarmacológicas (Stroebelel, y otros, 2021).

La función del coagonista detallada anteriormente explicaría el por qué observamos una potenciación en la INMDA al utilizar el NMDA como un ligando único, otorgando la función de modulador alostérico positivo a la dapsona. Sin embargo, la potenciación de la corriente observada por la aplicación de la dapsona resulta perjudicial ya que promovería un ambiente de excitotoxicidad en la comunicación neuronal.

Por otro lado, cuando la dapsona en ausencia de glicina reduce la corriente, además de actuar como una molécula alostérica negativa, podríamos estar hablando de un efecto dependiente de la hiper o hipo función del receptor, de su arreglo de subunidades o incluso de su ubicación.

8.1.3. Doble función del NMDAR.

La hiper e hipofunción del NMDAR tiene un efecto perjudicial a nivel neuronal, por lo que el desarrollo de moduladores alostéricos, con sitios de unión específicos y mecanismos de acción, provee información sobre la fisiología del NMDAR, especialmente de su participación en diferentes poblaciones en el cerebro. Lo anterior,

aportará eventualmente conocimiento sobre las funciones patológicas del receptor en la disfunción cerebral, ayudando en el diseño de nuevos compuestos farmacológicos alostéricos, siendo los positivos aquellos capaces de regular diferencialmente las formas de plasticidad sináptica dependiendo de su estequiometría en función a la selectividad de subtipos del receptor (France, y otros, 2022).

De esta manera, en presencia de glicina, el efecto de la molécula utilizada podría ser equívoco, puesto que la glicina genera un cambio en la cinética del receptor, por lo que estudiar al receptor interactuando solo con su ligando aporta información novedosa sobre la modulación, así como permite una mayor comprensión acerca de su función, permitiendo proponer nuevos y potenciales fármacos.

8.1.4. Arreglo de subunidades del NMDAR.

El arreglo de subunidades interviene en la activación del NMDAR, ya que en cultivos neuronales se ha reportado que sea sináptica o extrasináptica, la subunidad NR2B conlleva a la excitotoxicidad, aumentando la apoptosis neuronal, a diferencia de aquellos con la subunidad GluN2A que promueven la supervivencia celular y ejercen una acción neuroprotectora contra el daño neuronal mediado o no por el NMDAR. Estableciendo así una base molecular para la actividad dual del receptor, y proponiéndolo como una terapia prometedora (Liu, y otros, 2007).

Anteriormente, la búsqueda en la intervención terapéutica del NMDAR se enfocaba en inhibidores del receptor, sin embargo, en vista del descubrimiento que la hipofunción del NMDAR también puede provocar enfermedades como la esquizofrenia, se ha buscado aumentar la actividad/ función del receptor. Sin embargo, no se sabe si mejorar la activación de la actividad fisiológica es suficiente para desencadenar la excitotoxicidad, por lo que es importante utilizar los moduladores alostéricos positivos del NMDAR como una herramienta para analizar la contribución de la composición de subunidades y su participación en los procesos excitotóxicos (Yao & Zhou, 2017).

Con base en lo anterior, el efecto dual de la dapsona en ausencia de glicina sugiere que la respuesta podría depender del arreglo de subunidades del NMDAR, sumado a la falta de modulación por parte de la glicina.

8.1.5. Distribución del NMDAR.

La ubicación del NMDAR es un factor determinante para su respuesta, ya que la estimulación sináptica ocurre a través de la señalización de Ca^{2+} , a diferencia de la extrasináptica que promueve la muerte celular dependiente de la magnitud y duración de la activación del receptor. Estos efectos sinápticos podrían depender de las vías de señalización intracelular, donde un desbalance en ambas estimulaciones contribuye a la disfunción neuronal. Por lo anterior la búsqueda y desarrollo de antagonistas neuroprotectores con función dual, podría mejorar el efecto de la actividad sináptica e interrumpiría la señalización de muerte extrasináptica dependiente del NMDAR, clarificando el rol del receptor en ciertas enfermedades como, por ejemplo, la neurodegeneración (Hardingham & Bading, 2010; Zhou, y otros, 2015).

