



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

Tesis

“Efecto de la Dapsona sobre la corriente de sodio activada por voltaje en neuronas piramidales de las capas V y VI de la corteza motora de rata”

Que para obtener el título de:

Licenciatura en Biomedicina

Presenta:

Luis Enrique Juárez Ramírez

Asesor experto

Dr. Jorge Luis Valente Flores Hernández

Asesor metodológico

Erika Lorena Arroyo Ríos

Puebla, Pue. Febrero de 2016



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

Tesis

“Efecto de la Dapsona sobre la corriente de sodio activada por voltaje en neuronas piramidales de las capas V y VI de la corteza motora de rata”

Que para obtener el título de:

Licenciatura en Biomedicina

Presenta:

Luis Enrique Juárez Ramírez

Asesor experto

Dr. Jorge Luis Valente Flores Hernández

Asesor metodológico

Erika Lorena Arroyo Ríos

Puebla, Pue. Febrero de 2016



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.
FACULTAD DE MEDICINA.
COORDINACIÓN DE EFICIENCIA TERMINAL EN PREGRADO

FORMATO "B" DE AUTORIZACIÓN DE PROTOCOLO.
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA.

DATOS DEL SOLICITANTE.

Nombre Completo: Luis Enrique Juárez Ramírez Matrícula: 201022493

Correo Electrónico: manutd_enju17@hotmail.com Teléfono: (246) 4672229 / Cel.: 2461348167

Firma:

TÍTULO DE LA TESIS: Efecto de la Dapsona sobre la corriente de sodio activada por voltaje en neuronas piramidales de las capas V y VI de la corteza motora de rata

ÁREA: Salud

Director Experto de la Tesis: Dr. Jorge Luis Valente Flores Hernández No. de Trabajador: 100317188

Teléfono: 2295500 Ext. 7325 Correo Electrónico: jlvflores@hotmail.com

Firma:

Director Metodológico de la Tesis: Erika Lorena Arroyo Ríos No. de Trabajador: 100518899

Teléfono: 2223505055 Correo Electrónico: lorena_arroyorios@hotmail.com

Firma:

REVISIÓN DEL PROTOCOLO:

Es responsabilidad de los asesores de la tesis guiar al estudiante en la aplicación rigurosa de la Metodología Científica de Investigación en relación al problema que se estudia.

Firma del Director Metodológico que revisó el Protocolo: Fecha de Revisión: 10 de mayo de 2015

Firma del Revisor que examinó el Protocolo: Fecha de Revisión: 20 de mayo de 2015

Firma del Coordinador de Eficiencia Terminal en Pregrado: Fecha de Revisión: 27/05/15

Fecha de Revisión del Comité de Investigación: 19.07.2015

Al final de estos trámites la Coordinación de Eficiencia Terminal en Pregrado, enviará el Proyecto al Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, una vez expedido el Dictamen de Protocolo de Investigación, podrá autorizar la elaboración de la Tesis.

Coordinador de Eficiencia Terminal en Pregrado

02/02/16
 Fecha de Autorización



Esta tesis está dedicada a las personas importantes en mi vida:

A mis padres, por apoyarme en todo momento.

A mis hermanos, por darme el ejemplo y la experiencia, de que no hacer.

A mis primos, por brindarme su compañía en los momentos más difíciles.

A mis compañeros de generación, por hacer muy divertida esta etapa de la vida.

A mis compañeros del Laboratorio de Neuromodulación, por alegrarme los días en el laboratorio.

A mi novia, que fue testigo de cada paso en la realización de esta investigación.

Y por último, a mi abuelita, que con tanto cariño siempre estuvo conmigo.

A todos ustedes, gracias.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes	2
2.1 Antecedentes Generales	2
2.1.1 Corteza cerebral.....	2
2.1.1.1 Corteza motora.....	2
Figura 1: Imagen lateral del encéfalo que muestra las principales áreas funcionales de la corteza cerebral.	3
2.1.1.2 Neuronas de la corteza motora	4
Figura 2: Sección de un corte coronal (15 μm de ancho) del cerebro de rata.....	5
2.1.1.3 Conexiones de la corteza motora.....	6
2.1.1.4 Neurona piramidal gigante	6
Figura 3: Capas de la corteza cerebral	7
Capas de la corteza cerebral	7
Figura 4: Representación esquemática de las fibras y organización neuronal de la corteza cerebral.	8
2.1.2 Traumatismo craneoencefálico	9
2.1.2.1 Muerte neuronal y neuroinflamación	10
Figura 5: Cascada neurometabólica seguida de un traumatismo cerebral.....	12
2.1.2.2 Glutamato y la excitotoxicidad.....	13
2.1.2.3 Farmacología de la lesión cerebral	14
2.1.3 Canales de sodio sensibles a voltaje	15
2.1.3.1 Estructura y topología del canal de sodio.....	16
Tabla 1. Subunidades α de los canales de sodio de mamíferos.....	17
Figura 6: Estructura y topología de los canales Nav.....	18
2.1.3.2 Bases estructurales para la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje.....	18

Figura 7: Estructura de los canales de sodio dependientes de voltaje.....	19
2.1.4 Dapsona	20
Figura 8. Estructura de la Dapsona.	20
2.1.4.1 Farmacología de la Dapsona	21
2.1.4.2 Mecanismo de acción de la Dapsona.....	22
2.2 Antecedentes específicos.....	22
3. Planteamiento del problema.....	25
4. Hipótesis.....	26
5. Objetivos	26
6. Metodología.....	28
6.1 Protocolos electrofisiológicos	31
6.1.1 RAMPA.....	31
6.1.2 Pulso	32
6.1.3 IV (Corriente-Voltaje).....	32
6.2 Análisis de datos	32
7. Bioética.....	34
8. Resultados	38
8.1 Parámetros.....	38
Figura 9 y 10: Morfología de las neuronas piramidales gigantes.....	38
8.2 Resultados de los protocolos aplicados.	39
Gráfica 1: Registro de corrientes de Na ⁺ y Ca ⁺²	39
8.3 Efecto de la Dapsona sobre la corriente de Na ⁺ activada por voltaje.....	40
Gráfica 2: Trazos representativos del efecto de la Dapsona en la corriente de Na ⁺ activada por voltaje.....	40
Gráfica 3: Curva de concentración – efecto de la Dapsona.	41
8.4 Voltaje - dependencia del efecto de la Dapsona sobre el pico de la corriente de sodio.....	42

Gráfica 4: Trazo de la reducción de la corriente de sodio, bajo el efecto de la Dapsona a diferentes concentraciones, sometidas a un protocolo de Corriente-Voltaje.....	42
8.5 Efecto de la Dapsona sobre el Tiempo al pico	43
Gráfico 5: Trazos representativos del tiempo al pico de sodio bajo el efecto de Dapsona.....	43
8.6 Efecto de la Dapsona sobre la constante de inactivación.	44
Gráfico 6: Trazos representativos de la constante de inactivación de sodio bajo el efecto de Dapsona.....	44
9. Discusión.....	45
9.1 Efecto de la Dapsona sobre la corriente de sodio activada por voltaje.	45
10. Conclusiones.....	48
11. Referencias	49

Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico.

ATP: Adenosin Trifosfato.

BHE: Barrera Hematoencefálica

Ca⁺²: Ión Calcio.

CDP: Citidin Difosfato.

CE₅₀: Concentración Efectiva 50.

Cl⁻: Ión Cloro.

CM: Corteza Motora.

DMSO: Dimetil Sulfoxido.

DDS-NOH: Dapsona-Hidroxilamina.

EBSS: Solución Salina Balanceada de Earle.

FDA: Food and Drug Administration.

GABA: Ácido γ -aminobutírico.

HBSS. Solución Salina Balanceada de Hanks.

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinaetanosulfónico.

HETE: Ácido Hidroxi-eicosatetraenoico.

K⁺: Ión Potasio.

LT: Leucotrieno.

M1: Corteza Motora Primaria.

MADDs: Monoacetil Dapsona.

MCA: Arteria Media Cerebral.

Na⁺: Ión Sodio.

Nav: Canales de Sodio sensibles a Voltaje.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NMDG: N-Metil-d-Glucamina.

PMN: Polimorfonuclear.

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno.

RNS: Especies Reactivas de Nitrógeno.

SMA: Área Motora Suplementaria.

