



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neuromodulación



**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 PARA OBTENER EL GRADO EN:
MAESTRÍA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

Presenta:

M.C. Alejandro David Garcia Palafox

Director de tesis:

D.C. Jorge Luis Valente Flores Hernández

Co-Director de tesis:

D.C. Oswaldo Torres Ramírez

Revisores:

D.C. Elías Manjarrez Lopez

D.C. María del Rosario Vega y Saenz de Miera.

Puebla, Puebla. Junio 2021

Índice

1. Resumen	9
2. Introducción	11
3. Corteza cerebral	12
3. Corteza motora.....	14
4. Glutamato	15
5. Receptor NMDA	16
6. Excitotoxicidad.....	20
7. Neuroprotección	22
8. Dapsona	23
9. Historia de Dapsona como neuroprotector	26
10. Enfermedad Vascul ar Cerebral	28
11. Justificación	29
12. Pregunta de investigación	30
13. Hipótesis.....	31
14. Objetivos	31
14.1. General	31
14.2. Particulares	31
15. Metodología.....	31
16. Análisis estadístico	35
17. Resultados.....	36
18. Discusión	51
19. Bibliografía.....	53

Índice de figuras y tablas

Fig. 1: Disposición celular de las capas de la corteza.....	13
Fig. 2: Estructura del receptor de NMDA	18
Fig. 3: Representación esquemática del receptor de NMDA.....	19
Fig.4: Expresión y propiedades funcionales del receptor NMDA	20
Fig. 5: Representación esquemática de apoptosis.....	22
Fig. 6: Estructura molecular de dapsona	23
Fig. 7: Curva dosis-respuesta de dapsona	28
Fig. 8: Micrografías Neuronales	36
Fig. 9: Rampa de voltaje	37
Fig. 10: Esquema representativo Hidroxilaminadapsona.....	37
Fig. 11: Esquema Hidroxilaminadapsona 100µM.....	38
Fig. 12: Esquema Hidroxilaminadapsona 30µM.....	39
Fig. 13: Esquema Hidroxilaminadapsona 10µM.....	39
Fig. 14: Esquema Hidroxilaminadapsona 3µM.....	40
Fig. 15: Esquema Hidroxilaminadapsona 1µM.....	40
Fig. 16: Curva dosis-respuesta hidroxilaminadapsona	41
Fig. 17: Rampa de voltaje	42
Fig. 18: Esquema representativo Monoacetildapsona	42
Fig. 19: Esquema Monoacetildapsona 100µM.....	43
Fig. 20: Esquema Monoacetildapsona 30µM.....	44
Fig. 21: Esquema Monoacetildapsona 10µM.....	44
Fig. 22: Esquema Monoacetildapsona 3µM.....	45
Fig. 23: Esquema Monoacetildapsona 1µM.....	45

Fig. 24: Esquema Monoacetildapsona 500 η M.....	46
Fig. 25: Esquema Monoacetildapsona 300 η M.....	46
Fig. 26: Esquema Monoacetildapsona 100 η M.....	47
Fig. 27: Esquema Monoacetildapsona 30 η M.....	47
Fig. 28: Esquema Monoacetildapsona 10 η M.....	48
Fig. 29: Esquema Monoacetildapsona 3 η M.....	48
Fig. 30: Esquema Monoacetildapsona 1 η M.....	49
Fig. 31: Curva dosis respuesta monoacetildapsona	50
Fig. 32: Diferencia de comportamiento sigmoide	51

Abreviaturas

μ M = Micromolar

μ m = Micrometro

A1 /Amin= Efecto mínimo

A2 /Amax= Efecto máximo

ADP = Adenosín difosfato

AINE´s = Antiinflamatorios no esteroideos

AMS = Corteza motora suplementaria (por sus siglas en inglés)

APV = Ácido 2 – Amino – 5 – fosfonovaleriánico

ARNm = Ácido ribonucleico mensajero

ATP = Adenosín trifosfato

BUAP = Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

C = Carboxilo

Ca²⁺ = Ion calcio

CaCl₂ = Cloruro de calcio

CsCl = Cloruro de cesio

DCT = Dominio carboxilo terminal

DDS-NOH = Dapsona hidroxilamina

D.U. = Dosis única

DUL = Dominio de unión para ligando

DNT = Dominio amino terminal¹³

DQP-1105 = 4-(5-(4-bromofenil)-3-(6-metil-2-oxo-4-fenil-1,2-dihidroquinolin-3-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)-4-oxobutanoico

E14 = Día embrionario 14

E17 = Día embrionario 17

E19 = Día embrionario 19

EBSS = Solución Salina Balanceada de Earl (por sus siglas en inglés)

EEAT1-5 = Transportador de aminoácidos excitadores 1 - 5

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

ESM = Error estándar de la media

EVC = Evento vascular cerebral

FDA = Federación Americana de Drogas (siglas en inglés)

g = Gramo

g/ml = Gramo/mililitro

GluA = Prefijo para subunidades de AMPA (α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol)

GluK = Prefijo para subunidades de Kainato (Ácido kaínico)

GluN = Prefijo para subunidades de NMDA (N-Metil-D-Aspártato)

GluN1 = Subunidad 1 del receptor de NMDA

GluN2 = Subunidad 2 del receptor de NMDA
GluN2A = Subunidad 2A del receptor de NMDA
GluN2B = Subunidad 2B del receptor de NMDA
GluN2C = Subunidad 2C del receptor de NMDA
GluN2D = Subunidad 2D del receptor de NMDA
GluN3 = Subunidad 3 del receptor de NMDA
GluN3A = Subunidad 3A del receptor de NMDA
GluN3B = Subunidad 3B del receptor de NMDA 14
HBSS = Solución Salina Balanceada de Hanks (por sus siglas en inglés)
I/R = Isquemia/Reperusión
iGluRs = Receptores ionotrópicos de glutamato
k = Constante de Michaelis
K⁺ = Ion potasio
KCl = Cloruro de potasio
LTME = Lesión traumática de médula espinal
LOG₁₀ /x₀ = Concentración efectiva 50 (Centro)
M1 = Corteza motora primaria
M1–M4 = Región transmembrana (1–4)
MADDs = Monoacetildapsona
Met–Hb = Metahemoglobina
Mg²⁺ = Ion magnesio
MgCl₂ = Cloruro de magnesio
mGluR1 = Receptores metabotrópicos de glutamato tipo 1
mGluR2 = Receptores metabotrópicos de glutamato tipo 2

mGluR3 = Receptores metabotrópicos de glutamato tipo 3

mGluR4 = Receptores metabotrópicos de glutamato tipo 4 15

mGluR5 = Receptores metabotrópicos de glutamato tipo 5

mGluRs = Receptores metabotrópicos de glutamato

MPO = Mieloperoxidasa

n = Sitios cooperativos

N = Amino terminal

Na⁺ = Ion sodio

NaOH = Hidróxido de sodio

INMDA = Corriente activada por NMDA

NMDAR = Receptor de NMDA

NMDA = N – Metil – D – Aspártico

NOM = Norma Oficial Mexicana

p = Pendiente de la curva

PLC = Fosfolipasa C

PO₄⁻ = Ion fosfato

SNC = Sistema nervioso central

TCN-201 = 3-cloro-4-fluoro-N – [(4 – [(2– (fenil carbonil) hidrazina) carbonil] fenil) metil] bencenosulfonamida

VGLUT1 = Transportador de glutamato para vesícula tipo 1

VGLUT2 = Transportador de glutamato para vesícula tipo 2

VGLUT3 = Transportador de glutamato para vesícula tipo 3

V_{max} = Velocidad Máxima

x = Valor de la concentración

Agradecimientos especiales.

A mi familia le dedico esta tesis, a mi madre que siempre me ha apoyado, mi hermana y mi abuela principalmente, quienes fueron un pilar para mi desarrollo. A mi padre, mis tíos y primos quienes pertenecen a mi familia nuclear. A mis amigos, principalmente a mi profesor que estuvo siempre a mi lado ayudándome, enseñándome la técnica y siendo mi amigo, mi maestro y mi guía, mi técnico de laboratorio que igualmente ha sido mi amiga, y maestra. Finalmente, a mis compañeros de la maestría y mis amigos que me acompañaron en este viaje y desde antes.

1. Resumen

En la actualidad se ha ampliado el uso de la dapsona como un fármaco neuroprotector, sin embargo, ha sido utilizada principalmente para enfermedades dermatológicas. El mecanismo de acción por el cual ejerce esta acción aún no es del todo claro, pero se han planteado diferentes propuestas por las que lleva a cabo este efecto, siendo una de estas propuestas la que postula que es por medio del receptor de NMDA (NMDAR), debido a que este receptor permite la entrada de Ca^{2+} a la célula, la cual en exceso provoca excitotoxicidad. Esto llevo a investigar el efecto de dapsona sobre este receptor, encontrando que dapsona disminuye la corriente activada por NMDA (INMDA), efecto que no es voltaje-dependiente, además hay una recuperación de la corriente después de la aplicación del fármaco y esta acción no la ejerce por medio de las subunidades GluN2A o GluN2B del receptor, sino que se ve que el efecto es mediado por las subunidades GluN1. Con base en los antecedentes de este proyecto, se planteó como objetivo evaluar el efecto de los metabolitos de dapsona (Monoacetildapsona e hidroxilaminadapsona) sobre la INMDA de las neuronas piramidales de las capas V y VI de la corteza motora de rata. Para lograr estos objetivos se utilizaron ratas macho Wistar de 30 días, con un peso de 100 a 120g. Se obtuvieron rebanadas coronales de $350\mu\text{m}$ de grosor de la corteza motora primaria y se separaron las capas V y VI, para poder realizar un proceso enzimático con papaína al tejido obtenido y efectuar una disociación mecánica y así proceder a realizar el registro electrofisiológico con la técnica de fijación de voltaje en célula completa de las neuronas obtenidas. Los resultados obtenidos en el primer objetivo de este trabajo mostraron que monoacetildapsona produce una disminución máxima del pico de la corriente de $-25.03 \pm 2.28 \%$. Además, la concentración más baja utilizada que fue monoacetildapsona 1nM tiene un efecto casi nulo de disminución de la corriente al pico de $4.28 \pm 1.60\%$. Posteriormente en el segundo objetivo, se realizó la aplicación hidroxilaminadapsona que produce una disminución máxima del pico de la corriente de $38.48 \pm 12.68\%$. Además, la concentración más baja utilizada que fue hidroxilaminadapsona $1\mu\text{M}$ tiene un efecto de disminución de la corriente al pico de

-13.66 ± 11.10 %. Por otra parte, se asume en este trabajo que los metabolitos actúan en la misma subunidad que los antecedentes mencionan como la unidad que tiene la interacción con la dapsona (GluN1), por lo que, en futuros estudios, sería ideal la confirmación de la participación de la misma subunidad con los metabolitos de dapsona y poder así comparar de manera más precisa, las diferencias que en este trabajo se presentan. En conclusión, los metabolitos de dapsona disminuyen la INMDA en forma dosis dependiente y este efecto se lleva a cabo probablemente en el sitio de unión glicina en la subunidad GluN1 del NMDAR, finalmente como conclusión parcial, los metabolitos de dapsona tienen un efecto reductor en la INMDA, siendo el fármaco más eficaz la hidroxilaminadapsona, esto por el valor del efecto máximo, seguido por la monoacetildapsona y finalmente la dapsona, y el más potente es la monoacetildapsona, esto por alcanzar una concentración efectiva 50 a menor concentración, seguido de la dapsona y finalmente la hidroxilamina dapsona.

Introducción

En el cerebro de mamífero, el neurotransmisor excitador predominante es el glutamato. En etapas de desarrollo embrionario, es importante para la diferenciación de las neuronas, formación de sinapsis y supervivencia de algunas neuronas. En etapas posteriores, estimula la migración neuronal y la formación de estratos en la corteza cerebral (Lee-Rivera y López-Colomé, 2005).

Sin embargo, el ácido glutámico por medio de la muerte celular, secundaria a excitotoxicidad, también se relaciona con trastornos como la epilepsia, el trauma cerebral, el accidente cerebrovascular isquémico y trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer, el Parkinson, entre otros (Lee-Rivera y López-Colomé, 2005; Yang et al., 2011). La excitotoxicidad es descrita como el proceso en el que el glutamato, neurotransmisor excitador, provoca toxicidad a través de la activación prolongada de sus receptores (Szydlowska y Tymianski, 2010), principalmente al receptor de NMDA, ya que se ha identificado su participación en la muerte celular por excitotoxicidad, debido a su alta permeabilidad al Ca^{2+} (Paoletti y Neyton, 2007).

Es por esto por lo que se ha llevado una extensa búsqueda para encontrar fármacos que antagonicen los efectos negativos que produce la activación del receptor NMDA. En 1999 se reportó la capacidad de la dapsona para disminuir el daño asociado con la acción excitadora y sobreactivación de canales de glutamato en el cuerpo estriado (Rodríguez et al., 1999).

Posteriormente se encontró que la dapsona, un antibiótico dermatológico, ejerce un efecto neuroprotector posterior a un evento de isquemia cerebral, observado durante el periodo de recuperación del evento (Ríos et al., 2004), y en el 2011 se demostró que la cantidad de tejido salvado, en un modelo de isquemia/reperfusión, en ratas administradas con dapsona era mayor en comparación con el grupo control.

En el 2015 en el laboratorio de Neuromodulación del Instituto de Fisiología de la BUAP, se demostró que la dapsona reduce la corriente activada por NMDA (I_{NMDA}).

en la corteza motora de ratas, cuyo efecto es dependiente de la concentración de dapsona, pero no es dependiente del voltaje (Villegas-Ronquillo, 2015).

En el año 2016 se descartó que el efecto de la dapsona sobre la INMDA, fuera a través de las subunidades GluN2A y GluN2B, ya que al utilizar los antagonistas a estas subunidades (TCN-201 e Ifenprodil, respectivamente) el efecto inhibitor d dapsona siguió prevaleciendo (Juárez-Nájera, 2016).

Finalmente, en 2018, se demostró que al aplicar ácido 5-7 dicloroquinurénico (5,7-DCKA) como antagonista de la subunidad GluN1, la dapsona no puede realizar su acción (Gómez-Gómez, 2018).

Con todos estos antecedentes, y por la importancia de un tratamiento neuroprotector que sea eficaz, potente y con el menor número de eventos adversos, se decide estudiar los metabolitos de dapsona (Monoacetildapsona e Hidroxilaminadapsona).

2. Corteza cerebral

La corteza cerebral es una estructura, representada por una lámina de sustancia gris que cubre los dos hemisferios, extremadamente compleja en la cual se encuentran representadas diferentes zonas sensoriales y motoras. Meynert y Betz establecieron el hecho que la corteza cerebral presenta una organización celular en distintas capas, a lo cual Bevan Lewis sugirió en 1878, un plan de estratificación de la corteza cerebral en seis capas diferentes. Basados en este plan estructural, la corteza ha sido dividida en 2 tipos: el *isocórtex* y el *allocórtex* de Brodmann (Valverde, 2002).