Nuestra metodología se enfoca en disociar agudamente una neurona, por lo que podríamos encontrar tanto NMDAR sinápticos como extrasinápticos, justificando así el efecto dual del receptor, posiblemente asociado a la dapsona en ausencia de glicina donde al responder una sola neurona en conjunto con todos sus receptores sin su coagonista clásico, podrían estar generalizando su respuesta.

Los resultados duales del efecto de la dapsona en la INMDA en ausencia de glicina sugieren que la dapsona podría tener una mayor afinidad en la subunidad GluN1 y así funcionar como un modulador alostérico positivo o negativo dependiendo del arreglo estequiométrico y concentración utilizada, donde a concentraciones nM hay una mayor potenciación a diferencia de concentraciones μ M.

8.2. Efecto de la ACh 10 nM

Se ha establecido a la glicina como un coagonista para la activación del NMDAR al unirse en la subunidad GluN1 sin importar la composición de subunidades, la localización celular o las propiedades biofísicas, sin embargo, se ha demostrado que la D-serina puede actuar como un coagonista preferencial para el subconjunto de NMDAR en diferentes áreas del cerebro (Mothet, Le Bail, & Billard, 2015).

Este tipo de hallazgos demuestra el inicio de nuevas perspectivas, y propuestas donde la glicina, la serina e incluso nuevos aminoácidos, moléculas y neurotransmisores pueden ser capaces de regular la función del NMDAR, surgiendo así investigaciones

con perspectivas en los efectos de los distintos arreglos del receptor para ciertas enfermedades donde los coagonistas puedan intervenir en disminuir los efectos relacionados al receptor.

Es por lo anterior que en el laboratorio de neuromodulación se ha estudiado el efecto de la Acetilcolina en la INMDA de acuerdo con el primer reporte de que la ACh podría unirse al sitio del coagonista en la subunidad, observando que al aplicarla en concentración 10 μM en neuronas aisladas, hay una potenciación de la INMDA sin la necesidad del coagonista. (Islas, y otros, 2022).

Por lo que buscar el efecto que tiene la acetilcolina no solo como neurotransmisor, sino como un ligando en el NMDAR es relevante como una molécula potencial para el posible tratamiento de ciertas enfermedades pues diversos estudios reportan que una disfunción en el sistema colinérgico conlleva al desarrollo de Alzheimer, por lo que uno de los principales tratamientos se centra en inhibir a la acetilcolinesterasa para aumentar tanto la biodisponibilidad como la concentración de este neurotransmisor (Hampel, y otros, 2018).

Nuestros resultados demuestran que la acetilcolina puede tener un efecto de modulador alostérico negativo en dapsona 1 nM al disminuir la potenciación de la corriente y un efecto de modulador alostérico positivo en 100 nM y 1 μM al incrementar la INMDA (Grafica 3) a diferencia de solo aplicar la dapsona (Gráfica 2).

Lo anteriormente descrito se relacionaría con que la dapsona podría actuar sobre el sitio en la subunidad GluN1 de manera similar que la ACh, por lo que una baja concentración de dapsona actúa de forma competitiva, reduciendo la corriente, sin embargo, a concentraciones mayores podría unirse a más de un sitio alostérico, exponiendo otros sitios de modulación del receptor que permitan la potenciación de la corriente en presencia de ACh.

Por otra parte, la dapsona también podría estar estabilizando la interacción de la ACh en el canal, por lo que aumenta la actividad de este. Pese a que la ACh ni la dapsona tienen una estructura similar al coagonista, existen algunos estudios que plantean que no debe existir una restricción por el tamaño molecular para tratar de establecer una

interacción con las subunidades del receptor con los sitios de unión que existen en el receptor (Monahan, y otros, 1990) pues se han logrado identificar algunos compuestos de mayor tamaño que pueden lograr la selectividad de la selectividad de subunidades entre los agonistas del NMDAR del sitio de glicina (Maolanon, y otros, 2017).

Es por esto, que se podría sugerir que el efecto modulador alostérico tanto positivo como negativo e incluso competitivo dependiendo de la concentración de acetilcolina esté relacionado con la subunidad GluN1 ya que, se estableció como sitio de unión para la dapsona al haber aplicado 5, 7-DCK 10 μ M en presencia de dapsona 1 μ M y no registrar ninguna corriente (Gómez-Gómez, 2018).