SNC: Sistema Nervioso Central.

TCE: Traumatismo Cráneoencefálico.

TM: Transmembranal.

Resumen

El presente trabajo de investigación se elaboró con el fin de evaluar el efecto que tiene la Dapsona sobre la corriente de sodio activada por voltaje en neuronas de la corteza motora de rata, capas V y VI.

Para lo cual se establecieron los siguientes objetivos: Como objetivo principal, determinar el efecto de la Dapsona sobre la corriente de sodio activada por voltaje en las neuronas piramidales de la corteza motora, agudamente disociadas, de la rata. Como objetivos particulares, realizar la curva de voltaje dependencia del efecto de la Dapsona sobre el pico de la corriente de sodio, medir el tiempo al pico y la amplitud al pico de la corriente de sodio por un pulso 20 ms de -80 a 0 mV y finalmente, medir la constante de tiempo de inactivación de la corriente de sodio por un pulso 20 ms de -80 a 0 mV.

La experimentación se realizó en el Laboratorio de Neuromodulación, dirigido por el Doctor Jorge Luis Valente Flores Hernández, en el Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Primeramente, se adquirieron ratas macho cepa Wistar de 100 a 120 gramos, con 30 días de edad, estas se obtuvieron del bioterio Claude Bernard, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Posteriormente, en cada protocolo se utilizó una rata de la cual se obtiene el cerebro, del cual se sacan cortes coronales de 350 μm de la corteza motora para su incubación. Después de la incubación, los cortes se someten a un tratamiento enzimático con papaína. Al terminar el tratamiento enzimático se hace una disociación mecánica de las neuronas. Las neuronas obtenidas se fijan en cajas de Petri de poliestireno. Finalmente, se aplica el registro electrofisiológico de neuronas piramidales por medio de la técnica de fijación de voltaje en la modalidad de célula completa, esto con el objetivo de la obtención y análisis de resultados.

Los resultados mostraron que la corriente de sodio disminuye al aplicarse Dapsona, mostrando su mayor efecto a la concentración 300 μM , con una reducción de 22.42%. La Dapsona no tiene una relación dependiente de voltaje para bloquear la corriente de sodio activada por voltaje. La Dapsona no modifica el tiempo al pico a excepción de la concentración 300 μM , en la cual el tiempo al pico aumenta. La constante de inactivación de la corriente de sodio activada por voltaje tampoco se ve afectada al administrar Dapsona.

1. Introducción

En la actualidad el desarrollo de un fármaco neuroprotector es de vital importancia, ya una parte importante de la población mundial muere a causa de los accidentes cerebrovasculares, además los pacientes que logran sobrevivir al ictus cerebral se ven impedidos por alguna discapacidad cerebral. Las consecuencias después de la lesión celular se deben principalmente al hecho al daño causado alrededor de la lesión original, esta zona circundante se le llama penumbra, la cual es el objetivo de los fármacos neuroprotectores, limitar el daño y evitar que la muerte celular se extienda.

La Dapsona es el fármaco usado en esta investigación, originalmente usado como medicamento en contra de la lepra, se ha propuesto su efecto neuroprotector. Un grupo de dermatólogos notaron que pacientes que sufrían de lepra y que tenían un accidente cerebrovascular, se recuperaban rápidamente al ser tratados con el antibiótico.

Sin embargo, el mecanismo de acción de la Dapsona aún no es plenamente conocido, es por ello, que en esta investigación, es de suma importancia evaluar el efecto de la Dapsona sobre los canales de sodio activados por voltaje en neuronas piramidales de la corteza motora de rata, capas V y VI.

En la investigación se propone investigar principalmente, si la Dapsona reduce la corriente de sodio activada por voltaje, también investigar la Dapsona es dependiente del voltaje para modificar la corriente de sodio activada por voltaje. Observar si la Dapsona modifica el tiempo al pico de la corriente de sodio activada por voltaje, así como su constante de inactivación.

2. Antecedentes

2.1 Antecedentes Generales

2.1.1 Corteza cerebral

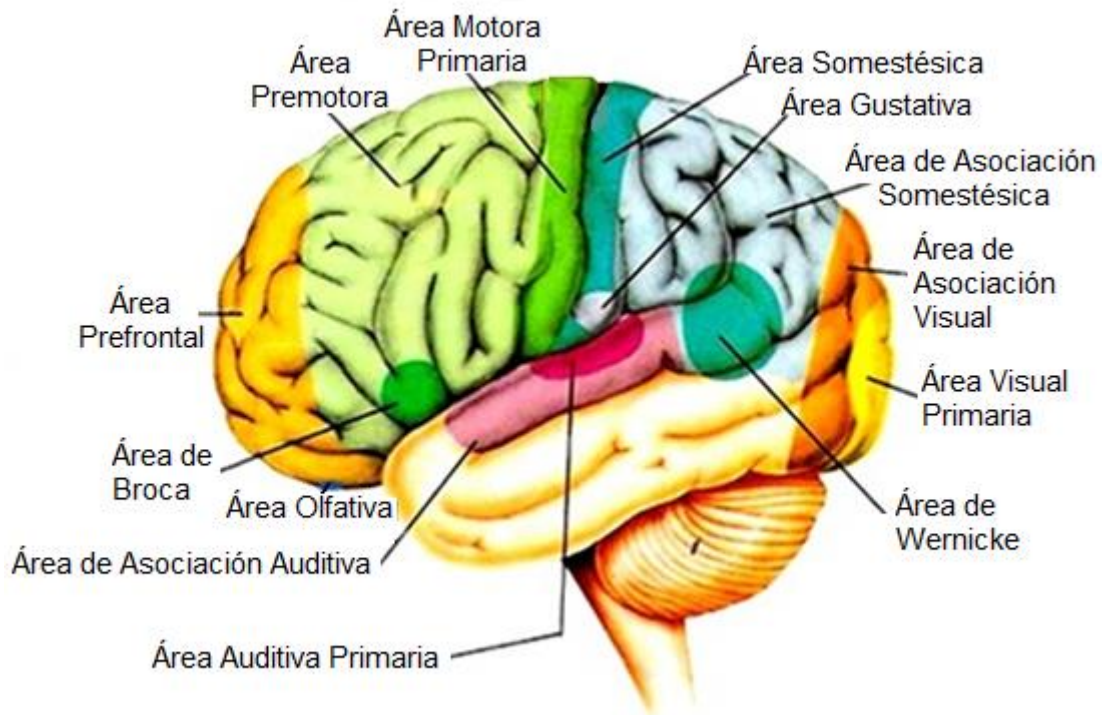
El funcionamiento de la corteza cerebral se divide en áreas que se desempeñan primordialmente en el procesamiento de la información sensitiva y la ejecución de las funciones motoras. El cerebro comprende también de áreas interactivas de la información, que junto con las áreas sensitivas y motoras forman la corteza cerebral (Figura 1) (Fuster, 2001).

Las regiones principales sensitivas, motoras y de asociación de orden superior se dividen en tres áreas vitales: el área de asociación posterior, ubicada en la frontera de los lóbulos parietal, temporal y occipital, esta área se encarga de integrar la información de los diferentes estímulos sensitivos para la percepción y el lenguaje; el área límbica de asociación, se encarga de las emociones y el almacenaje de la memoria; y la corteza prefrontal, se ocupa de la planificación de los movimientos (Fuster, 2001).

2.1.1.1 Corteza motora

La corteza motora es un área del lóbulo frontal localizada en la circunvolución precentral dorsal, inmediatamente anterior al surco central, es la región de la corteza cerebral que está involucrada en la planeación, el control y la ejecución de movimientos voluntarios (Kandel *et al.*, 2000).

Figura 1: Imagen lateral del encéfalo que muestra las principales áreas funcionales de la corteza cerebral.



Modificado de Kandel *et al.*, 2000.

La corteza motora puede ser dividida en tres áreas (Sánchez & Albina, 2003):

1. La corteza motora primaria (M1), es la principal contribuyente para generar los impulsos neurales que se transmiten hacia la médula espinal y controlar la ejecución del movimiento.
2. La corteza premotora es responsable de algunos aspectos del control motor, posiblemente incluyendo la preparación del movimiento, la orientación sensorial del movimiento, la orientación espacial o el control directo de algunos movimientos con énfasis del control de los músculos proximales y del tronco. Se encuentra localizada anterior a la M1.