El *isocórtex* también llamado *neocórtex* es el encargado de analizar, elaborar e integrar la información sensorial y formular respuestas apropiadas, además siempre se puede reconocer la estratificación de las seis capas (Kiernan, 2009).

Las seis capas fundamentales del *isocórtex* son:

- Capa I (plexiforme externa): Contiene escasas células, pero numerosas fibras horizontales y ramos terminales de células piramidales de capas subyacentes.

- Capa II (granular externa): Contiene células piramidales pequeñas.
- Capa III (células piramidales medianas). Contiene predominantemente células piramidales pequeñas y medianas, así como células no piramidales (Creutzfeldt, 1995.)
- Capa IV (granular interna): Contiene células piramidales pequeñas, semejante a la capa II (ausente en la corteza motora).
- Capa V (ganglionar): aloja células piramidales grandes, en mayor cantidad y de mayor tamaño (en comparación con las demás).
- Capa VI (células fusiformes): contiene diferentes variedades de células de forma irregular o polimorfas (Valverde, 2002).

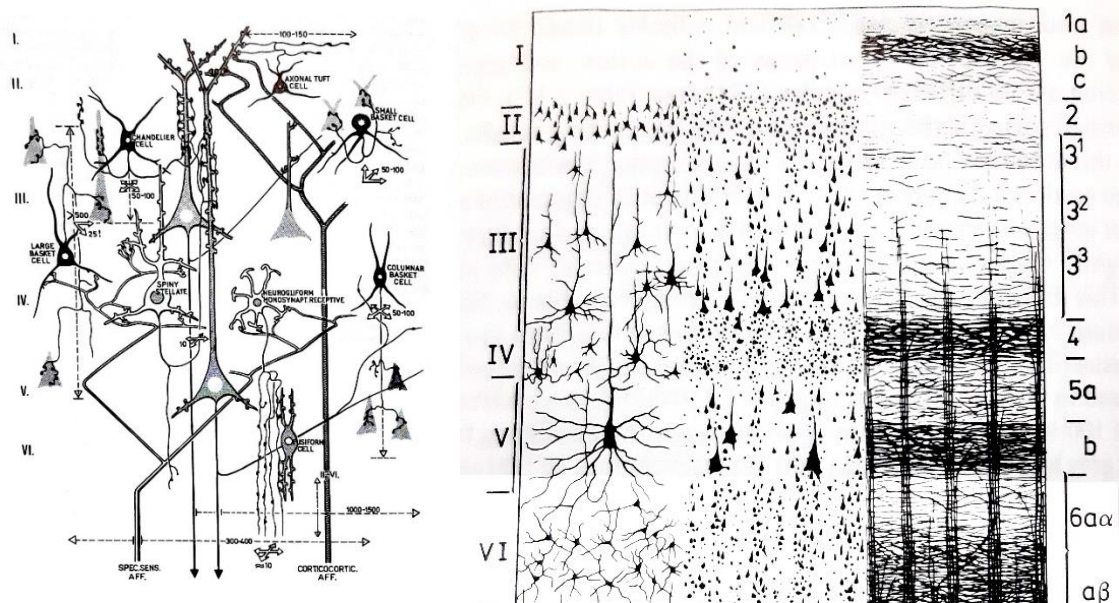


Figura 1. Esquema que representa las conexiones sinápticas entre varios tipos celulares y su disposición en las diferentes capas previamente descritas. Tomada Creutzfeldt. 1995.

Los componentes de la corteza cerebral pueden ser agrupados en dos tipos principalmente: células piramidales y células no piramidales (o intrínsecas).

- Células piramidales:

Poseen axones de proyección fuera de la propia corteza, con un fenotipo generalmente homogéneo y representan el 70% de toda la población neuronal.

- Células no piramidales:

Poseen axones que permanecen dentro de la propia sustancia gris de la corteza y representan el 30% de la población neuronal. No forman una población uniforme (Valverde, 2002).

3. Corteza motora

La mayoría de los movimientos “voluntarios” puestos en marcha por la corteza cerebral se realizan cuando esta estructura activa patrones de funcionamiento almacenados en las regiones inferiores del encéfalo: la médula, el tronco del encéfalo, los ganglios basales y el cerebelo. Estos centros inferiores mandan a su vez señales de control hacia los músculos (Hall y Guyton, 2016).

Sin embargo, para unos cuantos tipos de movimientos, la corteza prácticamente posee una vía directa hacia las motoneuronas anteriores de la médula, que sortea varios centros motores en su camino (Hall y Guyton, 2016).

Por delante del surco cortical central, ocupando casi el tercio posterior de los lóbulos frontales, está la corteza motora. La corteza motora se divide en tres subáreas: 1) la corteza motora primaria; 2) el área premotora y 3) el área motora suplementaria.

3.1. Corteza motora primaria

La corteza motora primaria (o M1) ocupa la primera circunvolución de los lóbulos frontales por delante del surco central o cisura de Rolando. Comienza desde la zona más lateral situada en el surco lateral o cisura de Silvio, se extiende hacia arriba hacia la porción más superior del cerebro y a continuación desciende por la profundidad de la cisura longitudinal, esto coincide con el área 4 de Brodmann. En la M1 el tipo de sinapsis que se encuentra es de tipo excitador (Hall y Guyton, 2016).

Las neuronas del M1 controlan la fuerza, la velocidad y la dirección del movimiento, principalmente de los músculos de las manos y del habla. La información procesada desde la M1 es transmitida principalmente hacia la médula espinal, conducida por medio de los tractos corticoespinal (piramidal) y extrapiramidal, agregándose

colaterales hacia los ganglios basales, el cerebelo y el tronco encefálico. Además de proyectar hacia regiones como el núcleo estriado y el tálamo (Lee-Rivera y López-Colomé, 2005).

3.2. Área premotora

El área premotora queda a una distancia de 1 a 3 cm por delante de la corteza motora primaria (corresponde al área 6 de Brodmann). Se extiende hacia abajo en dirección del surco lateral y hacia arriba en dirección a la cisura longitudinal, donde limita con la corteza motora primaria (Hall y Guyton, 2016).

3.3. Área motora suplementaria

El área suplementaria posee otra organización topográfica para controlar la función motora. Ocupa la cisura longitudinal, pero se extiende unos pocos centímetros por la corteza frontal superior, esto corresponde al área 6 y 8 de Brodmann (Hall y Guyton, 2016).

4. Glutamato

El glutamato es un aminoácido no esencial que no atraviesa la barrera hematoencefálica, se sintetiza en la mitocondria de la neurona a partir de glucosa y varios precursores.

En etapas de desarrollo embrionario, el glutamato es importante para la diferenciación de las neuronas, formación de sinapsis y supervivencia de algunas neuronas. En etapas posteriores, este mismo, estimula la migración neuronal y la formación de estratos en la corteza cerebral. Sus efectos se deben a dos cosas: a) su interacción con múltiples receptores que activan diversas rutas de señalamiento y b) su concentración extracelular, puesto que a concentraciones bajas (nM- μ M) funciona como neurotransmisor y neuromodulador, y a concentraciones altas (mM) induce muerte celular por excitotoxicidad (Lee-Rivera y López-Colomé, 2005).

El glutamato ejerce sus funciones a través de la interacción con dos grupos de receptores; ionotrópicos (función de neurotransmisor) y metabotrópicos (función de neuromodulador).

Los receptores metabotrópicos (mGluRs) se acoplan, a través de proteínas G triméricas, a la activación de cascadas de señalamiento intracelular. Los mGluRs se agrupan en tres grupos: Grupo I (mGluR1 y mGluR5), Grupo II (mGluR2 y mGluR3) y Grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) (Lee-Rivera y López-Colomé, 2005).

Como neurotransmisor el glutamato actúa en los receptores ionotrópicos (iGluRs), los cuales se han agrupado en tres subfamilias: receptor AMPA, receptor Kainato y receptor NMDA (N-metil-D-aspartato). Se ha enfatizado al receptor NMDA, puesto que se ha visto que posee un rol importante en la participación de la plasticidad sináptica, memoria y aprendizaje principalmente (Laube, 1998).

5. Receptor NMDA

Los receptores de Glutamato tipo NMDA (NMDARs) forman un canal iónico permeable principalmente a cationes (especialmente Na⁺, K⁺ y Ca²⁺). La actividad está finamente controlada a través de seis sitios específicos de modulación.

Los NMDARs pueden existir como una estructura hetero-tetraédrica o pentamérica. Se han identificado seis subunidades del receptor NMDA:

- GluN1 el cual es codificado por un único gen, pero puede generar 8 isoformas.
- GluN2 para los cuales existen 4 genes que codifican para las subunidades GluN2 (A, B, C y D).
- GluN3 que se co-ensambla con GluN1 y GluN2 y para la cual existen dos variantes (a y b) codificadas por diferentes genes.

Cada subunidad compuesta por cuatro dominios de membrana, dos subunidades GluN1 que forman el canal y una o más subunidades GluN2 y/o GluN3 que modulan su actividad (Arundine, 2003; Lee-Rivera y López-Colomé, 2005).

Los NMDARs funcionales generalmente se forman por heterotetrámeros integrados por dos dímeros conformados por las subunidades GluN1-GluN2, en donde en la subunidad GluN1 posee un sitio de unión para glicina y en la subunidad GluN2 con

un sitio de unión para glutamato, es decir 2 sitios de unión para glicina (S1) y dos para glutamato (S2) en cada receptor.

Por tanto, el dímero GluN1-GluN2 se considera la estructura base de organización funcional en cada receptor en donde se localizan los diversos sitios de unión y de reconocimiento para diferentes ligandos, tanto fisiológicos como farmacológicos (Flores-Soto y cols., 2012).

Cada subunidad se organiza en cuatro dominios funcionales que son: un dominio extracelular con el amino (N) terminal (ATD), un dominio de unión para el ligando (LBD), una región transmembrana, formado por cuatro segmentos hidrofóbicos (M1 a M4) en donde el segmento M2 que ingresa parcialmente a la membrana conforma el canal iónico y finalmente un dominio del carboxilo (C) en la región intracelular (CTD) (Vyklícky y cols., 2014).

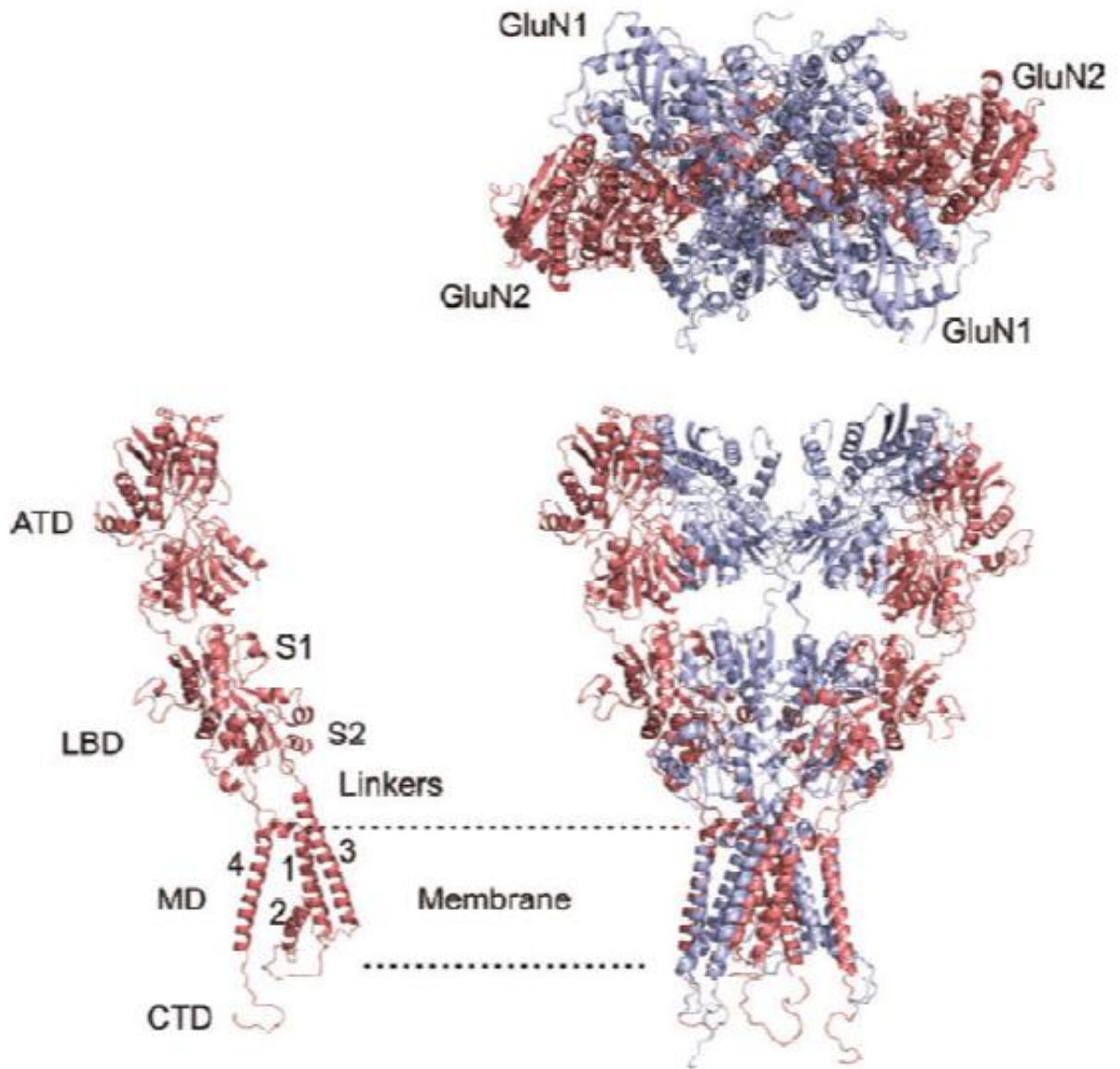


Figura 2. Representación esquemática de la estructura del receptor a glutamato tipo NMDA (Vyklícky y cols., 2014).