La relevancia en analizar el efecto de la dapsona a diferentes concentraciones en ausencia de glicina y con acetilcolina nos permite comenzar a comprender su función y mecanismo de regulación sobre el NMDAR para seguir proponiéndolo como un fármaco neuroprotector, así como destacar sus posibles efectos coagonistas que podrían generar una mejor respuesta para el NMDAR dependiendo del tipo de actividad en el que se enfoque.

9. Conclusiones.

- El efecto modulador de dapsona a diferentes concentraciones en el rango μM -nM sobre la corriente de NMDA es dual.
- La dapsona a una concentración 1 nM en ausencia de glicina tiene una mayor potenciación de la INMDA.
- La dapsona a una 3 μM en ausencia de glicina tiene una menor potenciación.
- El efecto potenciador de la dapsona se ajustó a una ecuación de Hill con una $EC_{50} \sim 9.49 \text{ E-}8$.
- La acetilcolina a una concentración 10 nM en conjunto con la dapsona en ausencia de glicina:
 - Activa la INMDA, indicando que ambos podrían tener su sitio de unión en la subunidad GluN1.
 - Aumenta la potenciación a concentraciones 100 nM y 1 μM .
 - Disminuye la potenciación en 1 nM.

10. Bibliografía

- Ahmed, H., Haider, A., & Ametamey, S. (Oct de 2020). N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor modulators: a patent review (2015-present). *Expert Opin Ther Pat*, 30(10), 743-767. doi:10.1080/13543776.2020.1811234
- Amaral, D., & Strick, P. (2013). The Organization of the Central Nervous System. En E. Kandel, J. Schwartz, T. Jessell, S. Siegelbaum, & A. Hudspeth, *Principles of neural sciences* (5th ed., págs. 337-354). Mc Graw Hill.
- Arslan, O. (2016). Computational Basis of Neural Elements. En A. Press, *Artificial Neural Network for Drug Design, Delivery and Disposition* (págs. 29-82). Elsevier .
- Bekkers, J. (20 de Dec de 2011). Pyramidal neurons. *Curr Biol*, 21(24). doi:10.1016/j.cub.2011.10.037
- Binvignat, O., & Olloquequi, J. (2020). Excitotoxicity as a Target Against Neurodegenerative Processes. *Curr Pharm Des*, 26(12), 1251-1262. doi:10.2174/1381612826666200113162641
- BRAIN Initiative Cell Census Network (BICCN). (6 de Oct de 2021). A multimodal cell census and atlas of the mammalian primary motor cortex. *Nature*, 598(7879), 86-102. doi:https://doi.org/10.1038/s41586-021-03950-0
- Burnell, E., Irvine, M., Fang, G., Sapkota, K., Jane, D., & Monaghan, D. (Jan de 2019). Positive and Negative Allosteric Modulators of N-Methyl-d-aspartate (NMDA) Receptors: Structure-Activity Relationships and Mechanisms of Action. *J Med Chem*, 62(1), 3-23. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01640
- Cechetto, D., & Topolovec, J. (2002). Cerebral Cortex. *Encyclopedia of the Human Brain*, 663-679. doi:https://doi.org/10.1016/B0-12-227210-2/00087-X
- Chaffey, H., & Chazot, P. (August de 2008). NMDA receptor subtypes: Structure, function and therapeutics. *Current Anaesthesia & Critical Care*, 19(4), 183-201. doi:https://doi.org/10.1016/j.cacc.2008.05.004
- Chamorro, Á., Lo, E., van Leyen, K., & Lyden, P. (Feb de 2021). The future of neuroprotection in stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 92(2). doi:10.1136/jnnp-2020-324283
- Diaz-Ruiz, A., Nader-Kawachi, J., Calderón-Estrella, F., Mata-Bermudez, A., Alvarez-Mejía, L., & Ríos, C. (Jan de 2022). Dapsone, More than an Effective Neuro and Cytoprotective Drug. *Curr Neuropharmacol*, 20(1), 194-210. doi:10.2174/1570159X19666210617143108
- Diaz-Ruiz, A., Roldan-Valadez, E., Ortiz-Plata, A., Mondragón-Lozano, R., Heras-Romero, Y., Mendez-Armenta, M., . . . Ríos, C. (Sep de 2016). Dapsone improves functional deficit and diminishes brain damage evaluated by 3-Tesla magnetic resonance image after transient cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Brain Res*, 1646, 384-392. doi:10.1016/j.brainres.2016.06.023
- Diaz-Ruiz, A., Salgado-Ceballos, H., Montes, S., Guizar-Sahagún, G., Gelista-Herrera, N., Mendez-Armenta, M., . . . Ríos, C. (Mar de 2011). Delayed administration of dapsone protects from tissue damage and improves recovery after spinal cord injury. *J Neurosci Res*, 89(3), 373-80. doi:10.1002/jnr.22555