3. El área motora suplementaria (SMA), tiene muchas funciones propuestas, incluyendo la planificación del movimiento generado internamente, la planeación de secuencias de movimiento y la coordinación de ambos lados del cuerpo como la coordinación de ambas manos. Se encuentra localizada en la superficie media del hemisferio anterior de la M1 (Sánchez *et al.*, 2003).

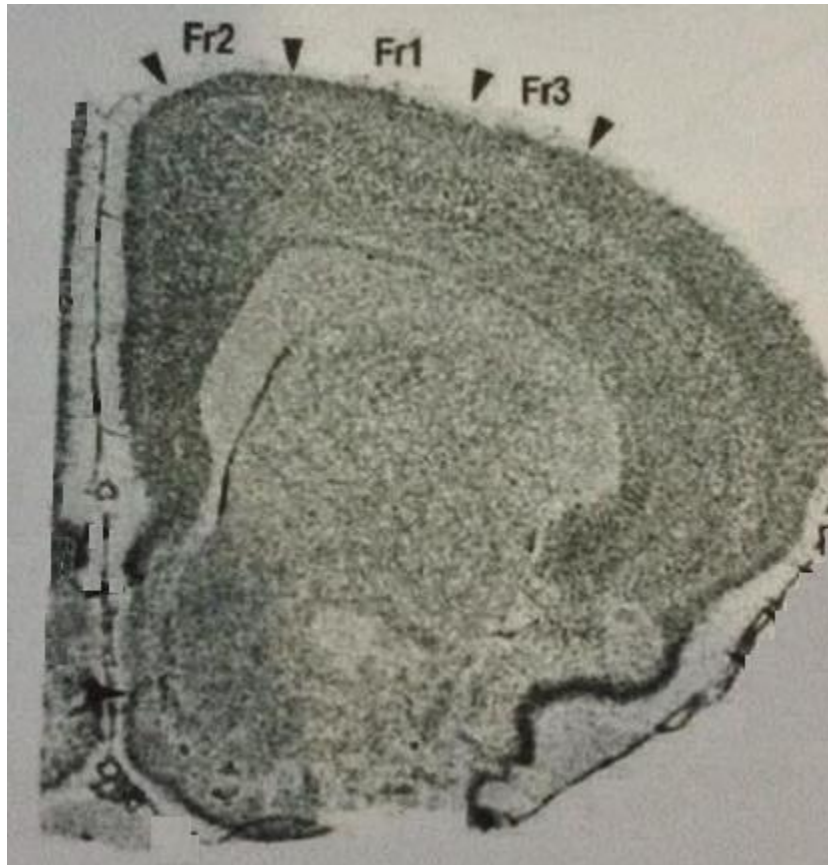
En mamíferos inferiores como es el caso de la rata, la corteza frontal se divide en tres regiones: la corteza motora, la corteza orbitofrontal y la corteza media prefrontal (Ueta, 2013). En la rata hay dos subdivisiones de las áreas motoras, la zona de las extremidades anteriores o rostrales y la zona caudal de las extremidades posteriores (Levine, 2012).

En la isocorteza frontal se representa la corteza motora en la rata. Basado en su citoarquitectura y patrones de conexión se han definido tres áreas: Fr1, Fr2 y Fr3 (Figura 2). Fr1 representa la corteza motora primaria, Fr2 es el equivalente anatómico a la zona premotora en el primate, motora suplementaria y el área de campo visual frontal y Fr3 es un subcampo somatotópico (Paxinos, 2004).

2.1.1.2 Neuronas de la corteza motora

La corteza cerebral tiene seis capas principales (Figura 3): la capa I o capa plexiforme externa, en la cual el número de células es mínimo; capas II, capa de células piramidales pequeñas (también se conoce como capa granular externa); capa III, la capa de células piramidales medianas; la capa IV o capa granular interna, contiene células piramidales de tamaño parecido a la capa II, además de poseer células estrelladas (la capa IV se encuentra ausente en la corteza motora); la capa V o capa de células piramidales gigantes; la capa VI o capa de células fusiformes, sus células tienen una forma irregular o polimorfos (Valverde, 2002).

Figura 2: Sección de un corte coronal (15 μm de ancho) del cerebro de rata.



Sección de un corte coronal (15 μm de ancho) del cerebro de rata, mostrando las zonas Fr1, Fr2 y Fr3. Fr1, corresponde a la corteza motora primaria. Fr2, es la zona equivalente a la corteza motora en primate. Fr3, subcampo somatotópico del Fr1 (Modificado de Paxinos, 2004).

En la corteza de barril de la rata, aproximadamente del 88 al 89 % de 19,000 neuronas asociadas a un barril, son excitadoras; por el contrario de 11 a 12% son interneuronas GABAérgicas (Feldemeyer, 2012). Cada capa tiene su propia característica, determinado por el tipo de célula que posee y sus proyecciones a otras capas, sin embargo, las capas trabajan conjuntamente, no son independientes entre sí. Por lo tanto, las capas de la corteza poseen una organización funcional de conjuntos celulares arreglados verticalmente en torno a un eje central, el cual es representado por las fibras aferentes corticales. Además

junto con las neuronas, existen neuronas gliales, vasos y fibras nerviosas organizadas en capas paralelas (Valverde, 2002).

2.1.1.3 Conexiones de la corteza motora

En la corteza motora (CM) prevalecen las capas I, III y V. La capa V se compone de neuronas piramidales gigantes, que proyectan sus axones hacia los núcleos motores contralaterales de los nervios craneales y hacia las motoneuronas inferiores del asta ventral de la médula. Estas proyecciones forman el tracto corticospinal (Herculano *et al.*, 2010). Los axones del tracto corticospinal atraviesan la sustancia blanca y se van uniendo hasta formar una parte de la cápsula blanca. Posteriormente, las proyecciones atraviesan los ganglios basales y llegan al bulbo raquídeo donde se cruzan para formar la decusación de las piramidales que desciende a la médula espinal (Nieuwenhuys *et al.*, 2009).

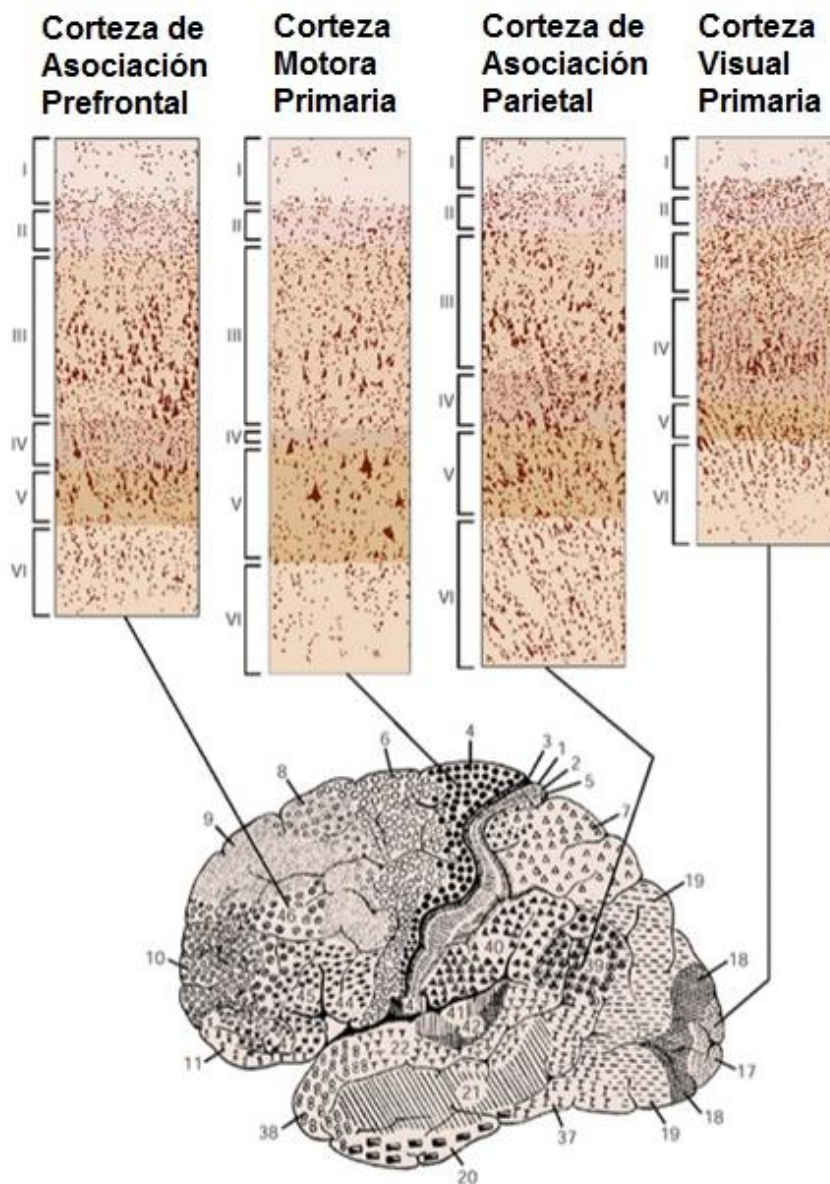
La CM es inervada por axones provenientes del tálamo, de la corteza frontal y la corteza parietal. La información somatosensorial alcanza la CM por vía del tálamo sensorial y el tálamo motor (núcleos anteromedial, ventral anterior y ventrolateral) (Hooks *et al.*, 2013). Las entradas procedentes del tálamo terminan en la capa IV, de ahí se transmite a la capa III, posteriormente a las capas V y VI, desde donde la señal parte de la corteza (Bannister, 2005). En la Figura 4 se muestran conexiones de la corteza cerebral.