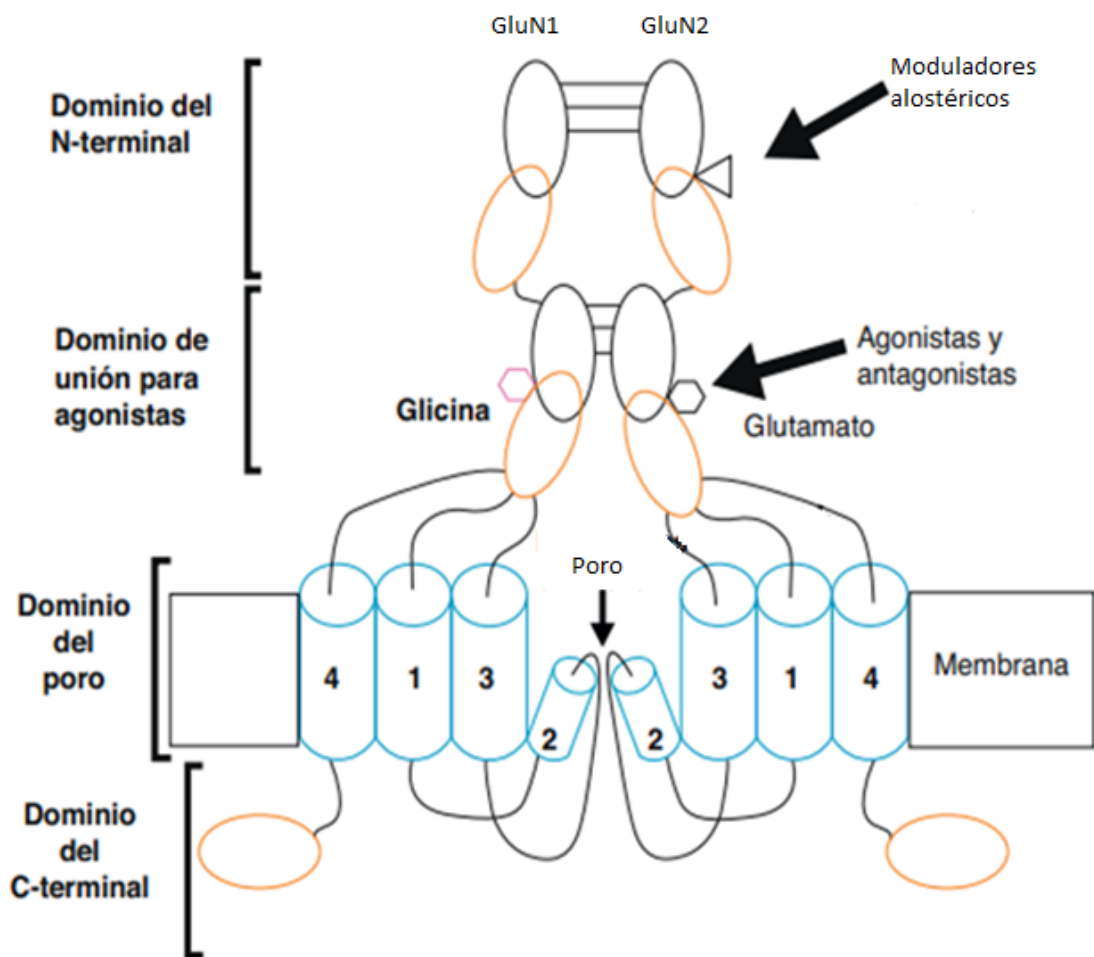


Figura 3. Representación esquemática de la estructura del receptor a glutamato tipo NMDA y sus sitios de regulación farmacológica (Modificado de Flores-Soto y cols., 2012).

La distribución del mRNA de cada subunidad de NMDA ha sido estudiada y delimitada en diferentes zonas. La subunidad GluN1 se encuentra ubicuamente en el cerebro, en contraste con las cuatro subunidades GluN2, en el cual el mRNA de la subunidad GluN2-A, se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro, principalmente en la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo. En cuanto a la subunidad GluN2-B, el mRNA se expresa principalmente en corteza cerebral, hipocampo, bulbo olfatorio, el septum y el tálamo. La subunidad GluN2-C, se encuentra expresado principalmente en cerebelo. Finalmente, la subunidad GluN2-D, se observa en tálamo y bulbo olfatorio (Mori y cols. 1995).

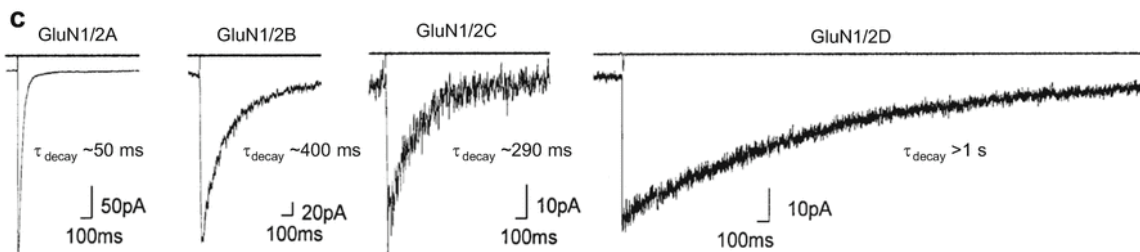
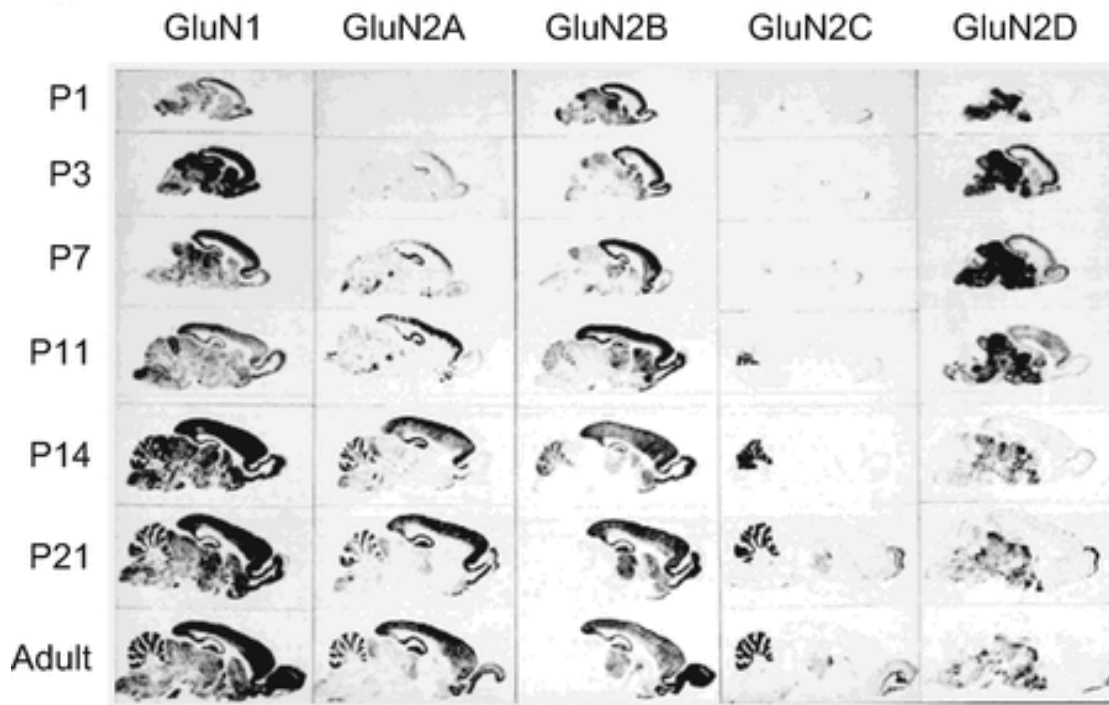


Figura 4. En la parte superior se muestra la expresión del receptor NMDA, y en la parte inferior (C) las propiedades funcionales del canal. (Tomado y modificado de Mori y cols. 1995)

Se puede observar en la figura 4, registros con distintas cinéticas de corriente, que dependen de los diferentes subtipos de la subunidad GluN2 (Kasper y cols., 2018).

6. Excitotoxicidad

El término “excitotoxicidad” fue acuñado por Onley en 1969, para describir el proceso en el que el glutamato, neurotransmisor excitador, provoca toxicidad, a través de la activación prolongada de sus receptores. Una interrupción de flujo sanguíneo provoca privación de oxígeno, y una incapacidad de mantener un gradiente iónico necesario para la homeostasis neuronal, lo cual conduce a despolarizaciones excesivas y liberación de neurotransmisores excitadores,

conduciendo a la acumulación de calcio, que conlleva a la activación de señalización y procesos para muerte celular por apoptosis (Szydłowska y Tymianski, 2010).

Cabe mencionar que el proceso de excitotoxicidad se ve mediado por la entrada excesiva de Ca^{2+} , debido a que la concentración extracelular de Ca^{2+} es de 1 a 1.5mM y la intracelular de 100nM, dando una concentración de 10,000 veces más alta afuera que adentro, comparada con el Na^+ la cual es cerca de 10 veces en exterior con respecto al interior.

La excitotoxicidad se caracteriza por el aumento de volumen de la célula, la vacuolización del citoplasma, la ruptura de membranas, que apuntan a una degradación internucleosomal del ADN y la activación de las caspasas. Además, el daño a las membranas mitocondriales tendrá como resultado la liberación de radicales libres y depleción de ATP, el cual es fundamental para mantener la homeostasis de la célula, como el gradiente iónico, y la reparación del material genético (Dirnagl y cols., 1999; Lorigados y cols.,2013).

La depleción de estos factores de homeostasis, provocará la liberación excesiva de glutamato y el consiguiente aumento de niveles de Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- intracelular, mientras que K^+ se libera al espacio extracelular.

El papel del Ca^{2+} , actúa sobre numerosos sistemas enzimáticos (proteasas, lipasas, endonucleasas, etc.), liberando radicales libres y con la consiguiente acción dañina sobre las membranas, activando la muerte celular programada (apoptosis).

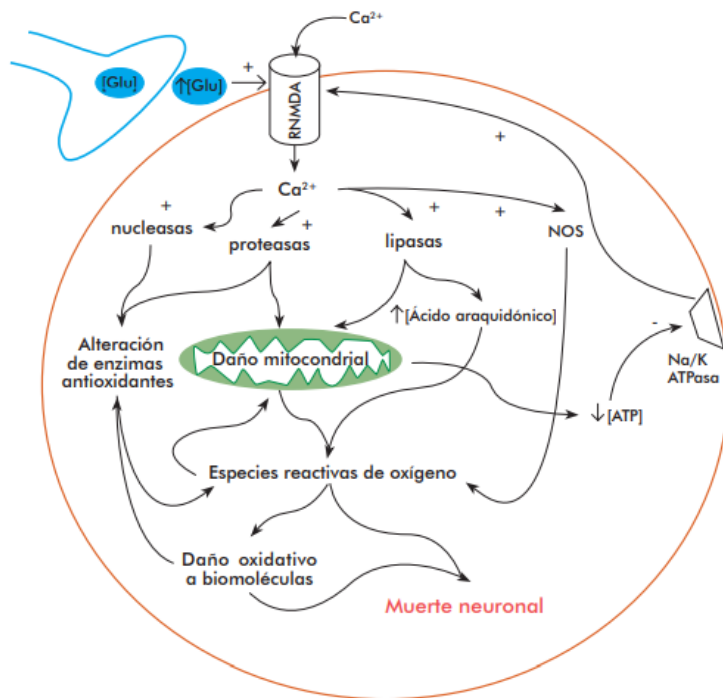


Figura 5. Representación esquemática de las diferentes vías mediadas por calcio, para inducir muerte neuronal.

7. Neuroprotección:

La neuroprotección se refiere a la terapéutica empleada para prevenir, retardar o revertir los procesos asociados a la muerte neuronal, provocada por una lesión inicial (Levin y Peeples, 2008).

El esfuerzo clínico en el *ictus* isquémico persigue dos objetivos principales: reabrir las arterias ocluidas, con el consiguiente restablecimiento de la perfusión cerebral, y obtener un efecto neuroprotector, entendiendo por tal el conjunto de medidas terapéuticas que sirven para prevenir o limitar la lesión del tejido nervioso, que garantice la viabilidad celular hasta que los mecanismos fisiológicos. Para ello, han de interferir con uno o más de los componentes de la cascada bioquímica que se desencadena tras la isquemia, como la inhibición en la síntesis proteica, la depresión de las reservas energéticas intracelulares, la despolarización de la membrana celular, la liberación de potasio intracelular, seguida de la liberación de

neurotransmisores, y el consecuente colapso metabólico celular. Todo esto conduce a la peroxidación lipídica, la cual, en un proceso mediado por el incremento de la concentración de calcio intracelular y por la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) produce, como resultado final, la muerte neuronal (Fernández-Gómez y Hernández, 2008).

A pesar de los intentos y estudios de más de 500 productos como neuroprotectores, se ha tenido baja tasa de éxito (Levin y Peeples, 2008).

8. Dapsona

La dapsona es un antibiótico dermatológico perteneciente a la familia de las sulfonas, las cuales fueron sintetizadas en 1908, por Fromm y Wittmann, iniciando su uso *in vivo* hasta 1937 y hasta 1941 se inicia su estudio como tratamiento para lepra, en el cual reportan un efecto inhibitor en el proceso de la enfermedad en 1943 (Zhu y Stiller, 2001).

8.1. Estructura química

Dapsona (4-4'-diaminodifenilsulfona, DDS), (C₁₂, N₂, O₂, H₁₂, S₁) (Zhu y Stiller, 2001).

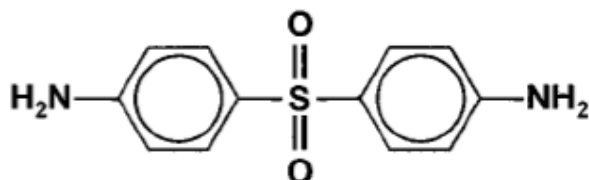


Figura 6. Estructura de Dapsona, tomada de Zhu y Stiller (2001).

8.2. Farmacocinética

8.2.1. Absorción

La dapsona administrada por vía oral se absorbe en tracto gastro-intestinal con una biodisponibilidad en un 86%. A la ingesta de 100 mg de dapsona vía oral, se encuentran concentraciones pico en sangre entre 1.10 a 2.33 mg/L. A 24 horas posteriores a la ingesta, las concentraciones varían de 0.4 a 1.2 mg/L (Zhu y Stiller, 2001).

8.2.2. Distribución

La dapsona se une a proteínas en un 70 %, y su metabolito monoacetilado es casi en su totalidad unido a proteínas. Su distribución es a todo el cuerpo, incluyendo piel, hígado, riñones y eritrocitos. Cruza la barrera hemato-encefálica, la placenta y se excreta en leche materna (Zhu y Stiller 2001).

8.2.3. Metabolismo

Posterior a la absorción por el tracto gastrointestinal, la dapsona es transportada a hígado a través de la circulación portal, en el cual es metabolizada por dos vías; acetilación o N-hidroxilación. Cuando toma la vía N-hidroxilación, el citocromo P-450 produce hidroxilamina, un metabolito potencialmente tóxico. Sin embargo, cuando toma la vía de acetilación, se producen metabolitos no tóxicos, como monoacetildapsona (Zhu y Stiller 2001).