- Durham, R., Paudyal, N., Carrillo, E., Bhatia, N., Maclean, D., Berka, V., . . . Jayaraman, V. (2020). Conformational spread and dynamics in allostery of NMDA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(7), 3839-3847. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1910950117>
- E Lind, G., Mou, T.-C., Tamborini, L., Pomper, M., De Micheli, C., Conti, . . . Hansen, K. (15 de Aug de 2017). Structural basis of subunit selectivity for competitive NMDA receptor antagonist with preference for GluN2A over GluN2B subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(33), E6942-E6951. doi:[10.1073/pnas.1707752114](https://doi.org/10.1073/pnas.1707752114)
- Elliott, M., Jacobson, S., & Sabin, T. (2014). Cerebral Cortex: Cytoarchitecture, Physiology, and Overview of Functional Localization. En *Integrated Neuroscience and Neurology: A Clinical Case History Problem Solving Approach*. New York: Oxford Academic. doi:<https://doi.org/10.1093/med/9780199744435.003.0017>
- Feldmeyer, D. (2015). Functional and Structural Diversity of Pyramidal Cells. *Brain Mapping An Encyclopedic Reference*, *2*, 65-68. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397025-1.00201-3>
- Flores-Hernandez, J., Salgado, H., De la Rosa, V., Avila-Ruíz, T., Torres-Ramirez, O., Lopez-Lopez, G., & Atzori, M. (Apr de 2009). Cholinergic direct inhibition of N-methyl-D aspartate receptor-mediated currents in the rat neocortex. *Synapse*, *63*(4), 308-18. doi:[10.1002/syn.20609](https://doi.org/10.1002/syn.20609)
- Flores-Soto, M., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vázquez-Valls, E., González-Castañeda, R., & Beas-Zarate, C. (2012). Structure and function of NMDA-typer glutamate receptor subunits. *Neurología (English Edition)*, *27*(5), 301-310. doi: [10.1016/j.nrleng.2011.10.003](https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2011.10.003)
- France, G., Volianskis, R., Ingram, R., Bannister, N., Rothärmel, R., Irvine, M., . . . Volianskis, A. (Jan de 2022). Differential regulation of STP, LTP and LTD by structurally diverse NMDA receptor subunit-specific positive allosteric modulators. *Neuropharmacology*, *202*(108840). doi:[10.1016/j.neuropharm.2021.108840](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108840)
- Fröhlich, F. (2016). Microcircuits of the Neocortex. En *Network Neuroscience* (págs. 85-95). ACADEMIC PRESS. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801560-5.00007-0>
- García-Palafox, A., Flores-Hernández, J., & Torres-Ramírez, O. (Junio de 2021). Efecto de los metabolitos de dapsona sobre la corriente activada por NMDA en neuronas piramidales de las capas V y VI de la corteza motora primaria de la rata. *Tesis de maestría Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*.
- García-Pastor, C., Navarro-García de Llano, J., Balcázar-Padrón, J., Tristán López, L., Ríos, C., Díaz-Ruiz, A., . . . Nathal, E. (Mar de 2022). Neuroprotective effect of dapsone in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Neurosurgical focus*, *52*(3). doi:<https://doi.org/10.3171/2021.12.FOCUS21663>
- Gerstner, W., Kistler, W., Naud, R., & Paninski, L. (2014). Neuronal Populations. En *Neuronal Dynamics From single neurons to networks and models of cognition*. Cambridge University Press. Obtenido de <https://neurondynamics.epfl.ch/online/Ch12.S1.html>