2.1.1.4 Neurona piramidal gigante

Las neuronas piramidales se caracterizan por sus distintas arborizaciones dendríticas apical y basal y por la forma piramidal de su soma. Se encuentran en diversas regiones del SNC (Spruston, 2008). Las células piramidales gigantes o células de Betz, se localizan en la capa V de la corteza motora. Su nombre se debe al científico ucraniano Vladimir Betz, quien las describió por primera vez en 1874. Estas neuronas son las más grandes del SNC, alcanzando incluso 100 μm

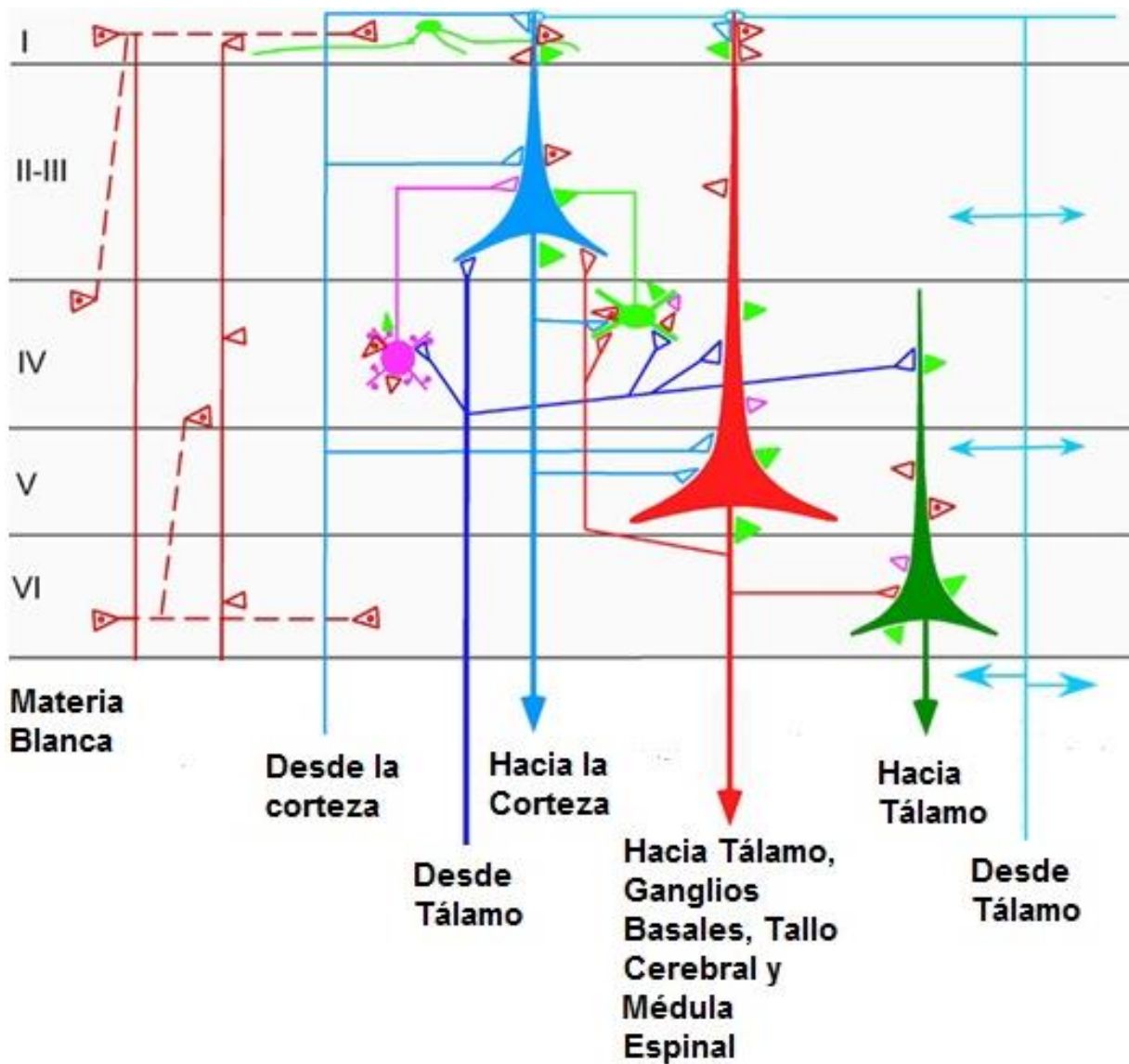
de diámetro (Purves *et al.*, 2008). Las células piramidales gigantes proyectan sus axones hacia la médula espinal por medio del tracto corticospinal en donde, hace sinapsis directamente con las astas anteriores de la médula (Braak & Braak, 1976).

Figura 3: Capas de la corteza cerebral



Capas de la corteza cerebral (Modificado de Kandel *et al.*, 2000).

Figura 4: Representación esquemática de las fibras y organización neuronal de la corteza cerebral.



Representación esquemática de las fibras y organización neuronal de la corteza cerebral. Las células piramidales están representadas en diferentes colores dependiendo su origen y proyección. También se representan dos tipos de interneuronas: 1) en color rosa la neurona excitadora y 2) en verde la neurona inhibitoria (Modificado de De Andrés *et al.*, 2011).

2.1.2 Traumatismo craneoencefálico

El traumatismo craneoencefálico (TCE) es una lesión física, causada por una fuerza externa en el encéfalo que impide temporal o permanentemente la función cerebral, puede producir una disminución o disfunción del nivel de consciencia, que conlleva a una alteración de las actividades cognitivas, físicas y emocionales del individuo (Parikh *et al.*, 2007).

El TCE lleva a múltiples cambios de corto y largo plazo en los circuitos neuronales que concluyen finalmente con un desbalance en la excitación e inhibición cortical. Cambios en las concentraciones de los neurotransmisores, la población de los receptores y la supervivencia celular, son factores específicos que contribuyen importantemente en el daño neuronal. Muchos de estos cambios ocurren gradualmente, los cuales explicarían la vulnerabilidad del cerebro a múltiples impactos menores, alteraciones en la neuroplasticidad y retraso en la aparición de epilepsia postraumática (Guerriero *et al.*, 2015).

Aunque el TCE ha sido tradicionalmente considerado como una lesión aguda, se han reconocido síntomas crónicos reminiscentes de desórdenes neurodegenerativos. Estos síntomas neurodegenerativos progresivos se han manifestado como impedimentos motores y de las habilidades cognitivas, además del estrés, la ansiedad, y las alteraciones en el comportamiento afectivo. El TCE es caracterizado por protuberancias externas en la cabeza superando la capacidad protectora del cráneo, causando daño físico al sistema nervioso central (SNC) acompañado de disfunciones neurológicas (Lozano *et al.*, 2015).