8.2.4. Metabolitos

El ser humano tiene contacto con miles de sustancias ajenas al organismo que se denominan productos “xenobióticos”, entre ellos se encuentran los fármacos. A lo cual el organismo posee un sistema para eliminar con rapidez estos productos, para que no se acumulen en los tejidos. Numerosos medicamentos se derivan de las sustancias químicas que contienen las plantas, algunas usadas en la fitoterapia china, a lo cual los fármacos sintéticos se metabolizan a través de rutas que simulan la absorción de las sustancias químicas encontradas en algunas plantas (Brunton y Chabner, 2011)

8.2.5. Excreción

Aproximadamente el 85 % de dapsona es excretado en orina como glucurónidos principalmente, 10 % es excretado por vía biliar. Después de la primera dosis, el 50% de dapsona es excretado (Zhu y Stiller 2001).

8.2.6. Efectos adversos

La administración de dapsona está asociada con toxicidad dependiente de la dosis (mayor 5 mg/kg o mayor 100 mg/día) hacia los eritrocitos; metahemoglobinemia, y toxicidad no dependiente de la dosis hacia glóbulos blancos, como agranulocitosis, fiebre, dermatitis, etc. Resultando en una falla terapéutica (Mahmud y cols., 1997).

Se han reportado muertes por agranulocitosis, anemia aplásica u otras discrasias sanguíneas asociadas con la administración de dapsona. La hemólisis y metahemoglobina, puede ser poco tolerada en pacientes con padecimientos cardiopulmonares severos. También se ha encontrado que la dapsona es carcinogénica (sarcomagénica) en estudios hechos en ratas macho y ratones hembra produciendo tumores mesenquimales en el bazo y peritoneo, así como carcinoma tiroideo en ratas hembra (DAPSODERM-X. PLM Vademécum).

8.2.7. Metahemoglobinemia:

La metahemoglobinemia es el más común de los efectos adversos, generalmente bien tolerada a dosis bajas de dapsona. La Hidroxilamina, un producto del metabolismo por la vía de N-Hidroxilación, actúa con la hemoglobina en presencia de oxígeno, lo que propicia a la formación de metahemoglobina (Zhu y Stiller, 2001).

8.2.8. Hemólisis

El metabolito hidroxilamina se encuentra asociado a la formación de cuerpos de Heinz, que producen hemólisis y anemia. La dosis de ingesta de dapsona no debe exceder 1.5mg/kg/día, puesto que se relaciona con mayor porcentaje de casos (Zhu y Stiller, 2001).

8.2.9. Otros efectos adversos

“Síndrome Dapsona”; en el cual es provocada una reacción de hipersensibilidad, con la triada: fiebre, erupciones cutáneas (*rash*) y afectación de órganos internos. En las lesiones cutáneas se pueden presentar: placas, pústulas, pápulas eritematosas y lesiones eccematosas.

Otras manifestaciones de este síndrome incluyen, prurito, disfunción hepática, hepatomegalia, esplenomegalia, eosinofilia, linfadenopatía, mononucleosis, hipotiroidismo, psicosis, neuropatía periférica y síndrome de Steven-Johnson (Zhu y Stiller, 2001).

9. Historia de Dapsona como neuroprotector.

Dapsona es un fármaco bien conocido en el tratamiento contra *Pneumocystis carinii* y Lepra. Recientemente algunas propiedades han sido descubiertas, confiriéndole un efecto antagónico contra convulsiones inducidas por ácido kaínico y neurotoxicidad.

Los mecanismos por los cuales dapsona produce efectos neuroprotectores son:

- A. Efecto antiapoptótico mediante el antagonismo de los receptores de glutamato
- B. Efecto antiinflamatorio y antioxidante de la sulfona

Ríos y colaboradores (2004) en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media en ratas proponen una dosis con efecto neuroprotector, entre 9,375 o 12,5 mg/kg cada 24 horas, iniciando 30 min posterior a la lesión de isquemia, lo cual implica que su uso como neuroprotector, el cual se ha propuesto una ventana terapéutica a no más de 48 horas del evento isquémico, cuyo uso no prolongado genere mayor beneficio, sin embargo es de interés estudiar el efecto que pueden tener sus metabolitos previamente mencionados, sobre la I_{NMDA} y observar si alguno de ellos produce el mismo o mayor efecto de reducción sobre esta corriente, para poder así abrir una nueva posibilidad de ventana terapéutica con menor riesgo de asociación de efectos adversos dosis y no dosis dependientes.

Posteriormente se demuestra que la dapsona posee efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antiapoptóticos, en un modelo de isquemia/reperfusión (I/R) en ratas, en donde se describen los siguientes mecanismos por los cuales la dapsona posee estos efectos (Díaz-Ruiz et al., 2008):

- Antagoniza la actividad de mieloperoxidasa (MPO, produce ácido hipocloroso, un potente agente oxidante) en el cuerpo estriado después de I/R.
- Inhibe la peroxidación de lípidos (proceso que produce daño en la membrana) en el cuerpo estriado después de I/R.
- Disminuye la cantidad de Nitrotirosina (marcador de estrés oxidativo) presente en el cuerpo estriado después de I/R.
- Reduce la muerte celular en el cuerpo estriado después de I/R en comparación con ratas a las que no se les administró dapsona.
- Disminuye la actividad de caspasa-9 y Caspasa-3 después de I/R en el cuerpo estriado.

Antecedentes de Dapsona en neuronas disociadas de corteza motora de rata:

En investigaciones realizadas en el laboratorio de Neuromodulación del instituto de Fisiología de la BUAP, se ha estudiado el efecto de dapsona sobre las neuronas piramidales de corteza motora primaria de rata agudamente disociadas. En la figura 6 muestro la curva dosis respuesta del efecto de dapsona sobre las corrientes de NMDA (100 μ M) (Gómez-Gómez, 2019). En donde se encontró que dapsona tiene una concentración efectiva de 35 ± 37 nM, un valor de p de 0.6 ± 0.4 , con un efecto mínimo de -1.7 ± 6.9 % y un efecto máximo de $22.2 \pm 4.6.6$ %

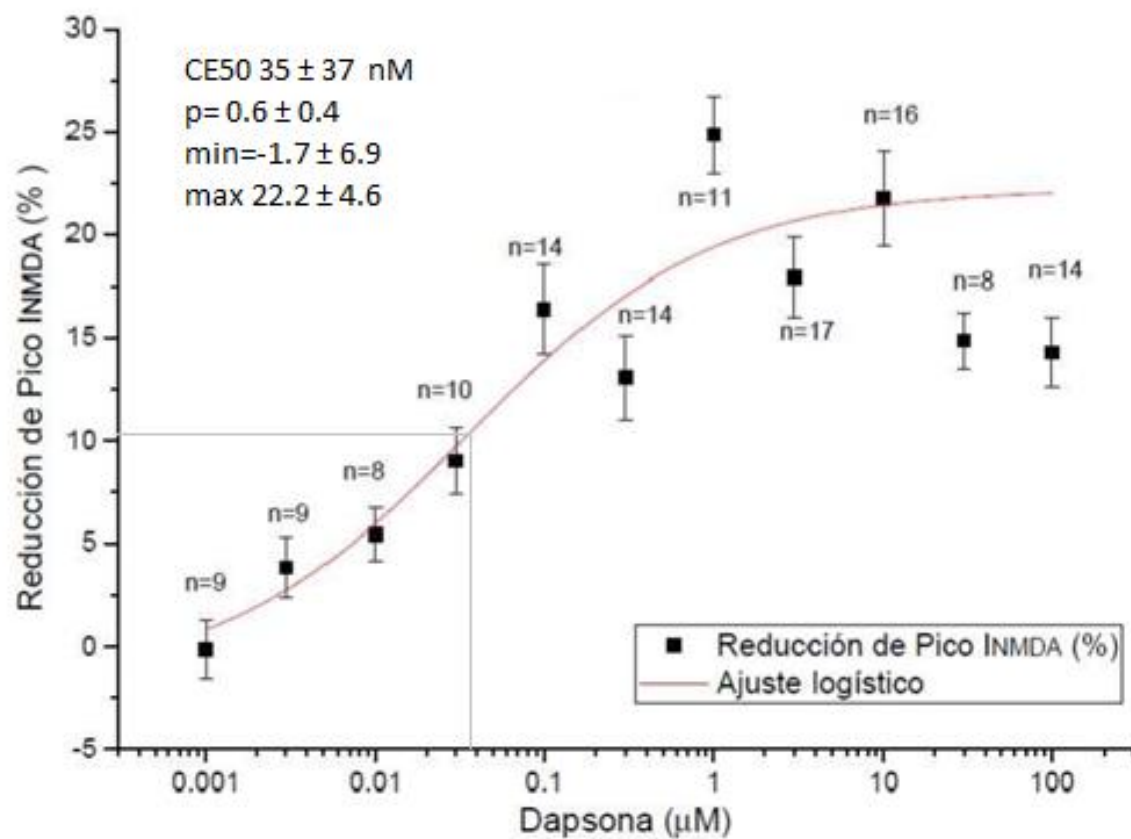


Figura 7. Curva dosis respuesta de dapsona sobre la INMDA (pico), tomada y modificada de Gómez-Gómez, 2019.

10. Enfermedad Vascular Cerebral.

La enfermedad vascular cerebral (EVC) se ha definido como un síndrome clínico caracterizado por el rápido desarrollo de síntomas y/o signos correspondientes usualmente a una afección neurológica focal, y que persiste más de 24 horas, sin otra causa aparente distinta del origen vascular (GPC SS-102-08).

Esta constituye una causa importante de morbilidad y mortalidad, así como de discapacidad en todo el mundo, cuya incidencia ha ido en aumento en países subdesarrollados (2/3 de todos los casos anualmente).

Este padecimiento no es un trastorno homogéneo y se clasifica en dos grandes tipos: la isquemia y la hemorragia. La enfermedad vascular cerebral isquémica se divide en dos entidades clínicas: el ataque isquémico transitorio y el infarto cerebral (Cantú, 2012).

Según estimaciones de la Organización Mundial de la salud (OMS), los accidentes cerebrovasculares representaron 5,7 millones de muertes y 16 millones de eventos por primera vez en 2005, y estas cifras pueden llegar a 7,8 millones y 23 millones en 2030, respectivamente (Kuklina, et al., 2012).

10.1. Epidemiología de las Enfermedades Cerebrovasculares en México.

El Sistema Nacional de Salud atendió a un promedio de 38,752 pacientes que en conjunto permanecieron hospitalizados cerca de 2 millones de días y que en términos generales representó una estancia promedio de 7.3 días por paciente y evento de hospitalización (SINAVE/DGE/SALUD/Perfil Epidemiológico de las Enfermedades Cerebrovasculares en México).

La distribución porcentual de la mortalidad por causas cerebrovasculares según el sexo del fallecido denota una ligera predominancia para las mujeres (52.5% en 2010) en comparación con los hombres (47.5% en 2010). De acuerdo con el Consejo Nacional de Población, para el año 2030 México tendrá una población con problemas médicos similares a los países industrializados, pero con el presupuesto y recursos de un país en desarrollo (GPC-S-102-08 actualización 2017).

10.2. Tratamiento

En cuanto al tratamiento, según la (GPC-S-102-08 actualización 2017), lo divide en no farmacológico y farmacológico. En el segundo, incluye la terapia trombolítica, anticoagulante, antidepresivos, antineuríticos y neuroprotector. Para este último menciona que no existe evidencia suficiente con el efecto de algunos neuroprotectores (nimodipina, citicolina, sulfato de magnesio, naloxona, glicerol, nxy-059 agente bloqueador de radicales libres) en la reducción del impacto de la enfermedad vascular cerebral isquémica.

11. Justificación

Los mecanismos de excitotoxicidad asociados a lesiones cerebrales y sus efectos a mediano y largo plazo, son razones por las cuales se ha llevado a cabo la búsqueda de un fármaco neuroprotector con efectos adversos mínimos, sin

embargo, esto ha fracasado por la complejidad de estos mecanismos. Actualmente se propone a la Dapsona como un fármaco que pueda ser utilizado con este fin.

En estudios previos con modelos de rata donde se llevó a cabo oclusión de la arteria media, se ha demostrado el efecto neuroprotector de la Dapsona. Estos estudios han arrojado resultados en los cuales, el efecto de la Dapsona como neuroprotector, está relacionado a la disminución del estrés oxidativo, los factores de inflamación y el efecto excitotóxico de glutamato (Díaz-Ruiz y cols., 2008, Díaz-Ruiz y cols., 2011).

En investigaciones realizadas en el laboratorio de Neuromodulación del instituto de Fisiología de la BUAP, la dapsona reduce I_{NMDA} y que este efecto no tiene una relación con el bloqueo por voltaje dado por Mg^{2+} en el NMDAR (Villegas Ronquillo, 2015), así como se demostró que aún en presencia de los antagonistas de las subunidades GluN2A (TCN-201) y GluN2B (Ifenprodil) la dapsona reduce I_{NMDA} , neuronas de las capas V y VI de la corteza motora primaria (Juárez-Nájera, 2016).

Posteriormente en 2019 (Gómez-Gómez, 2019) realizó un estudio en el laboratorio de Neuromodulación del instituto de Fisiología de la BUAP, donde se demostró que la dapsona no puede realizar su acción sobre el NMDAR si la subunidad GluN1 no participa en la generación de I_{NMDA} .

Por lo tanto, se hace relevante estudiar el efecto de los metabolitos de la dapsona, para conocer el mecanismo mediante el cual ejerce su efecto neuroprotector, por medio de la disminución I_{NMDA} , para el desarrollo de fármacos más eficaces y con menos efectos adversos.

12. Pregunta de Investigación

¿Cuál es el efecto de los metabolitos monoacetildapsona e hidroxilaminadapsona, sobre la corriente activada por NMDA en neuronas piramidales de las capas V y VI de la corteza motora primaria?

13. Hipótesis

Los metabolitos, monoacetildapsona e hidroxilaminadapsona, tienen efecto de reducción sobre la corriente activada por NMDA en neuronas piramidales de las capas V y VI de la corteza motora primaria.

14. Objetivos

14.1. Objetivo General

Determinar la acción de los metabolitos, monoacetildapsona e hidroxilaminadapsona, sobre la corriente activada por NMDA en las neuronas piramidales de las capas V y VI de la corteza motora primaria de rata macho Wistar 100-120g, de 30 días de vida.

14.2. Objetivos particulares

Los siguientes objetivos se realizarán en neuronas piramidales de las capas V y VI de la corteza motora primaria de ratas macho Wistar de 30 días de edad.

- Realizar una curva dosis-efecto del metabolito hidroxilaminadapsona sobre la corriente activada NMDA.
- Realizar una curva dosis-efecto del metabolito monoacetildapsona sobre la corriente activada NMDA.
- Comparar los valores de la curva dosis-efecto de monoacetildapsona y con hidroxilaminadapsona con los obtenidos por dapsona.

15. Metodología

15.1. Ética

Los procedimientos serán llevados a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Los experimentos se realizarán en ratas macho de la cepa Wistar de 30 días de edad (100-120 gr) procedentes del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). El registro se hará en células piramidales

agudamente disociadas provenientes de la capa V y VI de la corteza motora primaria.