- Ghaoui, N., Hanna, E., Abbas, O., Kibbi, A.-G., & Kurban, M. (Jul de 2020). Update on the use of dapsone in dermatology. *Int J Dermatol*, *59*(7), 787-795. doi:10.1111/ijd.14761
- Gómez-Gómez, V., & Valente-Flores-Hernández, J. (Nov de 2018). El papel de las subunidades GluN1 y GluN2C/D en la acción neuroprotectora de la dapsona en las capas V y VI de la corteza motora primaria de rata [tesis de maestría]. *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*.
- Hampel, H., Mesulam, M., Cuello, A., Farlow, M., Giacobini, E., Grossberg, G., . . . Khachaturian, Z. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain: a journal of neurology*, *141*(7), 1917-1933. doi:https://doi.org/10.1093/brain/awy132
- Hansen, K., Feng, Y., Perszyk, R., Furukawa, H., Wollmuth, L., Gibb, A., & Traynelis, S. (2018). Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J. Gen. Physiol*, *150*(8), 1081-1105. doi:10.1085/jgp.201812032
- Hanson, J., Yuan, H., Perszyk, R., Banke, T., Xing, H., Tsai, M.-C., . . . Traynelis, S. (Jan de 2024). Therapeutic potential of N-methyl-D-aspartate receptor modulators in psychiatry. *Neuropsychopharmacology*, *49*(1). doi:10.1038/s41386-023-01614-3
- Hardingham, G., & Bading, H. (Oct de 2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*, *11*(10), 682-96. doi:10.1038/nrn2911
- Haupt, M., Gerner, S., Bähr, M., & Doeppner, T. (Feb de 2023). Neuroprotective Strategies for Ischemic Stroke-Future Perspectives. *Int J Mol Sci*, *24*(5). doi:10.3390/ijms24054334
- Information, N. C. (2023). Obtenido de PubChem Compound Summary for CID 187, Acetylcholine: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/187>
- Information, N. C. (2023). Obtenido de PubChem Compound Summary for CID 2955, Dapsone: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2955>
- Islas, Á., Scior, T., Torres-Ramirez, O., Salinas-Stefanon, E., Lopez-Lopez, G., & Flores-Hernández, J. (Jan de 2022). Computational Molecular Characterization of the Interaction of Acetylcholine and the NMDA Receptor to Explain the Direct Glycine-Competitive Potentiation of NMDA-Mediated Neuronal Currents. *ACS Chem Neurosci*, *13*(2), 229-244. doi:10.1021/acchemneuro.1c00639
- Jespersen, A., Tajima, N., Fernandez-Cuervo, G., Garnier-Amblard, E., & Furukawa, H. (Jan de 2014). Structural insights into competitive antagonism in NMDA receptors. *Neuron*, *81*(2), 366-78. doi:10.1016/j.neuron.2013.11.033
- Johnns, P. (2014). Neurons and glial cells. En *Clinical Neuroscience* (págs. 61-69). En Elsevier ebooks. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-443-10321-6.00005-9
- Johnson, J., & Ascher, P. (Feb de 1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 529-31. doi:10.1038/325529a0
- Kenakin, T. (2012). Allosteric Drug Effects. En *Pharmacology in Drug Discovery* (págs. 81-103). doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384856-7.00005-7