El impacto primario resulta en la pérdida neuronal directa, predominantemente la muerte es debida a necrosis, la cual es seguida por una cascada de lesiones secundarias como la excitotoxicidad, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE) y la inflamación. Todos estos procesos exacerban el daño, empeorando la salud del individuo y persistiendo como eventos patológicos que van progresando, lo que se conoce como TCE crónico (Lozano *et al.*, 2015).

La neuroinflamación es la fase aguda del TCE, involucra la movilización de células y moléculas del sistema inmune, astrocitos, citocinas y quimiocinas que se dirigen al lugar de la lesión para montar la respuesta antiinflamatoria contra el daño cerebral, sin embargo, en la fase crónica, el exceso de estos elementos inflamatorios contribuyen a la formación de un microambiente cerebral inflamado que conduce a la muerte celular secundaria en el TCE (Lozano *et al.*, 2015).

2.1.2.1 Muerte neuronal y neuroinflamación

Después de que ocurrió el TCE, el proceso de detrimento cerebral progresivo comienza con desórdenes a largo y corto plazo. Inicialmente el primer insulto físico resulta en la lesión primaria que se caracteriza por daño mecánico, estiramiento, estrechamiento y/o ruptura de las neuronas, neuroglía y los vasos sanguíneos. La lesión primaria puede ser local, difusa o ambas, haciendo que el daño sea heterogéneo, en la mayoría de las ocasiones la muerte neuronal es por necrosis (Lozano *et al.*, 2015).

La lesión primaria permite una cascada de cambios bioquímicos junto con cambios metabólicos y celulares. Estas cascadas progresivas retrasan el verdadero daño causado por un golpe en el cráneo, agravando el daño primario. La lesión secundaria se localiza en el lugar del impacto así como en la periferia de éste, esta se caracteriza por excitotoxicidad, estrés oxidativo, isquemia, disfunción mitocondrial, disrupción de la BHE e inflamación (Lozano *et al.*, 2015).

Una consecuencia de la muerte celular es la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Debido a las capacidades altamente reactivas, los radicales libres normalmente se mantienen regulados gracias a la producción y degradación por las enzimas y los antioxidantes. Después del TCE, la regulación de radicales libres se ve disminuida. Las ROS causan lipoperoxidación de la membrana lo que deriva en la disfunción de estructuras y organelos, además pueden fragmentar el ADN

causando mutaciones y permiten la infiltración de neutrófilos, lo que induce la respuesta inflamatoria (Lozano *et al.*, 2015).

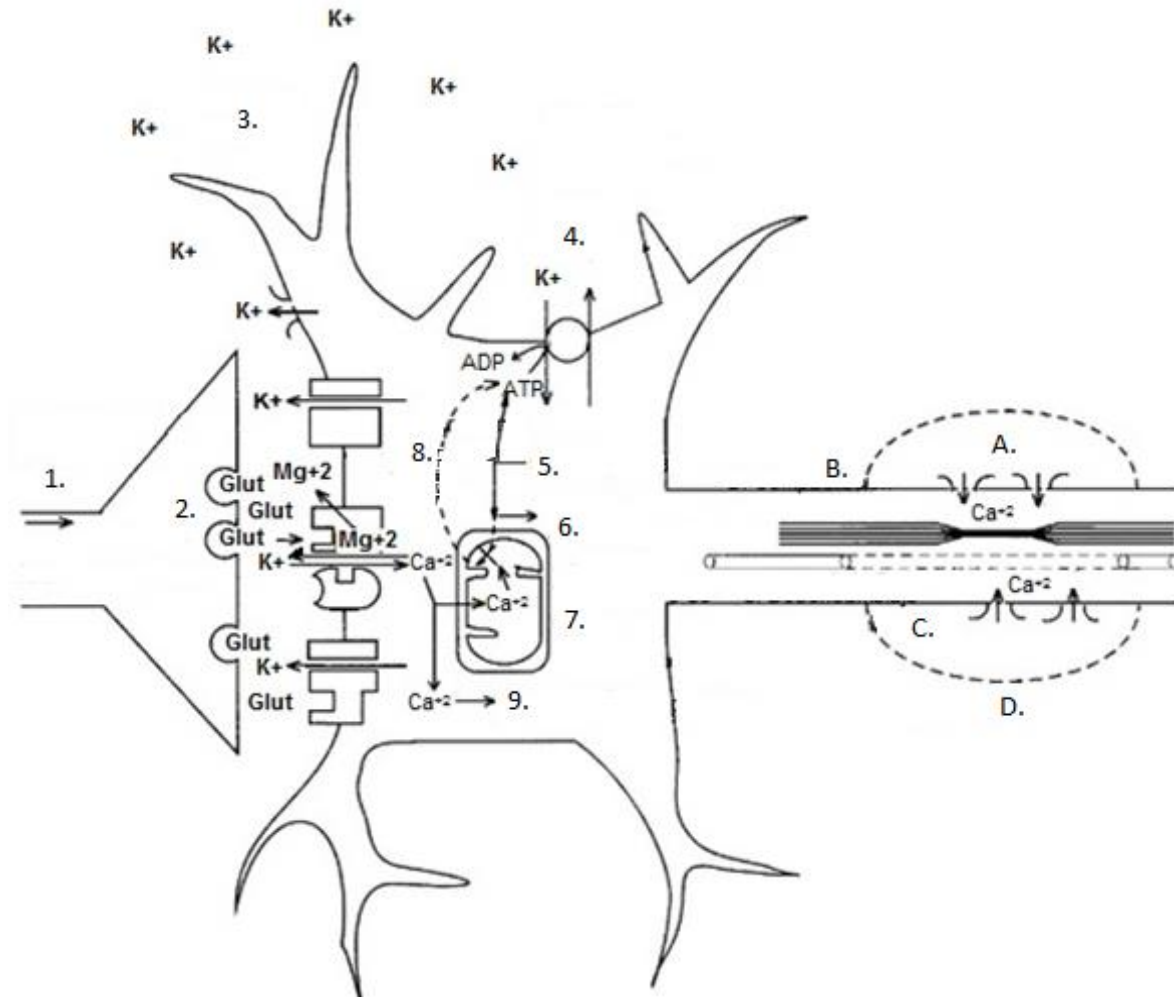
La mitocondria es la mayor fuente de ROS debido a la cadena de transporte de electrones. La mitocondria es un amortiguador de Ca^{+2} , liberando y absorbiendo los iones según se requiera para mantener la homeostasis (Sullivan *et al.*, 1999). Sin embargo, ante el aumento de la concentración de Ca^{+2} debida a la excitotoxicidad, su función se ve impedida. Se forma en consecuencia el poro de transición permeable, asociado a la membrana interna de la mitocondria, el cual es dependiente de Ca^{+2} (Mbye *et al.*, 2008). Con exceso de Ca^{+2} el poro permanece abierto y el potencial de membrana de la mitocondria se ve interrumpido. Con el potencial de membrana perdido, la mitocondria es incapaz de producir ATP. Con la ruptura de la mitocondria, se liberan toxinas y factores proapoptosis dentro de la célula, activando las caspasas y finalmente termina en la muerte celular (Lozano *et al.*, 2015).

El daño más significativo reside en el hecho del fallo de la fosforilación oxidativa por la hinchazón mitocondrial resultado de la captura excesiva de calcio y la disminución del aporte de oxígeno por parte del sistema circulatorio, provocando una disminución en la síntesis de ATP. Si el daño es persistente habrá una depleción de ATP y el citoesqueleto perderá su estabilidad, el citoesqueleto pierde su estabilidad. Las mitocondrias, el retículo endoplásmico, al igual que la célula, se hinchan por el aumento de agua, Na^+ , Cl^- y disminución del K^+ . Aumenta la glucólisis anaerobia con el objetivo de mantener los niveles de ATP y resultará resulta en la acumulación de ácido láctico lo que disminuye el pH intracelular (Figura 5) (Moreno *et al.*, 2005).

En esta fase se produce una ruptura en la membrana lisosomal, en consecuencia las hidrolasas escapan al citoplasma y gracias que el pH intracelular se encuentra ácido las hidrolasas permanecen activas. Posteriormente, los componentes celulares son degradados por acción de las

hidrolasas. Finalmente, las enzimas celulares escapan al espacio extracelular (Leciñasa Cases *et al.*, 2004).

Figura 5: Cascada neurometabólica seguida de un traumatismo cerebral.