15.2. Disociación aguda

El protocolo de disociación empleado ya ha sido previamente descrito por Flores-Hernández y cols., (2009), el cual se describe a continuación con algunas modificaciones: las ratas serán anestesiadas con pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg y posteriormente decapitadas. Los cerebros se disecarán rápidamente y se colocarán en solución fría de isetionato con bajo calcio (en mM): 140 isetionato de sodio, 2 KCl, 2 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 23 glucosa, 15 HEPES, pH = 7.4, 300-310 mOsm/L y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 N-G-nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico, y gaseada con O₂. Posteriormente se obtendrán rebanadas coronales de 350 µm con ayuda de un vibratomo (Campden, UK) mientras están sumergidas en la misma solución. De las rebanadas obtenidas, se diseccionarán las capas V – VI de la corteza motora primaria.

Posteriormente las rebanadas disecadas se mantendrán mínimo 1 hora a una temperatura ambiente, en solución salina balanceada de Earl (EBSS, SIGMA) amortiguada con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 N-G -nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico; burbujeada con 95% O₂/ 5% CO₂, pH = 7.4 ajustado con NaOH, 300-310 mOsm/l. Después de al menos 1 hora de incubación se tomará una rebanada de las capas V- VI de corteza motora primaria para su tratamiento enzimático, el cual se realizará en una cámara de cultivo de 40 ml con solución salina balanceada de Hanks (HBSS, SIGMA) amortiguada con HEPES burbujeada con O₂, conteniendo 0.75 mg/ml de papaína (Calbiochem) a 33°C ± 2 y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NG–nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico, durante 13 minutos. Transcurrido el tiempo de la digestión enzimática, el tejido se lavará con la solución de isetionato y posteriormente disociado mecánicamente con pipetas Pasteur de diferentes calibres (pulidas al fuego). La suspensión de células se sembrará en cajas Petri de 35 mm (Nunc Surface, NUNC) montadas en el microscopio de registro. Después de 10 minutos de incubación la suspensión será lavada con una

solución de fondo (en mM): 140 NaCl, 23 Glucosa, 15 HEPES, 2 KCl, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂ y 1% rojo fenol, burbujeada con O₂, pH = 7.4 ajustado con NaOH, 300-310 mOsm/l; para su posterior registro por medio de la técnica de fijación de voltaje (*voltage clamp*) en configuración de célula completa.

15.3. Registro electrofisiológico

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

Se empleará la técnica de fijación de voltaje en célula completa. Los electrodos de registro serán estirados de tubos capilares de borosilicato tipo Corning 8250 (WPI 1B120F4, Sarasota FL) utilizando un estirador de micropipetas Modelo P-97 (Sutter Instrument Co). La solución interna para los registros de corriente se encuentra compuesta de (en mM): 175 N-Metil-D-Glutamina (NMDG), 40 HEPES, 2 MgCl₂, 10 ácido etilenglicol-bis (β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), 12 fosfocreatina, 3 Na₂ATP, 0.35 Na₃GTP, 0.1 leupeptina, pH = 7.3 con H₂SO₄, 265 – 270 mOsm/l.

La solución externa compuesta de (en mM): 127 NaCl, 20 CsCl, 5 BaCl₂, 2 CaCl₂, 12 glucosa, 10 HEPES, pH = 7.3 con NaOH, 300-305 mOsm/l.

Los registros se obtendrán con un amplificador para fijación de voltaje “*voltage clamp*” Multiclamp 700 A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) y un digitalizador Digidata 1440A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), controlados con el programa pClamp Versión 9 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) ejecutándose en una computadora con procesador tipo Pentium IV (1.5GHz), 1 GB de memoria RAM y sistema operativo Windows XP SP3.

La resistencia de los electrodos será de 6-8 M Ω en el baño. Después de la ruptura del sello, la resistencia serial debería ser menor a 25 M Ω . Cuando el cambio de la resistencia serial sea mayor el experimento será suspendido. El potencial de mantenimiento de membrana será de -80mV mientras no haya protocolo activo.

Para su registro se elegirán las neuronas piramidales de mayor capacitancia, de menor longitud y número de dendritas, y que mantenga sus características morfológicas (forma de pirámide o pera y dendrita apical visible).

15.4. Protocolos electrofisiológicos

Los protocolos empleados para el registro electrofisiológico serán:

Rampa (-100 mV a +40 mV) con una duración de 100 ms para generar las corrientes de Na⁺ y Ca²⁺.

Aplicación de Neurotransmisor o Neuromodulador. Se fija a la neurona a un potencial de mantenimiento de -80 mV y se aplica el neurotransmisor o neuromodulador durante 3s posterior a un pulso de prueba de -10mV. El protocolo dura 6s y se repite cada 15s. Mediante este protocolo se generan las corrientes activadas por NMDA y también se utilizará para estudiar en primer lugar la curva dosis-efecto de la dapsona, en segundo lugar, la curva dosis efecto de los metabolitos de dapsona.

Condición NMDA: en esta condición experimental la célula será perfundida con la solución externa conducida por el capilar A, manteniéndose el baño con esta solución en todo el protocolo interrumpiéndose 3s para bañar a la célula con una concentración 100 µM de NMDA + glicina a una concentración de 10µM conducida por el capilar B. El protocolo se dejará correr hasta obtener un trazo de corriente estable. Esta condición experimental se tomará como control.

Condición NMDA + monoacetildapsona: en esta condición experimental la célula se bañará con NMDA 100 µM + glicina 10 µM + monoacetildapsona (inicialmente a concentraciones equimolares de dapsona). El protocolo se deja correr hasta obtener un trazo de corriente estable, después de obtener el trazo se regresará a la condición control que también sirve como lavado.

Condición NMDA + hidroxilaminadapsona: en esta condición experimental la célula se bañará con NMDA 100 µM + glicina 10 µM + hidroxilamina (inicialmente a concentraciones equimolares de dapsona). El protocolo se deja correr hasta obtener un trazo de corriente estable, después de obtener el trazo se regresará a la condición control que también sirve como lavado.

Recuperación de NMDA. Se determinará la constante de tiempo (Tau) en que la corriente activada por Glutamato tipo NMDA sola o en presencia de los metabolitos de dapsona. El periodo 30 ms para NMDA y el tiempo entre la aplicación 250 ms para NMDA. El potencial de mantenimiento será de – 80 mV.

16. Análisis estadístico

Los valores en tablas, gráficas o texto, representarán el valor de la media de los resultados obtenidos \pm su error estándar de la media (ESM). Los ajustes y gráficas serán realizados en el programa Origin 2015 (Microcal Software Inc., Northampton, MA). En el análisis estadístico, los datos serán analizados primero con una prueba Shapiro ($p < 0.05$) para determinar el comportamiento de una distribución normal. Las diferencias entre las medias de grupos experimentales serán analizadas mediante la prueba “t” apropiada o un análisis de varianza correspondiente.

Para el análisis de la curva dosis efecto, se empleará un ajuste sigmoidal de tipo logístico con el programa de Origin 9.1 La fórmula que se utilizará para este ajuste es la siguiente:

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

Dónde:

A1 = Tamaño total del pico

A2 = Estado Estacionario

x = Valor de la concentración

x0 = CE50

Para el análisis de la constante de tiempo de recuperación de la corriente activada por NMDA, se empleará un ajuste exponencial de decaimiento con el programa de Origin 9.1 La fórmula que se utilizará para este ajuste es la siguiente:

$$y = A1 * \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)$$

A1 = 100 % de la respuesta

T = Valor del tiempo

τ = Valor de la constante de tiempo τ (tau)

$$\text{PORCENTAJE} = \left(\frac{\text{EFECTO}}{\text{CONTROL} + \text{LAVADO}} \right) * 100$$

17. Resultados

En la figura 8 se muestran micrografías de las neuronas registradas, en cada imagen se puede observar la morfología piramidal y la dendrita apical características de estas neuronas presentes en las capas V y VI de la corteza motora primaria de rata.

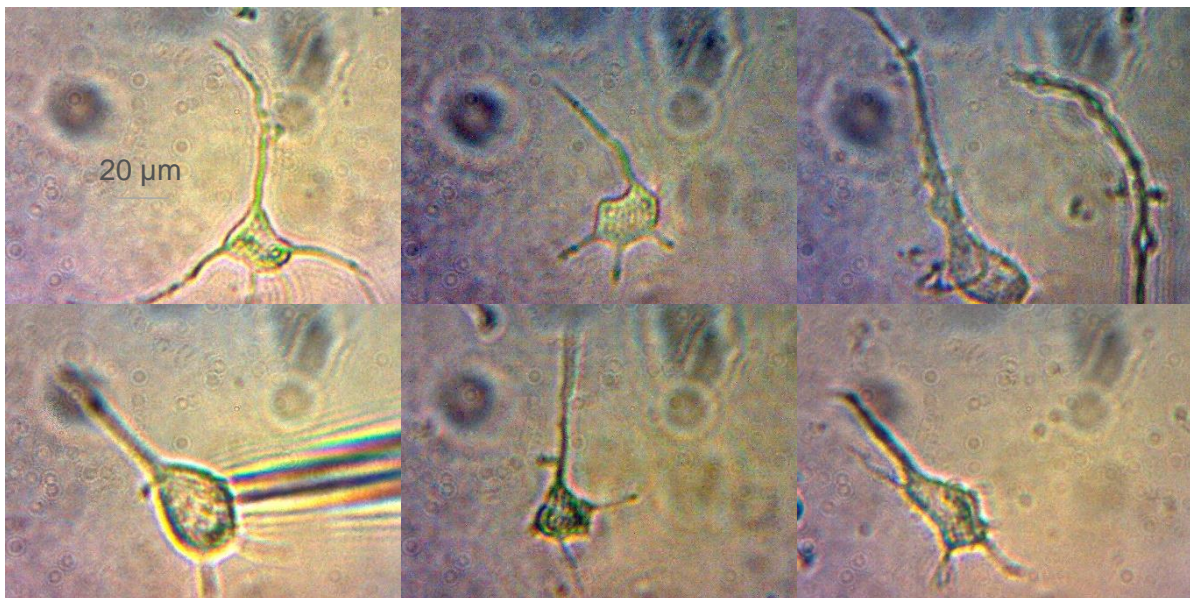


Figura 8. Micrografías 20μm.

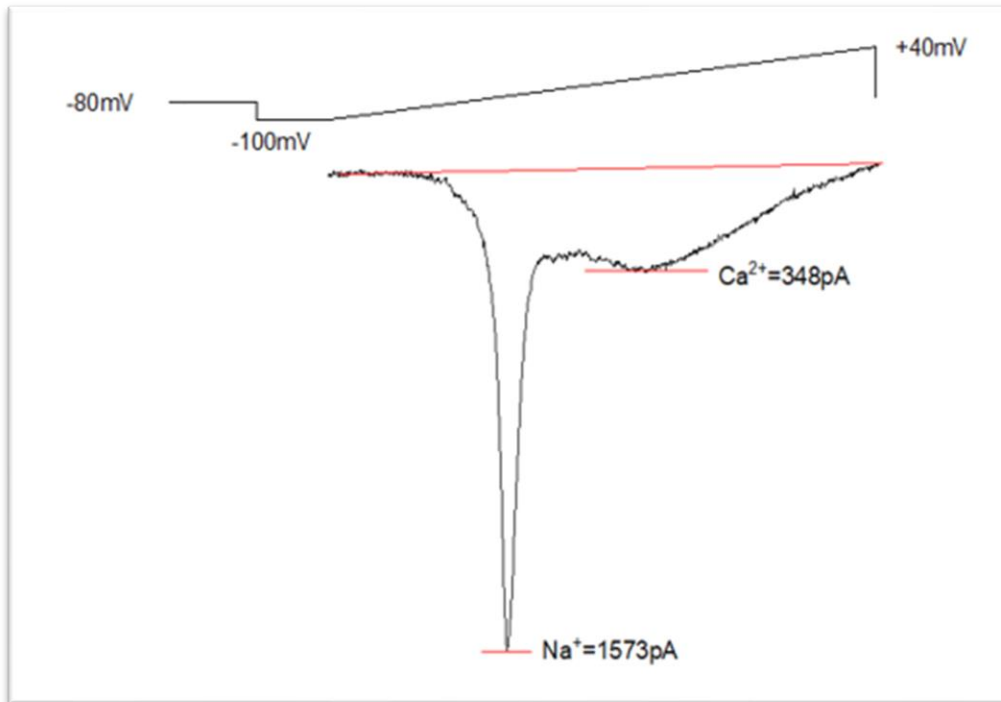


Figura 9. Rampa de voltaje. Esta figura representa el registro electrofisiológico característico de una célula a la que se le aplicó la rampa de voltaje, que inicia con la célula fijada a un voltaje de -80 mV y que cambia a -100 mV para ascender de forma gradual hasta los $+40 \text{ mV}$ con una duración de 100 ms . Con este protocolo se puede observar que en esta neurona la corriente de Na^+ (dependiente de voltaje) fue de 1573 pA al pico y la activación de la corriente de Ca^{2+} (dependiente de voltaje) fue de 348 pA .

17.2. Resultados del segundo objetivo

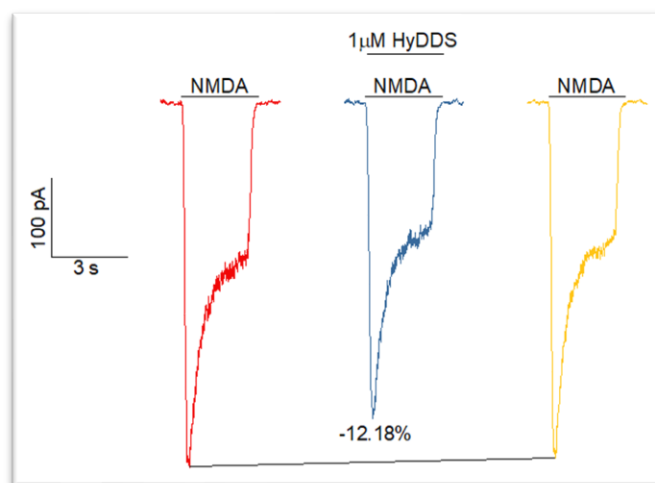


Figura 10. Esquema representativo de la disminución de la I_{NMDA} en presencia de Hidroxilaminadapsona.

En este esquema, el primer trazo en color rojo muestra la condición control, el segundo trazo (azul) representa la aplicación de hidroxilaminadapsona (en esta célula con una reducción de la corriente al pico del 12.18 %) y el último trazo muestra el lavado (amarillo). La condición de lavado se realizó con la misma solución que el control y se empleó para mostrar que el efecto de la hidroxilaminadapsona es reversible. La fórmula mostrada en el esquema se utilizó para obtener el porcentaje del efecto de hidroxilaminadapsona sobre la I_{NMDA} .

A continuación, se muestran los trazos representativos de cada concentración utilizada, donde el porcentaje representado en cada trazo corresponde a la célula y no al promedio de toda la muestra.