- Khalilzadeh, M., Shayan, M., Jourian, S., Rahimi, M., Sheibani, M., & Dehpour, A. (Dec de 2022). A comprehensive insight into the anti-inflammatory properties of dapsone. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 395(12), 1509-1523. doi:10.1007/s00210-022-02297-1
- Knierim, J. (2020). (U. T. School, Productor) Recuperado el 30 de 03 de 2023, de Neuroscience Online an electronic textbook for the neurosciences: <https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/m/s3/chapter03.html>
- Kurien, G., Jamil, R., & Preuss, C. (Mar de 2023). Dapsone. In *StatPearls*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470552/>
- Lau, A., & Tymianski, M. (Jul de 2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch*, 460(2), 525-542. doi:10.1007/s00424-010-0809-1
- Liu, Y., Wong, T., Aarts, M., Rooyackers, A., Liu, L., Lai, T., . . . Wang, Y. (14 de Mar de 2007). NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci*, 27(11). doi:10.1523/JNEUROSCI.0116-07.2007
- Llansola, M., Sanchez-Perez, A., Cauli, O., & Felipo, V. (2005). Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. 1. Properties of the NMDA receptor that modulate its function. *Cerebellum*, 4(3), 154-61. doi:10.1080/14734220510007996
- Mahalakshmi, B., Maurya, N., Lee, S.-D., & Kumar, V. (Aug de 2020). Possible Neuroprotective Mechanisms of Physical Exercise in Neurodegeneration. *Int Mol Sci*, 21(16). doi:10.3390/ijms21165895
- Mahale, A., Kumar, R., Sarode, L., Gakare, S., Prakash, A., & Ugale, R. (Aug de 2020). Dapsone prolong delayed excitotoxic neuronal cell death by interacting with proapoptotic/survival signaling proteins. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 29(8). doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104848
- Maolanon, A., Risgaard, R., Wang, S.-Y., Snoep, Y., Papangelis, A., Holley, D., . . . Clausen, R. (Aug de 2017). Subtype-Specific Agonist for NMDA Receptor Glycine Binding Sites. *ACS Chem Neurosci*, 8(8), 1681-1687. doi:10.1021/acschemneuro.7b00117
- Mata-Bermudez, A., Diaz-Ruiz, A., Burelo, M., García-Martínez, B., Jardón-Guadarrama, G., Calderón-Estrella, F., . . . Rios, C. (Oct de 2021). Dapsone Prevents Allodynia and Hyperalgesia and Decreased Oxidative Stress After Spinal Cord Injury in Rats. *Spine (Phila Pa 1976)*, 46(19). doi:10.1097/BRS.0000000000004015
- Mayer, M., Vyklicky Jr., L., & Clements, J. (1989). Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. *Nature*, 338(6214), 425-427. doi:10.1038/338425a0
- MeSH. (2016). *National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=neuroprotection>
- Molnár, Z. (2013). Chapter 7 - Cortical Columns. En R. P. Rubenstein J. L. R., *Neuronal Circuit Development and Function in the Brain Comprehensive Developmental Neuroscience* (págs. 109-129). ACADEMIC PRESS. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397267-5.00137-0>

- Monaghan, D., Irvine, M., Costa, B., Fang, G., & Jane, D. (Sep de 2012). Pharmacological modulation of NMDA receptor activity and the advent of negative and positive allosteric modulators. *Neurochem Int*, 61(4). doi:10.1016/j.neuint.2012.01.004
- Monahan, J., Hood, W., Compton, R., Cordi, A., & Williams, R. (Dec de 1990). Identification of a novel structural class of positive modulators of the N-methyl-D-aspartate receptor, with actions mediated through the glycine recognition site. *Eur J Pharmacol*, 189(6). doi:10.1016/0922-4106(90)90034-u
- Mothet, J.-P., Le Bail, M., & Billard, J.-M. (Oct de 2015). Time and space profiling of NMDA receptor co-agonist functions. *J Neurochem*, 135(2), 210-25. doi:10.1111/jnc.13204
- Nader-Kawachi, J., Góngora-Rivera, F., Santos-Zambrano, J., Calzada, P., & Rios, C. (April de 2007). Neuroprotective effect of dapsone in patients with acute ischemic stroke: a pilot study. *Neurol Res*, 29(3).
- Nestler, E., Hyman, S., Holtzman, D., & Malenka, R. (2017). Aminoácidos excitadores e inibidores. En *Neurofarmacología molecular*. Obtenido de <https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?bookid=2187§ionid=165241168>
- Paoletti, P., & Neyton, J. (Feb de 2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*, 7(1). doi:10.1016/j.coph.2006.08.011
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (Jun de 2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, 14(6), 383-400. doi:10.1038/nrn3504.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2018). *The Rat Brain in stereotaxic coordinates* (4th ed.).
- Perszyk, R., Zheng, Z., Banke, T., Zhang, J., Xie, L., McDaniel, M., . . . Traynelis, S. (May de 2021). The Negative Allosteric Modulator EU1794-4 Reduces Single-Channel Conductance and Ca²⁺ Permeability of GluN1/GluN2A N-Methyl-d-Aspartate Receptors. *Mol Pharmacol*, 99(5). doi:10.1124/molpharm.120.000218
- Piccioto, M., Higley, M., & Mineur, Y. (Oct de 2012). Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron*, 76(1). doi:10.1016/j.neuron.2012.08.036
- Purves, D., Augustine, G., & Fitzpatrick, D. (2001). Functional Organization of the Primary Motor Cortex. En P. D, *Neuroscience* (2nd edition ed.). Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11095/>
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., & et al. (2001). Acetylcholine. En *Neuroscience* (2 ed.). Recuperado el 17 de Enero de 2024, de National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11143/>
- Ríos, C., Orozco-Suarez, S., Salgado-Ceballos, H., Mendez-Armenta, M., Nava-Ruiz, C., Santander, I., . . . Diaz-Ruiz, A. (Jun de 2015). Anti-Apoptotic Effects of Dapsone After Spinal Cord Injury in Rats. *Neurochem Res*, 40(6), 1243-51. doi:10.1007/s11064-015-1588-z