Cascada neurometabólica seguida de un traumatismo cerebral. (1) Despolarización e iniciación de potenciales de acción. (2) Liberación de Glutamato. (3) Eflujo masivo de K^+ . (4) Actividad incrementada de las bombas iónicas de la membrana para restaurar la homeostasis. (5) Hiperglicolisis para generar más ATP. (6) Acumulación de lactato. (7) Influxo de Ca^{+2} y secuestro de la mitocondria llevando al impedimento del metabolismo oxidativo. (8) Decremento de la energía. (9) Activación de calpaina e iniciación de la apoptosis. A, Disrupción del axolema e influxo de Ca^{+2} . B, compactación de los neurofilamentos vía fosforilación. C, Desensamblaje de los microtúbulos y acumulación de organelos transportados axonalmente. D, Hinchazón axonal y eventualmente ruptura de éste. K^+ , potasio; Na^+ , sodio; Glut, glutamato; Mg^{+2} , magnesio; Ca^{+2} , calcio. (Modificado de Giza *et al.*, 2001).

Una consecuencia de la muerte celular es la pérdida de la integridad de la BHE. La ruptura de la BHE permite la entrada de células inmunes y factores de la circulación (albúmina, trombina y fibrinógeno) hacia el encéfalo, en consecuencia la fuerza osmótica se incrementa, se produce edema, y resulta en el aumento de la presión intracraneal, lo que se conoce como neuroinflamación. La neuroinflamación involucra la infiltración de neutrófilos, monocitos, linfocitos, citocinas, quimiocinas a través de la BHE y otros mediadores de la inflamación que interfieren en la capacidad intrínseca del cerebro para sanar (Lozano *et al.*, 2015).

2.1.2.2 Glutamato y la excitotoxicidad

La concentración más alta de glutamato se encuentra en las vesículas sinápticas de las terminales nerviosas donde es liberada durante la exocitosis. El glutamato es el mayor neurotransmisor excitador en el SNC del mamífero (Zhou & Danbolt, 2014).

En glutamato juega un rol clave en la plasticidad sináptica, maduración y comunicación neuronal (Lai *et al.*, 2014). Sin embargo, la acumulación excesiva de este neurotransmisor en la hendidura sináptica puede causar excitotoxicidad (Yang *et al.*, 2014), inclusive la estimulación excesiva o la activación persistente de los receptores del glutamato puede causar neurodegeneración en modelos experimentales de epilepsia, convulsiones, isquemia y TCE (Quincozes-Santos *et al.*, 2014).

La presencia inmoderada del glutamato en el espacio sináptico estimula excesivamente sus receptores iónicos (NMDA, AMPA y Kainato) y metabotrópicos de las células circundantes. Estos receptores activados permiten el flujo de Na^+ y Ca^{+2} hacia la célula. La concentración elevada de Ca^{+2} en el citosol conduce a la activación de las fosfatasas, las fosfolipasas y las endonucleasas, en consecuencia el ADN es fragmentado, la estructura y membrana de la célula se

deteriora, lo que finaliza en muerte celular por necrosis o apoptosis (Lozano *et al.*, 2015).

Normalmente el glutamato está mantenido en niveles bajos por transportadores dependientes de Na⁺ dentro de la glía y las neuronas, los cuales se ven impedidos durante un accidente cerebrovascular y la recaptura de glutamato está inhabilitada (Quincozes-Santos *et al.*, 2014).

Muchos medicamentos se han creado con el objetivo de limitar el daño causado por la excitotoxicidad, desgraciadamente pocos han mostrado efectividad y los efectos secundarios son considerables, entre ellos: ataxia y defectos en la memoria (Lin *et al.*, 2014).

Por esta razón, limitar o inhibir la liberación excesiva de glutamato en la hendidura sináptica durante el infarto cerebral o un TCE puede ser una estrategia potencial para el tratamiento de la neurodegeneración.

2.1.2.3 Farmacología de la lesión cerebral

Las secuelas del TCE pueden manifestarse de distinta manera y producir una amplia gama de desórdenes cognitivos, conductuales, emocionales y sensitivo-motoras. Las alteraciones cognitivas más comunes son disminución del nivel de alerta, disminución de la velocidad de procesamiento de la información, déficit de atención, memoria y aprendizaje, alteración del lenguaje y de la comunicación y afectación de las funciones ejecutivas (Ríos *et al.*, 2007).

Las alteraciones cognitivas se producen por tres mecanismos principales: el daño anatómico que sufre el cerebro debido al impacto traumático directo en las áreas corticales, subcorticales y del tronco del encéfalo, la desconexión axonal entre estas áreas cerebrales y/o la afectación de las proyecciones neuroquímicas aferentes que participan en la modulación de las funciones cognitivas.

Hasta ahora la Food and Drug Administration (FDA-Estados Unidos de América) no ha probado ningún medicamento que trate las secuela cognitivas después de un TCE. Existen varios factores que dificultan la demostración de la eficiencia y eficacia de los diferentes fármacos en el tratamiento de alteraciones cognitivas. Entre los factores, cabe destacar la heterogeneidad de los síntomas, los poli tratamientos farmacológicos y el hecho de no poder hacer exploraciones neuropsicológicas adecuadas en fases iniciales (Ríos *et al.*, 2007).

2.1.3 Canales de sodio sensibles a voltaje

Los canales de sodio sensibles a voltaje (Na_v) son una familia de proteínas transmembranales que funcionan como canales iónicos. Estructuralmente, los canales Na_v son miembros de la familia de los canales iónicos 6-TM y están compuestos de una subunidad α de aproximadamente 260 kDa y varias subunidades β de bajo peso molecular (Yu & Catterall, 2003). La familia está comprendida de nueve miembros $Na_v1.1$ - $Na_v1.9$ (Tabla 1) (Godin, 2002).

Los canales Na_v están involucrados en la conducción del Na^+ a través de la membrana celular durante la despolarización de la membrana. Si la despolarización de la membrana alcanza el umbral, los canales Na_v se abren permitiendo el influjo de Na^+ hacia la célula (Bagal *et al.*, 2012). Este movimiento crea potenciales de acción e impulsos nerviosos en células excitables eléctricamente, por ejemplo: las neuronas. Estos impulsos eléctricos están involucrados en muchas funciones como en la fisiología del sistema nervioso central y periférico, del corazón y del músculo esquelético. El bloqueo de los canales Na_v ha sido exitosamente usado en la clínica para permitir controlar los potenciales de disparo patológicos que ocurren en diversas condiciones como: el dolor crónico, la epilepsia y las arritmias cardiacas (Luo *et al.*, 2014).

2.1.3.1 Estructura y topología del canal de sodio

Las subunidades α de los canales Na_v están compuestas aproximadamente de 2000 aminoácidos los cuales se ensamblan en cuatro dominios distintos (D1-D4), cada uno consiste en 6 hélices α transmembranales (S1-S6) (Figura 6).

Dos hélices (S5-S6) de cada dominio contribuyen a la formación del poro central del canal, el cual es responsable de la conducción del Na^+ . Otras clases de canales dependientes de voltaje (K_v y Ca_v), comparten topología y mecanismos de activación con referencia a la clase Na_v (Bagal *et al.*, 2012). En cada uno de los dominios, el sensor de voltaje es localizado en los segmentos S4, el cual contiene residuos de un aminoácido cargado positivamente (arginina o lisina) en cada tercera posición (Figura 7). Asas intracelulares unen los cuatro dominios homólogos. Extremos amino-terminales y carboxi-terminales también contribuyen a la formación de la cara interna del canal de sodio (Yu & Catterall, 2003).