17.3. Hidroxilaminadapsona 100 μ M

La concentración más alta utilizada de hidroxilaminadapsona fue de 100 μ M, en el cual se obtuvo una disminución de 38.04% de la I_{NMDA} al pico, con una muestra de 15 células a las cuáles se aplicó dicha concentración, una de estas células representa la figura (11).

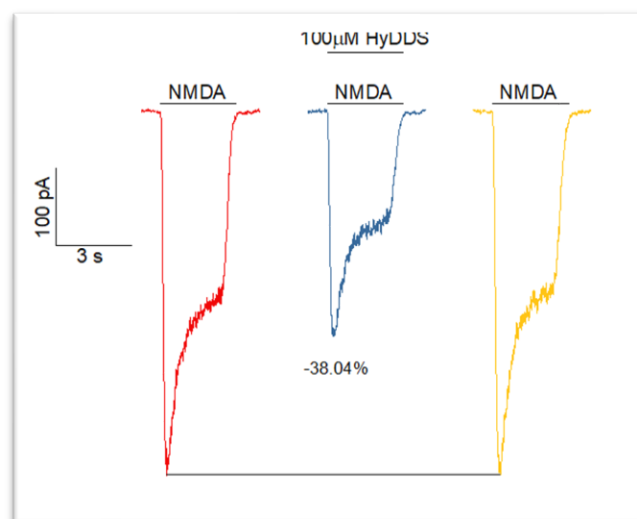


Figura 11. Trazos representativos de dapsona 100 μ M. El porcentaje mostrado se toma del promedio del control y la condición de lavado. Se puede observar que hidroxilaminadapsona 100 μ M disminuye la I_{NMDA} 38.04% al pico de la corriente en esta neurona.

17.4. Hidroxilaminadapsona 30 μ M

La siguiente concentración utilizada fue Hidroxilaminadapsona 30 μ M, donde el efecto para el pico de la I_{NMDA} fue de 27.81%, con una muestra de 15 células a las cuáles se aplicó dicha concentración, una de estas células representa la figura (12)

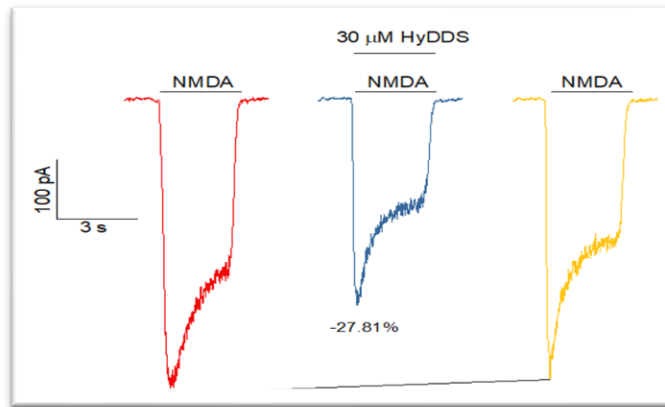


Figura 12. Trazos representativos de hidroxilaminadapsona 30 μ M. Se puede observar que hidroxilaminadapsona 30 μ M disminuye la I_{NMDA} 27.81 % al pico, en esta célula.

17.5. Hidroxilaminadapsona 10 μ M

La siguiente concentración utilizada fue Hidroxilaminadapsona 10 μ M, donde el efecto para el pico de la I_{NMDA} fue de 18.20 %, con una muestra de 15 células a las cuáles se aplicó dicha concentración, una de estas células representa la figura (13).

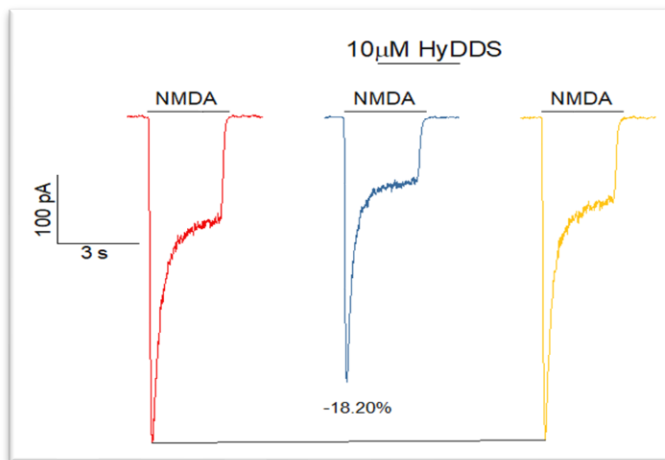


Figura 13. Trazos representativos de hidroxilaminadapsona 10 μ M. Se puede observar que hidroxilaminadapsona 10 μ M disminuye la I_{NMDA} 18.20% al pico, en esta célula.

17.6. Hidroxilaminadapsona 3 μM

La siguiente concentración utilizada fue Hidroxilaminadapsona 3 μM , donde el efecto para el pico de la I_{NMDA} fue de 22.81 %, con una muestra de 15 células a las cuáles se aplicó dicha concentración, una de estas células representa la figura (14)

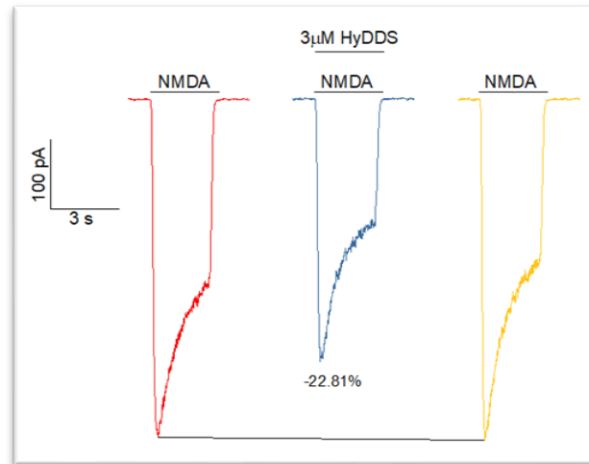


Figura 14. Trazos representativos de hidroxilaminadapsona 3 μM . Se puede observar que hidroxilaminadapsona 3 μM disminuye la I_{NMDA} 22.81 % al pico, en esta célula.

17.7. Hidroxilaminadapsona 1 μM

La última concentración utilizada fue Hidroxilaminadapsona 1 μM , donde el efecto para el pico de la I_{NMDA} fue de 12.18%, con una muestra de 15 células a las cuáles se aplicó dicha concentración, una de estas células representa la figura (15)

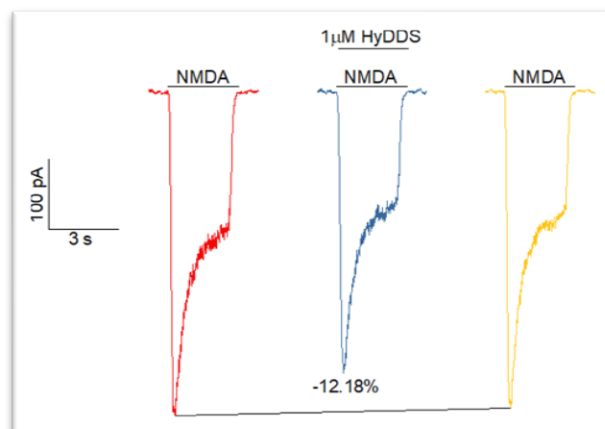


Figura 15. Trazos representativos de hidroxilaminadapsona 1 μM . Se puede observar que hidroxilaminadapsona 1 μM disminuye la I_{NMDA} 12.18% al pico, en esta célula.

17.8. Curva dosis respuesta de hidroxilaminadapsona

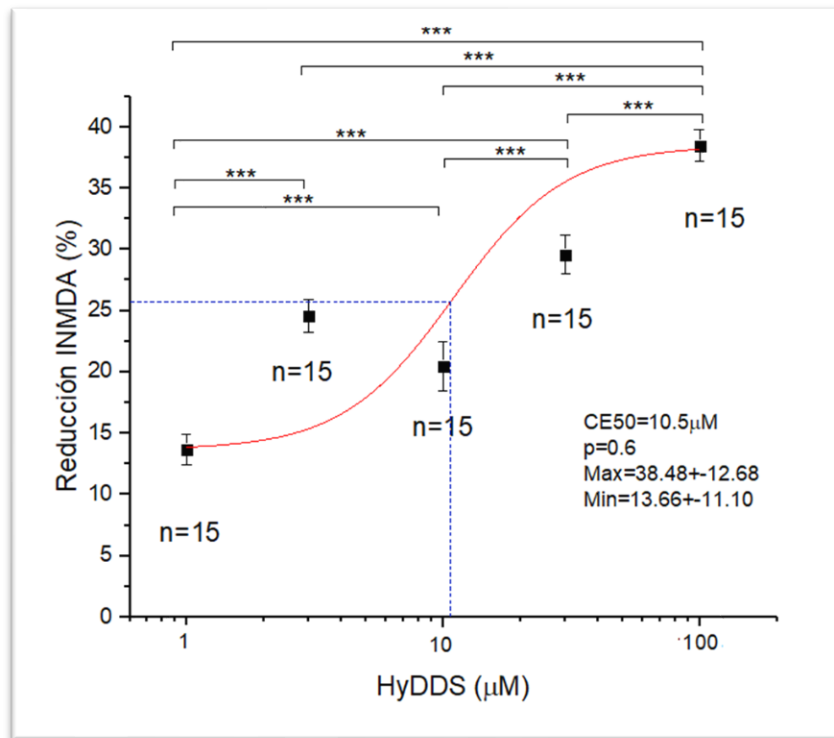


Figura 16. Curva dosis respuesta de hidroxilaminadapsona sobre la INMDA (pico).

En la figura 16 muestro la curva dosis respuesta del efecto de hidroxilaminadapsona sobre las corrientes de NMDA (100 μM). En donde se encontró un valor de p de 0.671, con un efecto mínimo de -13.66 ± 11.10 % y un efecto máximo de 38.48 ± 12.68 %.

17.9. Protocolo de rampa

El segundo protocolo electrofisiológico aplicado a cada neurona, con el metabolito monoacetildapsona, para observar la viabilidad neuronal, tal como se observa en la figura 17.

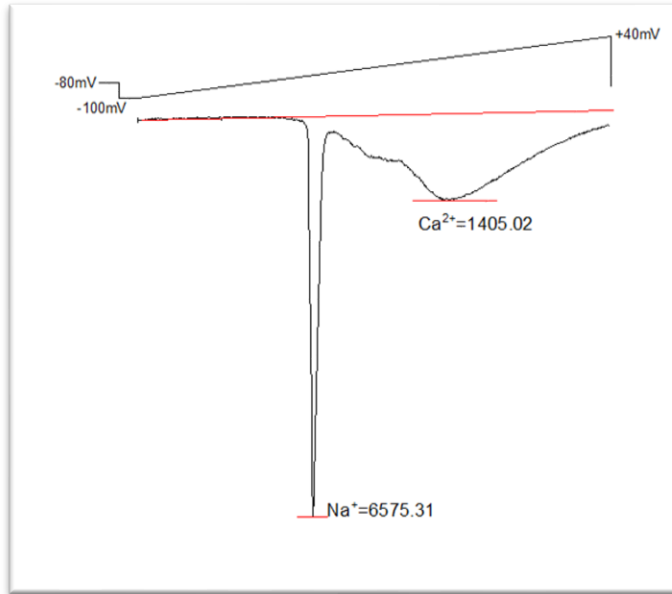


Figura 17. Rampa de voltaje. Esta figura representa el registro electrofisiológico característico de una célula a la que se le aplicó la rampa de voltaje, que inicia con la célula fijada a un voltaje de -80mV y que cambia a -100mV para ascender de forma gradual hasta los $+40\text{mV}$ con una duración de 100ms .

Con este protocolo se puede observar que en esta neurona la corriente de Na^+ (dependiente de voltaje) fue de 6575.31 pA al pico y la activación de la corriente de Ca^{2+} (dependiente de voltaje) fue de 1405.02 pA .

Resultados del tercer objetivo

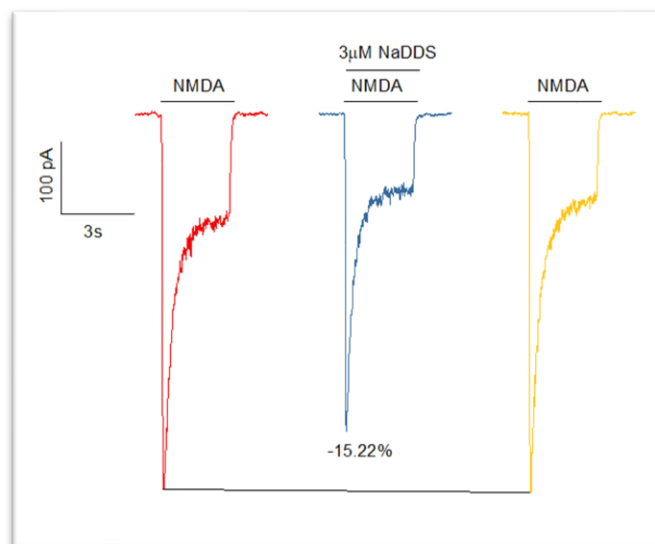


Figura 18. Esquema representativo de la disminución de la I_{NMDA} en presencia de Monoacetildapsona.

En este objetivo se propuso probar el efecto de Monoacetildapsona en el cual observamos en el esquema el primer trazo en color rojo, que muestra la condición control, el segundo trazo (azul) representa la aplicación de Monoacetildapsona (en esta célula con una reducción de la corriente al pico del 15.22 %) y el último trazo muestra el lavado (amarillo). La condición de lavado se realizó con la misma solución que el control y se empleó para mostrar que el efecto de la monoacetildapsona es reversible. La fórmula mostrada en el esquema se utilizó para obtener el porcentaje del efecto de hidroxilaminadapsona sobre la I_{NMDA} .

A continuación, se muestran los trazos representativos de cada concentración utilizada, donde el porcentaje representado en cada trazo corresponde a la célula y no al promedio de toda la muestra.

17.10. Monoacetildapsona 100 μ M

La concentración más alta utilizada de Monoacetildapsona fue de 100 μ M, en el cual se obtuvo una disminución de 20.61 % de la I_{NMDA} al pico, con una muestra de 15 células a las cuáles se aplicó dicha concentración, una de estas células representa la figura (19)

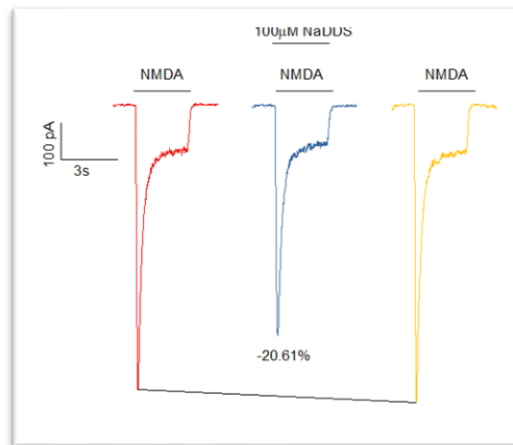


Figura 19. Trazos representativos de monoacetildapsona 100 μ M. El porcentaje mostrado se toma del promedio del control y la condición de lavado. Se puede observar que monoacetildapsona 100 μ M disminuye la I_{NMDA} 20.61 % al pico de la corriente en esta neurona.