- Rios, C., Altagracia, M., Nader, K., Kravsov, J., Metropolitana, U., & De Neurologia, Y. (22 de Julio de 2003). *Google Patents*. Obtenido de <https://patents.google.com/patent/WO2005007239B1/es>
- Sam, C., & Bordoni, B. (2023). Recuperado el 17 de enero de 2024, de Physiology, Acetylcholine.: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557825/>
- Sam, C., & Bordoni, B. (2022). Recuperado el 24 de 04 de 2023, de StatPearls Publishing: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557825/>
- Shayesteh, S., Khalilzadeh, M., Takzaree, N., & Dehpour, A. (Dec de 2022). Dapsone improves the vincristine-induced neuropathic nociception by modulating neuroinflammation and oxidative stress. *Daru*, *30*(2), 303-310. doi:10.1007/s40199-022-00448-6
- Shen, Z., Xiang, M., Chen, C., Ding, F., Wang, Y., Shang, C., . . . Cui, X. (Jul de 2022). Glutamate excitotoxicity: Potential therapeutic target for ischemic stroke. *Biomed Pharmacother*, *151*(113125). doi:10.1016/j.biopha.2022.113125
- Stroebel, D., Mony, L., & Paoletti, P. (Aug de 2021). Glycine agonism in ionotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, *193*(108631). doi:10.1016/j.neuropharm.2021.108631
- Strong, K., Jing, Y., Prosser, A., Traynelis, S., & Liotta, D. (Dec de 2014). NMDA receptor modulators: an update patent review (2013-2014). *Expert Opin Ther Pat*, *24*(12). doi:10.1517/13543776.2014.972938
- Takata, Y., Nakagawa, H., Ninomiya, T., Yamanaka, H., & Takada, M. (Feb de 2021). Morphological features of large layer V pyramidal neurons in cortical motor-related areas of macaque monkeys: analysis of basal dendrites. *Sci Rep*, *11*(4171). doi:10.1038/s41598-021-83680-5
- Tovar, K., & Westbrook, G. (Jan de 2017). Modulating synaptic NMDA receptors. *Nuropharmacology*, *112*(PtA). doi:10.1016/j.neuropharm.2016.08.023
- Traynelis, S., Wollmuth, L., McBain, C., Menniti, F., Vance, K., Ogden, K., . . . Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*, *62*(3), 405-496. doi:<https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
- UNAM, F. d. (s.f.). Recuperado el 05 de Abril de 2023, de <http://www.facmed.unam.mx/Libro-NeuroFisio/08b-CerebroOrg/CortezaOrg.html>
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., . . . Vyklicky, L. (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res*, *63*, 191-203. doi:10.33549/physiolres.932678
- Wyllie, D., & Bowie, D. (Jan de 2022). Ionotropic glutamate receptors: structure, function and dysfunction. *J Physiol*, *600*(2). doi:10.1113/JP282389
- Yao, L., & Zhou, Q. (Jan de 2017). Enhancing NMDA Receptor Function: Recent Progress on Allosteric Modulators. *Neural Plast*, *2017*(2875904). doi:10.1155/2017/2875904
- Yip, D., & Lui, F. (2022). *Physiology, Motor Cortical*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542188/>