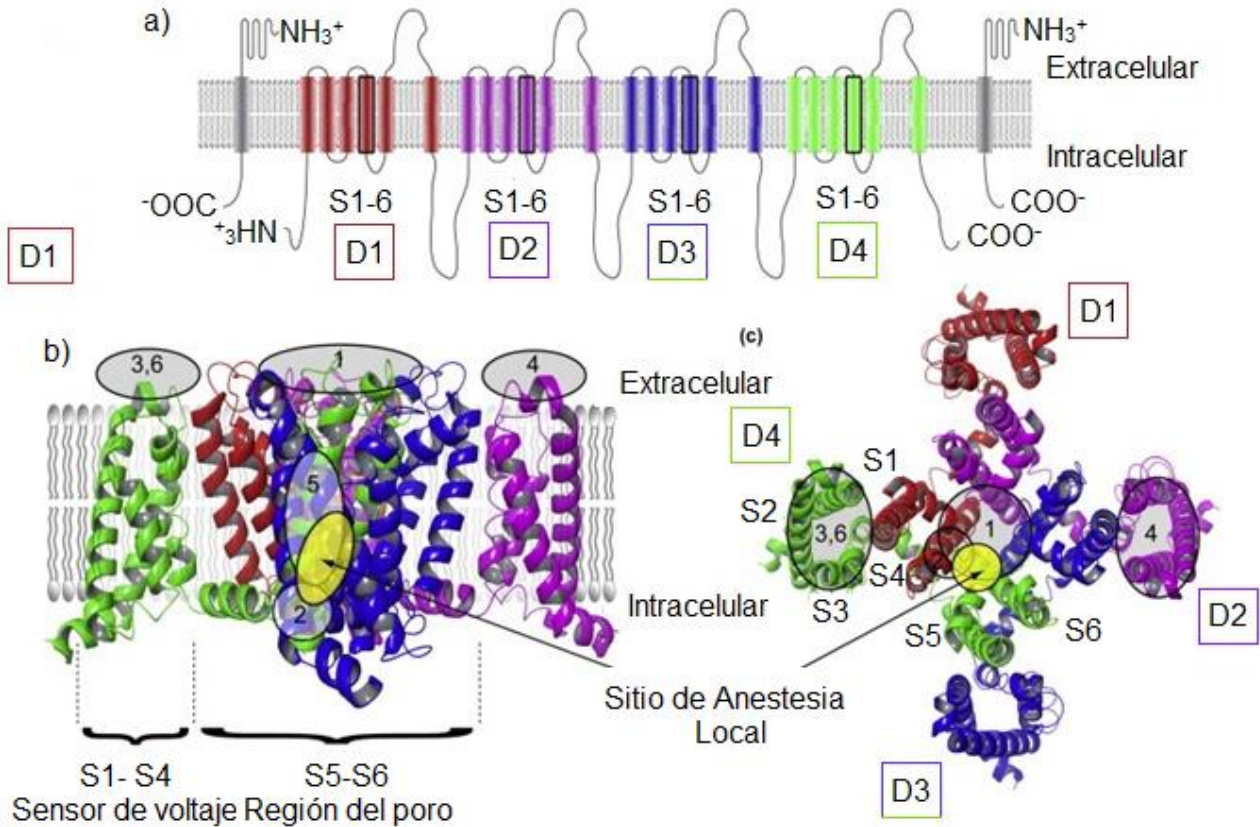
Se cree que los canales Na_v existen en tres estados característicos definidos por el comportamiento de su conductancia en diferentes potenciales de voltaje: abierto, cerrado (reposo) e inactivo. En un potencial transmembranal (TM) de reposo, los canales están en un estado cerrado que no permite el flujo de iones. Cuando el potencial de membrana decrece (despolariza) los sensores de voltaje (segmento S4) se mueven en un movimiento rotacional, permitiendo al poro abrirse durante un periodo corto (<1 ms). Posteriormente, el canal en un proceso de rápida o lenta inactivación pasa a un estado inactivo, no conductor. Finalmente, un incremento en el potencial de membrana (hiperpolarización) causa que el Na_v regrese al estado de reposo (Bagal *et al.*, 2012).

Tabla 1. Subunidades α de los canales de sodio de mamíferos.

Nombre	Especie	Nombre Común	Tejido
rNa _v 1.1	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	SNC, SNP
hNa _v 1.1	<i>Homo sapiens</i>	Humano	SNC
rNa _v 1.2	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	SNC
hNa _v 1.2	<i>Homo sapiens</i>	Humano	SNC
rNa _v 1.3	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	SNC
hNa _v 1.3	<i>Homo sapiens</i>	Humano	SNC
rNa _v 1.4	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	Músculo esquelético
hNa _v 1.4	<i>Homo sapiens</i>	Humano	Músculo esquelético
rNa _v 1.5	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	Corazón
hNa _v 1.5	<i>Homo sapiens</i>	Humano	Corazón
rNa _v 1.6	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	SNC, SNP
hNa _v 1.6	<i>Homo sapiens</i>	Humano	SNC
mNa _v 1.6	<i>Mus musculus</i>	Ratón	SNC
rNa _v 1.7	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	SNP
hNa _v 1.7	<i>Homo sapiens</i>	Humano	Tiroides
oNa _v 1.7	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Conejo	Células de Schwann
rNa _v 1.8	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	SNP
hNa _v 1.8	<i>Homo sapiens</i>	Humano	SNP
mNa _v 1.8	<i>Mus musculus</i>	Ratón	SNP
cNa _v 1.8	<i>Canis familiaris</i>	Perro	SNP
rNa _v 1.9	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	SNP
rNa _v 1.9	<i>Homo sapiens</i>	Humano	
mNa _v 1.9	<i>Mus musculus</i>	Ratón	

Subunidades α de los canales de sodio de mamíferos (Modificado de Godin, 2002). SNC, Sistema Nervioso Central; SNP, Sistema Nervioso Periférico.

Figura 6: Estructura y topología de los canales Nav.



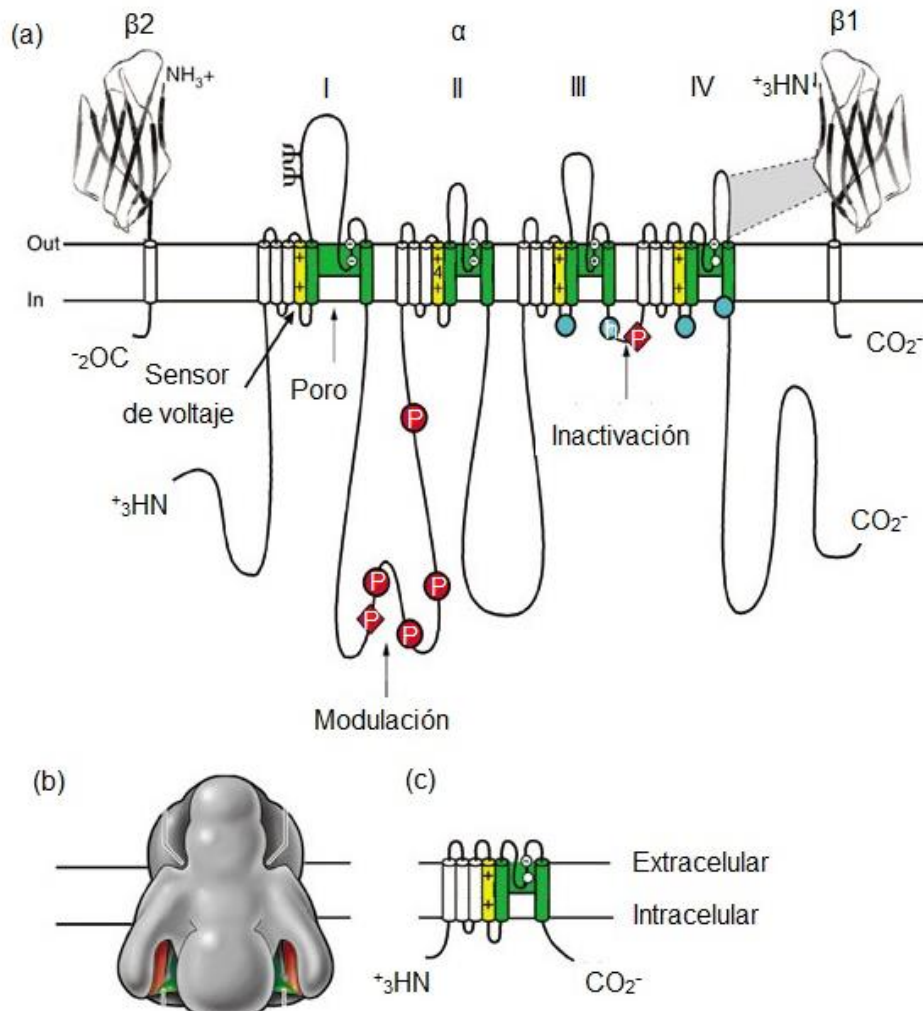
Estructura y topología de los canales Na_v. (a) Dominios D1-D4 están representados en diferentes colores mientras la subunidad β está mostrada en gris. Los segmentos transmembranales (S1-S6) están etiquetados juntos. (b) Vista lateral. (c) Vista superior del canal de sodio dependiente de voltaje (Modificado de Bagal *et al.*, 2012).