17.11. Monoacetildapsona 30 μ M

La siguiente concentración utilizada fue Monoacetildapsona 30 μ M, donde el efecto para el pico de la I_{NMDA} fue de 16.07 %, con una muestra de 15 células a las cuáles se aplicó dicha concentración, una de estas células representa la figura (20)

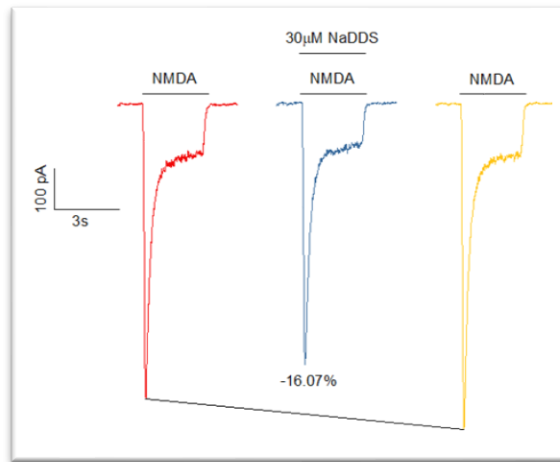


Figura 20. Trazos representativos de monoacetildapsona 30 μ M. Se puede observar que monoacetildapsona 30 μ M disminuye la I_{NMDA} 16.07% al pico, en esta célula.

17.12. Monoacetildapsona 10 μ M

La siguiente concentración utilizada fue Monoacetildapsona 10 μ M, donde el efecto para el pico de la I_{NMDA} fue de 24.91 %, con una muestra de 15 células a las cuáles se aplicó dicha concentración, una de estas células representa la figura (21).

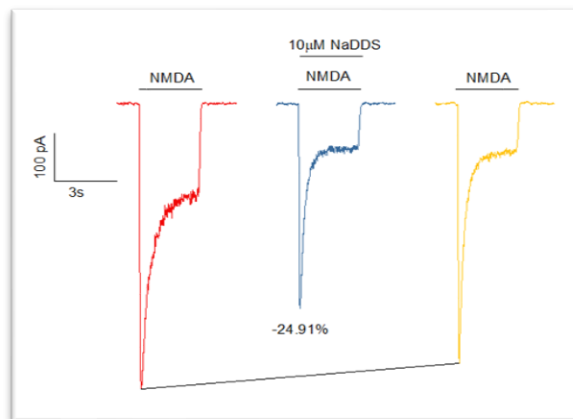


Figura 21. Trazos representativos de monoacetildapsona 10 μ M. Se puede observar que monoacetildapsona 10 μ M disminuye la I_{NMDA} 24.91% al pico, en esta célula.

17.13. Monoacetildapsona 3 μM

La siguiente concentración utilizada fue Monoacetildapsona 3 μM , donde el efecto para el pico de la I_{NMDA} fue de 15.22 %, con una muestra de 15 células a las cuáles se aplicó dicha concentración, una de estas células representa la figura (22)

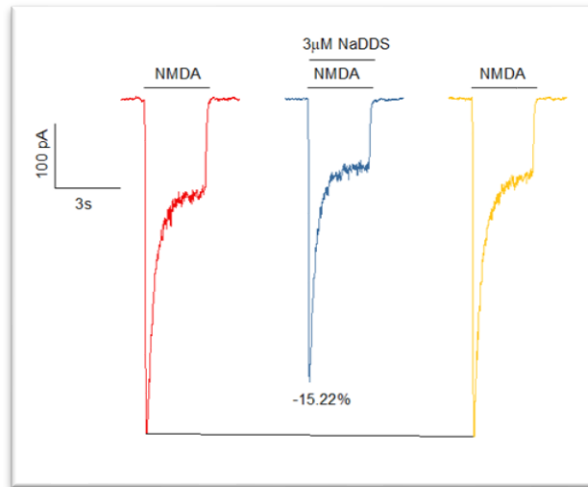


Figura 22.. Trazos representativos de monoacetildapsona 3 μM . Se puede observar que monoacetildapsona 3 μM disminuye la I_{NMDA} 15.22 % al pico, en esta célula.

17.14. Monoacetildapsona 1 μM

La siguiente concentración utilizada fue Monoacetildapsona 1 μM , donde el efecto para el pico de la I_{NMDA} fue de 18.93 %, con una muestra de 15 células a las cuáles se aplicó dicha concentración, una de estas células representa la figura (23)

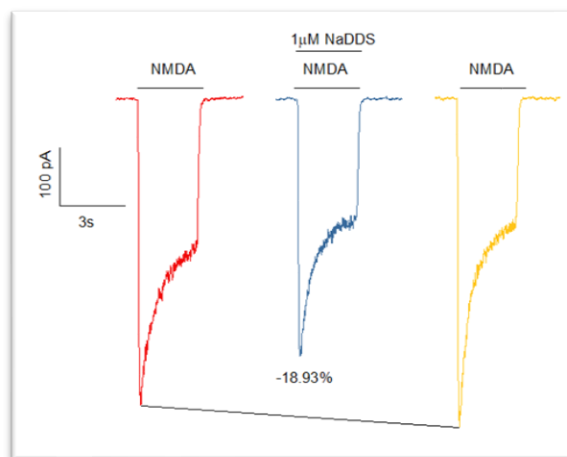


Figura 23. Trazos representativos de monoacetildapsona 1 μM . Se puede observar que monoacetildapsona 1 μM disminuye la I_{NMDA} 18.93% al pico, en esta célula.

17.15. Monoacetildapsona 500 η M

La siguiente concentración utilizada fue Monoacetildapsona fue de 500 η M, en el cual se obtuvo una disminución de 25.60 % de la I_{NMDA} al pico, con una muestra de 15 células a las cuáles se aplicó dicha concentración, una de estas células representa la figura (24).

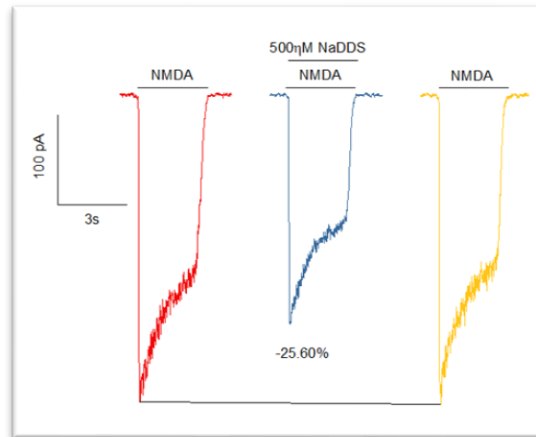


Figura 24. Trazos representativos de monoacetildapsona 500 η M. El porcentaje mostrado se toma del promedio del control y la condición de lavado. Se puede observar que monoacetildapsona 500 η M disminuye la I_{NMDA} 25.60% al pico de la corriente en esta neurona.

17.16. Monoacetildapsona 300 η M

La siguiente concentración utilizada fue Monoacetildapsona 300 η M, donde el efecto para el pico de la I_{NMDA} fue de 17.46 %, con una muestra de 15 células a las cuáles se aplicó dicha concentración, una de estas células representa la figura (25)

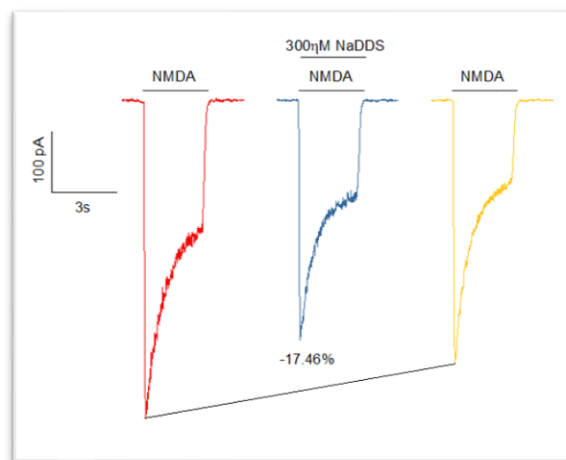


Figura 25. Trazos representativos de monoacetildapsona 300 η M. Se puede observar que monoacetildapsona 300 η M disminuye la I_{NMDA} 17.46 % al pico, en esta célula.

17.17. Monoacetildapsona 100 η M

La siguiente concentración utilizada fue Monoacetildapsona 100 η M, donde el efecto para el pico de la I_{NMDA} fue de 17.31 %, con una muestra de 15 células a las cuáles se aplicó dicha concentración, una de estas células representa la figura (26).

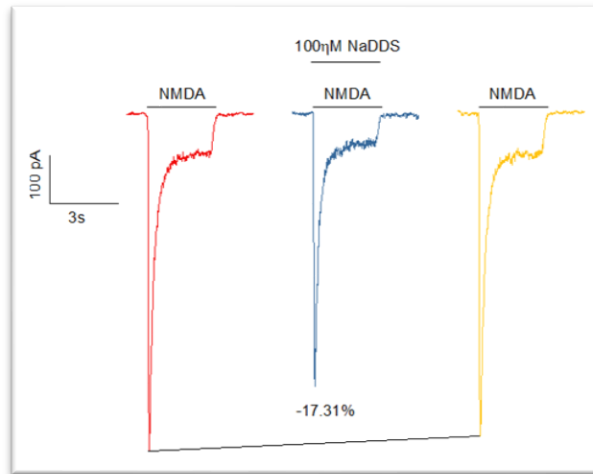


Figura 26. Trazos representativos de monoacetildapsona 100 η M. Se puede observar que monoacetildapsona 10 μ M disminuye la I_{NMDA} 17.31% al pico, en esta célula.

17.18. Monoacetildapsona 30 η M

La siguiente concentración utilizada fue Monoacetildapsona 30 η M, donde el efecto para el pico de la I_{NMDA} fue de 16.95 %, con una muestra de 15 células a las cuáles se aplicó dicha concentración, una de estas células representa la figura (27)

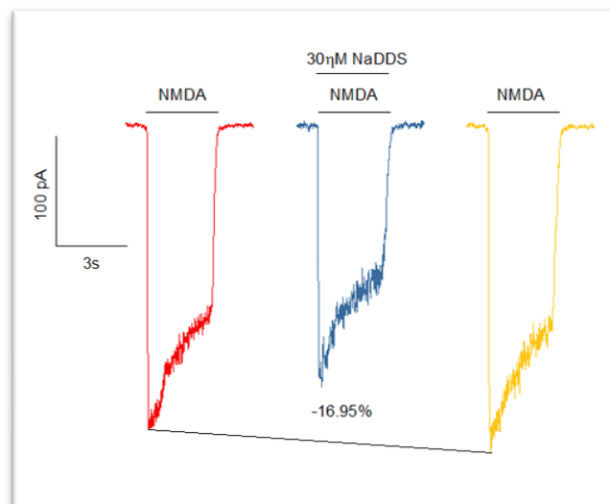


Figura 27. Trazos representativos de monoacetildapsona 30 η M. Se puede observar que monoacetildapsona 30 η M disminuye la I_{NMDA} 16.95% al pico, en esta célula.

17.19. Monoacetildapsona 10 η M

La siguiente concentración utilizada fue Monoacetildapsona 10 η M, donde el efecto para el pico de la I_{NMDA} fue de 12.86 %, con una muestra de 15 células a las cuáles se aplicó dicha concentración, una de estas células representa la figura (28)

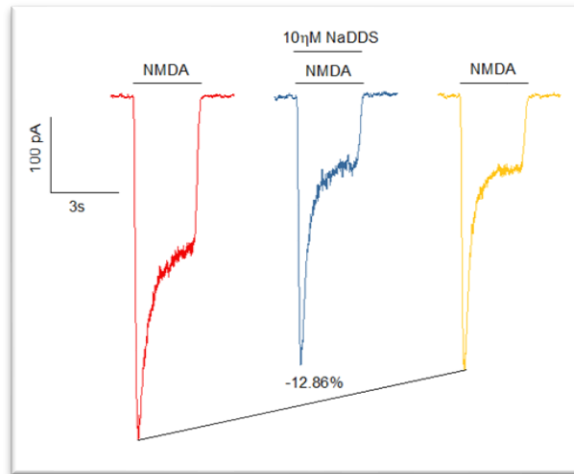


Figura 28. Trazos representativos de monoacetildapsona 10 η M. Se puede observar que monoacetildapsona 10 η M disminuye la I_{NMDA} 12.86% al pico, en esta célula

17.20. Monoacetildapsona 3 η M

La siguiente concentración utilizada fue Monoacetildapsona 3 η M, donde el efecto para el pico de la I_{NMDA} fue de 11.53 %, con una muestra de 15 células a las cuáles se aplicó dicha concentración, una de estas células representa la figura (29)

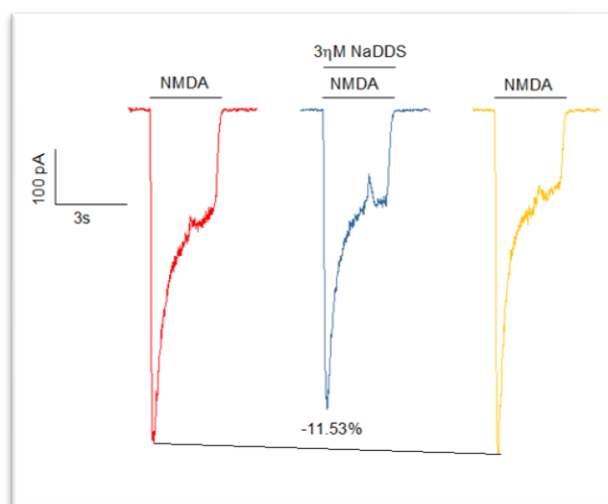


Figura 29. Trazos representativos de monoacetildapsona 3 η M. Se puede observar que monoacetildapsona 3 η M disminuye la I_{NMDA} 11.53% al pico, en esta célula.