- Yu, A., & Lau, A. (Jul de 2018). Glutamate and glycine binding to the NMDA receptor. *Structure*, 26(7), 1035-1043. doi:10.1016/j.str.2018.05.004
- Zeilhofer, H., Studler, B., Arabadzisz, D., Schweizer, C., Ahmadi, S., Layh, B., . . . Fritschy, J.-M. (2004). Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *Journal of Comparative Neurology*, 482(2), 123-141. doi:https://doi.org/10.1002/cne.20349
- Zhou, X., Chen, Z., Yun, W., Ren, J., Li, C., & Wang, H. (Aug de 2015). Extrasynaptic NMDA Receptor in Excitotoxicity: Function Revisited. *Neuroscientist*, 21(4). doi:10.1177/1073858414548724
- Zhou, X., Ding, Q., Chen, Z., Yun, H., & Wan, H. (Aug de 2013). Involvement of the GluN2A and GluN2B subunits in synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptor function and neuronal excitotoxicity. *J Biol Chem*, 288(33). doi:10.1074/jbc.M113.482000

11. Anexos.

11.1. Oficio de la aprobación del protocolo por el CICUAL.

Oficio VIEP/DGI/1361/2024

Dr. Jorge Flores Hernández
Instituto de Fisiología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Por este medio, y después de haber verificado que usted es miembro del Padrón de Investigadores de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado y que su protocolo ha sido evaluado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), me permito informarle que se autoriza la solicitud de animales de acuerdo al cronograma adjunto, mismos que serán utilizados para la realización de los experimentos que se requieran llevar a cabo dentro el protocolo de investigación con clave: 100317188-UALVIEP-24/2 titulado "Efecto de la acetilcolina sobre la modulación de la corriente de NMDA por dapsona en ausencia de glicina en neuronas piramidales de la corteza motora primaria", el cual tiene como equipo de trabajo a:

Responsable: Dr. Jorge Luis Valente Flores Hernández - I.D. 100317188 - Instituto de Fisiología - BUAP
Colaboradora Investigadora:
M. en C. Erika Lorena Arroyo Ríos - ID 100518899 - Instituto de Fisiología
Estudiante participante: Eunice del Refugio Ruiz González - alumna de la Lic. en Biomedicina - ID. 201806734

Cabe hacer mención que los animales objeto de este estudio serán criados y mantenidos en las instalaciones del Bioterio "Claude Bernard" de acuerdo a los lineamientos establecidos en la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio", a las especificaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y a la Legislación Mexicana relativa vigente, debiendo ser aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, el cual le otorgará una clave que deberá usar.

De igual manera se hace constar que el protocolo ha sido avalado por el C.I.C.U.A.L. de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por lo que se le solicita aplicar todos los esfuerzos encaminados a minimizar el sufrimiento y la cantidad de animales a utilizar en el proyecto, así como los criterios de manejo, anestesia, analgesia y eutanasia vigentes.

Atentamente,
"Pensar Bien, Para Vivir Mejor"
H. Puebla de Z., a 7 de mayo de 2024

Dra. Rosario Hernández Huesca
Directora General de Investigación

c.c.p. MVZ. Francisco Ramos Collazo.- Director del Bioterio "Claude Bernard".- psc.- Presente.-
c.c.p. Archivo

D"RHH/gpe"

Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado | Torre de Gestión Académica y Servicios Administrativos, piso 6.
Avenida Central, Ciudad Universitaria.
Puebla, Pue. C.P. 72570
Teléfonos: 229 55 00 Ext. 5720, 5621

11.2. *Tablas análisis estadísticos.*

11.2.1. *Aplicación de dapsona en ausencia de glicina.*

4Tabla 1. Comparación múltiple por pares de la post prueba de Dunn en las concentraciones de dapsona en ausencia de glicina.

[Dapsona]		Diferencia de rangos	Q	P<0.05
1 nM	3 μ M	70.267	4.075	Sí
	10 μ M	61.205	3.797	Sí
	1 μ M	59.967	3.478	Sí
	300 nM	47.467	2.753	No
30 nM	3 μ M	62.252	4.081	Sí
	10 μ M	53.191	3.807	Sí
	1 μ M	51.952	3.406	Sí
10 nM	3 μ M	49.247	3.069	No

11.2.2. *Aplicación de las concentraciones de dapsona con ACh 10 nM en ausencia de glicina.*

Tabla 2. Comparación múltiple por pares de la post prueba de Dunn de la ACh 10 nM con dapsona 1 μ M, 100 y 1 nM en ausencia de glicina.

[Dapsona] + ACh 10 nM		Diferencia de rangos	Q	P<0.05
100 nM	1 nM	13.117	3.168	Sí
	1 μ M	10.291	2.436	Sí
1 nM	1 μ M	2.826	0.700	No