17.21. Monoacetildapsona 1 η M

La siguiente concentración utilizada fue Monoacetildapsona 1 η M, donde el efecto para el pico de la I_{NMDA} fue de 6.18 %, con una muestra de 15 células a las cuáles se aplicó dicha concentración, una de estas células representa la figura (30)

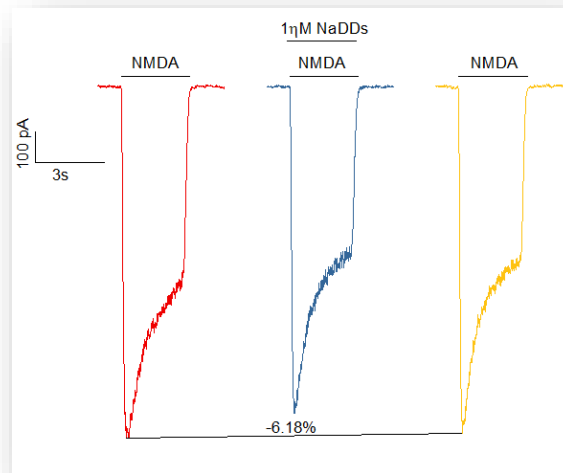


Figura 30. Trazos representativos de monoacetildapsona 1 η M. Se puede observar que monoacetildapsona 1 η M disminuye la I_{NMDA} 6.18% al pico, en esta célula.

17.22. Curva dosis respuesta de Monoacetildapsona.

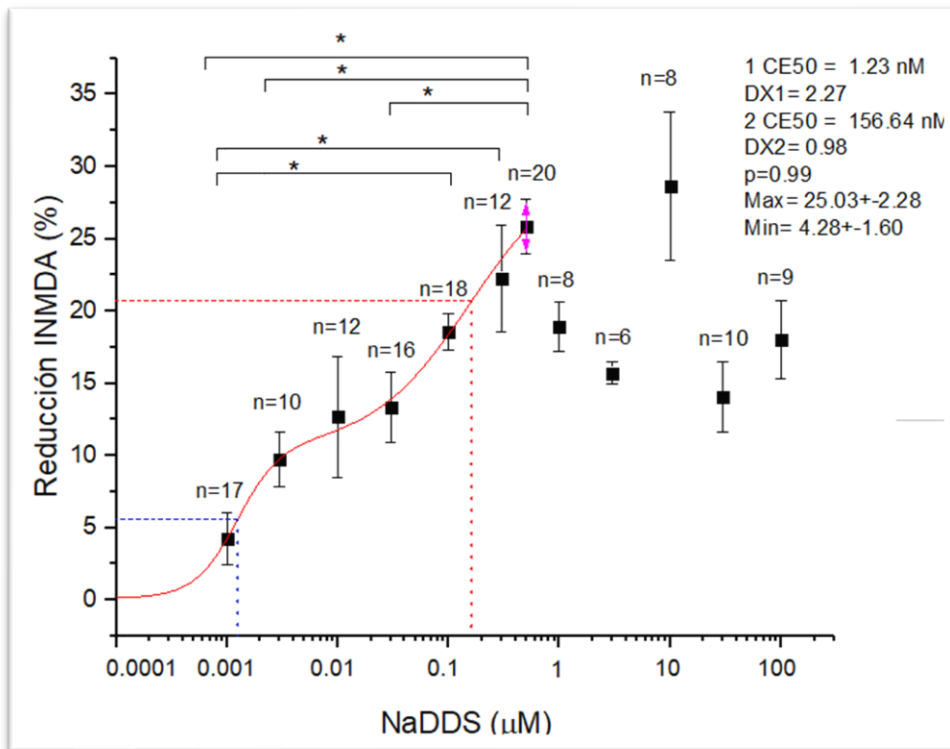


Figura 31. Curva dosis respuesta de monoacetildapsona sobre la INMDA (pico).

En la figura 31 muestro la curva dosis respuesta del efecto de la monoacetildapsona sobre las corrientes de NMDA ($100\mu\text{M}$). En donde se encontró un valor de p de 0.99, y con un doble ajuste logístico, se observa una doble sigmoide, sugiriendo que dicho metabolito tiene diferentes sitios activos a los que se une, provocando este fenómeno, en los resultados encontramos un efecto máximo de $-25.03 \pm 2.28 \%$ y un efecto mínimo de $4.28 \pm 1.60 \%$, así como una concentración efectiva 50 de 1.23 ηM para la primera sigmoide, con una reducción de 5.10 % de la corriente al pico, y la segunda sigmoide con una concentración efectiva 50 de 156.64 ηM , con una reducción de 20.30% al pico.

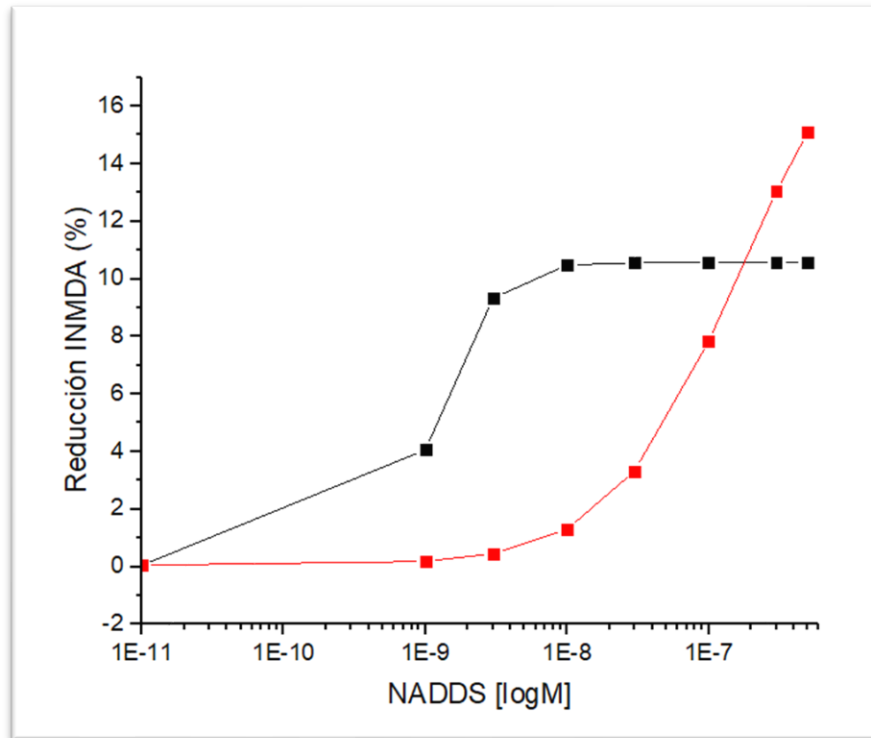


Figura 32. Gráfica en escala logarítmica de la diferencia del comportamiento de las dos sigmoides de la curva dosis respuesta de monoacetildapsona.

18. Discusión.

De los resultados obtenidos de las diferentes curvas dosis-respuesta, de los dos metabolitos (monoacetildapsona e hidroxilaminadapsona), y de la comparación entre la curva obtenida por Gómez-Gómez en 2019 en este laboratorio, se destaca un comportamiento similar entre los tres, esto probablemente, por que estén actuando sobre el mismo sitio de acción que la dapsona, sin embargo, para corroborar inicialmente habrá que realizar mayor número de registros sobre la misma zona, a mismas concentraciones y bloqueando el sitio de acción de la dapsona, con ácido 5-7 dicloroquinurénico (5,7- DCKA), y observar si presenta cambios en la corriente.

Es pertinente mencionar que existe la hipótesis de las vías activadas por diferentes receptores de NMDA, las cuales al momento de ser por vía sináptica, activan vías celulares que favorecen la supervivencia de las mismas, sin embargo, al activarse la INMDA por receptores localizados en zonas extra sinápticas, nos activa las vías

que favorecen la muerte neuronal, que compete en este estudio, a lo cual depende de la activación de dichas vías y los subtipos de receptores de NMDA, que como hemos mencionado antes, el más frecuente y convencional es el NMDAR con 2 GluN1 y 2 GluN2. Dicha hipótesis concuerda con la activación excesiva que se retroalimenta y provoca la excitotoxicidad y el hecho de ser objetivo terapéutico la disminución de la creciente la INMDA.

Conclusiones

- El efecto de la Monoacetildapsona sobre el NMDAR disminuye la INMDA.
- La concentración a la cual el efecto de la Monoacetildapsona es casi nulo, es 1nM.
- Para el pico de la corriente el efecto máximo se encuentra alrededor de la concentración de monoacetildapsona 500nM la cual no tiene diferencia estadísticamente significativa contra monoacetildapsona 100nM, 300nM, 1µM y 3µM.
- El efecto de la Hidroxilaminadapsona sobre el NMDAR disminuye la INMDA.
- La concentración a la cual el efecto mínimo encontrado en la hidroxilaminadapsona es 1µM.
- Para el pico de la corriente el efecto máximo se encuentra alrededor de la concentración de hidroxilaminadapsona 100µM la cual tiene diferencia estadísticamente significativa contra todas las dosis utilizadas por hidroxilaminadapsona.
- El fármaco más eficaz fue la hidroxilaminadapsona, esto por el valor del efecto máximo, seguido por la monoacetildapsona y finalmente la dapsona
- El más potente reductor de la corriente de NMDA es la monoacetildapsona, esto por alcanzar una concentración efectiva 50 a menor concentración, seguido de la dapsona y finalmente la hidroxilamina dapsona.

➤ Perspectivas

- Bajar concentración de hidroxilaminadapsona, a mismas dosis que la Monoacetildapsona.
- Bajar concentración de Monoacetildapsona para ver si en algún momento llega a cambiar el efecto.

- Corroborar si al disminuir la concentración de Monoacetildapsona, el efecto continúa disminuyendo.

19. Bibliografía

- Arundine, M., y Tymianski, M. (2003). Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. Elsevier Ltd, 34, 325-337.
- Brunton, L., Chabner, B. A., y Knollmann, B. C. (2011). Goodman & Gilman Las Bases farmacológicas de la Terapéutica (12th ed.). Mc Graw Hill. Pp. 123-125.
- Cantú-Brito C y Cuevas García C, Enfermedad Vasular Cerebral. Academia Mexicana de Neurología A.C., Clínicas Mexicanas de Neurología. 2012 May:1-13.
- Creutzfeldt, O. D. (1995). Cortex cerebri. Oxford: Oxford University Press.
- DAPSODERM-X. (n.d.). Retrieved April 23, 2019, from http://www.medicamentosplm.com/Home/productos/dapsoderm_x_tabletas/152/101/7130/210.
- Díaz-Ruiz, A., Zavala, C., Montes, S., Ortiz-Plata, A., Salgado-Ceballos, H., Orozco-Suarez, S., Ríos, C. y colaboradores (2008). Antioxidant, antiinflammatory and antiapoptotic effects of dapsone in a model of brain ischemia/reperfusion in rats. *Journal of Neuroscience Research*, 86(15), 3410–3419.
- Escobar, Martha I., y Pimienta, Hernan J. (2003, segunda reimpresión). Sistema nervioso. Cali, Colombia: Editorial Universidad del Valle.
- Fernández-Gómez, F. J., y Hernández, F. (2008). Farmacología de la neuroprotección en el ictus isquémico agudo. *REVISTA DE NEUROLOGÍA*, 253-260.

- Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vázquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E., y Beas-Zarate, C. (2012). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología*, 27(5), 301–310.
- Gómez-Gómez, V. (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 licenciatura no publicada. Instituto de Fisiología de la BUAP, Puebla, Puebla, México.
- GPC S-102-08: Diagnóstico y Tratamiento Temprano de la ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL ISQUEMICA en el segundo y tercer nivel de atención – Actualización 2017.
- GPC SS-102-08: Prevención secundaria, diagnóstico, tratamiento y vigilancia de la enfermedad vascular cerebral isquémica.
- Hall, J. E., y Guyton, A. C. (2016). *Guyton y Hall: Repaso de fisiología*. Barcelona: Elsevier, 707-709.
- Juárez-Nájera, A. (2016). Efecto de la dapsona en las subunidades del receptor NMDA: GluN2A y GluN2B en neuronas piramidales de las capas V y VI de corteza motora primaria de rata. Tesis de licenciatura. Instituto de Fisiología de la BUAP, Puebla, Puebla, México.
- Szydlowska, K. y Tymianski, M. (2010). Review, Calcium, ischemia and excitotoxicity. *ELSEVIER*, 47, 122-123.
- Kasper, B. H., Feng, Y.R., Perszyk, E., Furukawa,H., Wollmuth,L.P., Gibb, A.J. y Traynelis S.F. (2018). Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *Journal of General Physiology*. Volume 150 (8), 1081–1105
- Kiernan, J. (2009). Histología de la corteza cerebral. En Kiernan, J. A. (Ed.) *El sistema nervioso humano. Una perspectiva anatómica*. (pp. 245 - 253). EUA: Editorial Lippincott Williams & Wilkins.

- Kuklina E, Tong X, George M y Bansil P. Epidemiology and prevention of stroke: a worldwide perspective, *Expert Rev Neurother*. 2012 Feb; 12(2): 199–208.
- Laube, B., Kuhse, J., y Betz, H. (1998). Evidence for a Tetrameric Structure of Recombinant NMDA Receptors. *Journal of Neuroscience*, 2954-2961. doi:<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-08-02954.1998>.
- Lee-Rivera, I, y Lopez-Colomé, A. (2005). Relación de la estructura de los receptores NMDA con su función en la retina., *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 8(2), 71–81.
- Levin, L, y Peebles, P. (2008). History of Neuroprotection and Rationale as a Therapy for Glaucoma. *American Journal of Managed Care*, 14(2) S11-S14.
- Paoletti, P., y Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(1), 39–47.
- Mahmud, R, Tingle, M.D., Maggs, J. L., Cronin, M.T.D., Deardenb, J.C. y B.K. Park, (1997). Structural basis for the haemotoxicity of dapsone: the importance of the sulphonyl group. *ELSEVIER*, pp. 2.
- Ríos, C., Kawachi, J. N., y Payan, A. R. (2004). Neuroprotective effect of dapsone in an occlusive model of focal ischemia in rats. *Brain Research* 999, 212-215.
- Ruiz, A. D., Armenta, M. M., Ruiz, C. N., Garduño, C., Santander, I., Ruiz, A., y Ríos, C. (2015). Fenobarbital administrado sólo o en combinación con dapsona inhibe apoptosis y mejora la función motora después de una lesión traumática de la médula espinal en ratas. *Arch Neurocién (Mex)*, 20, 240-246.
- SINAVE/DGE/SALUD/Perfil Epidemiológico de las Enfermedades Cerebrovasculares en México, Julio 2012.

- Mori, H., & Mishina, M. (1995). Structure and Function of the NMDA Receptor Channel. *Neuropharmacology*, 34, 1219–1237.
- Valverde, F. (2002). Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Revista de Neurología*, 34(08), 0758-780.
- Villegas-Ronquillo, A. (2015). Efecto de N'-4,4'diaminodifenilsulfona sobre la corriente activada por N-Metil-D-Aspartato en neuronas piramidales de la corteza motora de rata. Tesis de Maestría. BUAP, Instituto de Fisiología.
- Vyklicky, V. Korinek, M, Smejkalova, T. y cols (2014). Structure, Function, and Pharmacology of NMDA Receptor Channels. *PHYSIOLOGICAL RESEARCH*, 63, S191–S203.
- Zhu, Y. I., y Stiller, M. J. (2001). Dapsone and sulfones in dermatology: overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 45(3), 420–434.