2.1.3.2 Bases estructurales para la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje

Los canales Na_v son activados en respuesta a la despolarización por el movimiento externo de partículas cargadas eléctricamente hacia a la célula a través de la membrana celular. Los segmentos S4 de los canales de sodio, contienen de 4-8 repeticiones de un aminoácido cargado positivamente (usualmente arginina) flanqueado por dos residuos hidrofóbicos, que atraviesan la membrana. El movimiento de las cargas de apertura en el segmento S4 inicia los

cambios conformacionales que llevan a la apertura del poro y a la inactivación de los canales de sodio (Catterall & Swanson, 2015).

Figura 7: Estructura de los canales de sodio dependientes de voltaje.



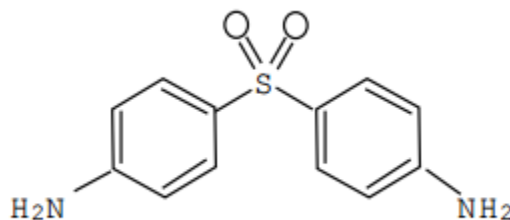
Estructura de los canales de sodio dependientes de voltaje. (a) Representación esquemática de las subunidades de los canales de sodio. La subunidad α de los canales $Na_v1.2$ está ilustrada junto con las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$: los dominios extracelulares de la subunidad β están mostrados como pliegues parecidos a inmunoglobulinas, los cuales interactúan con los bucles en la subunidad α como se muestra. Los números romanos indican los dominios de la subunidad α : segmentos 5 y 6 (mostrados en verde) forman el poro y las hélices del S4 (amarillo) funcionan como sensores de voltaje (h, compuerta de inactivación): P, sitios de fosforilación (círculos rojos, sitios para proteína A; A: diamantes rojos, sitios para proteína A); ψ , probable sitio de glicosilación. (b) Estructura tridimensional del Na_v . (c) Representación estructural de $NaChBac$, canal de sodio dependiente de voltaje en bacterias (Modificado de Yu & Catterall, 2003).

Los canales de sodio en vertebrados se abren en respuesta a la despolarización y luego se inactivan en 1-2 ms. Este proceso de inactivación rápida es requerido para el disparo repetido de potenciales de acción en circuitos neurales y para el control de la excitabilidad en células musculares y nerviosas. El bucle corto intracelular que conecta a los dominios homólogos III y IV de la subunidad α del canal de sodio, es responsable de la rápida inactivación por pliegue intracelular del poro y bloqueándolo. Se requiere la secuencia clave de aminoácidos IFM (Isoleucina, fenilalanina y metionina) para mantener cerrada la puerta de inactivación (Catterall & Swanson, 2015).

2.1.4 Dapsona

La Dapsona, (4,4'-Diaminodifenilsulfona) o DDS, es un antibiótico derivado de las sulfonas antibacterianas. Como agente bacteriostático es utilizado contra el *Mycobacterium leprae* y es un componente esencial en el tratamiento y profilaxis de la lepra, el actinomicetoma, la neumonía por *Pneumocystis carinii* y la malaria (Prashant *et al.*, 2012).

Figura 8. Estructura de la Dapsona.



Modificado de Sánchez,-Saldaña, 2008.

La Dapsona (Figura 8) es un polvo cristalino, blanco o amarillo pálido sin color, cuya fórmula molecular es $C_{12}H_{12}N_2O_2S$, su peso molecular es 248.30 g/mol, su punto de fusión es 175-176 °C, es casi insoluble en agua, ligeramente soluble en etanol, muy soluble en acetona y dimetil sulfóxido (DMSO), además es un producto fotosensible (Sánchez-Saldaña, 2008).

2.1.4.1 Farmacología de la Dapsona

Es un derivado de la anilina y como todas las sulfonas, tiene en su estructura un átomo de azufre que se une a dos átomos de carbono. Administrada por vía oral, se absorbe en el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad de 86% alcanzando sus máximas concentraciones séricas al cabo de 2 a 8 horas (Ahmad & Rogers, 1980).

Tras su absorción, la sustancia ingresa en la circulación enterohepática y es metabolizada tanto en el hígado como por leucocitos polimorfonucleares (PMN) activados o células mononucleares (McEvoy, 2009).

En el hígado, la enzima N-acetiltransferasa, acetila la Dapsona en monoacetildapsona (MADDS) y mediante la hidroxilación del citocromo P-450, se produce Dapsona hidroxilamina (DDS-NOH) (Zuidema, 1986). La Dapsona se distribuye en todos los órganos, atraviesa la BHE y es detectable en la leche materna. Alrededor de 20% se excreta en la orina sin cambios; entre 70-85% se elimina como metabolitos solubles en agua y una pequeña cantidad puede excretarse en heces (Clavellina & Moreno, 2014).

2.1.4.2 Mecanismo de acción de la Dapsona

La función antimicrobiana de la Dapsona se debe a un efecto bacteriostático que inhibe la síntesis de ácido fólico, no obstante el mecanismo del efecto antiinflamatorio aún se encuentra en estudio. Es posible que este efecto tenga que ver con su capacidad para inhibir la formación de ROS, los cuales se producen por vía intracelular mediada por PMN (Clavellina & Moreno, 2014).

Como antibiótico inhibe la síntesis de ácido dihidrofólico de la bacteria, vía competición con el para-aminobenzoato por el sitio activo de la sintasa de dihidropteroato (Prashant *et al.*, 2012).

La Dapsona interfiere con la migración de neutrófilos quimiotácticos y eosinófilos, inhibe la acción de enzimas lisosomales. La Dapsona tiene acción moduladora de la respuesta inmune gracias a que disminuye la acción citotóxica de los PMN, efecto que ejerce a través de una reducción de la generación de los derivados de la lipooxigenasa (5-HETE y LTB₄); de la actividad de las enzimas PMN (Sánchez-Saldaña, 2008).

2.2 Antecedentes específicos

El TCE es una de las primeras causas de muerte en el mundo, las consecuencias en los sobrevivientes se caracterizan por dificultades en la realización de actividades cognitivas, motoras, conductuales, sociales, sentimentales, de aprendizaje y memoria. Por tanto, el desarrollo y la aplicación de un fármaco neuroprotector, verdaderamente efectivo, después de algún accidente cerebrovascular o un TCE, podría limitar el daño y mejorar la plasticidad (Ríos *et al.*, 2007).

El uso de medicamentos neuroprotectores, ha sido positivo para disminuir el impacto ocasionado por un TCE, además de que mejora la rehabilitación cuando es correctamente empleado. El mecanismo de acción de estos fármacos es de gran importancia para limitar los efectos secundarios posteriores a un accidente

cerebrovascular: el desorden en la homeostasis iónica, la excitotoxicidad mediada por el glutamato, la producción de óxido nítrico y radicales libres de oxígeno, la disfunción mitocondrial, la generación de edema, hemorragia, isquemia, hipertensión intracraneal, inflamación, ruptura de la barrera hematoencefálica y la muerte celular por apoptosis y necrosis (Aarabi & Simard, 2009).

Muchos fármacos neuroprotectores han sido desarrollados, sin embargo pocos de ellos son eficaces. Los bloqueadores de los receptores del glutamato, ciertamente reducen la excitotoxicidad, pero no han sido totalmente efectivos. En estudios preclínicos se usan animales jóvenes para probar fármacos nuevos, desgraciadamente, en humanos, la población mayormente afectada por la excitotoxicidad, desórdenes neurodegenerativos o isquemia cerebral son pacientes de edad avanzada. Estudios recientes han encontrado que los antagonistas a receptores AMPA (NBQX) y NMDA (MK-801) reducen el daño cerebral en ratas jóvenes, aunque en ratas de mayor edad no tiene efecto alguno (Suzuki *et al.*, 2003).

La citicolina o CDP-colina, es un compuesto normalmente presente en todas las células del cuerpo, este fármaco neuroprotector, cuando se administra de manera externa, sirve de intermedio en la biosíntesis de fosfolípidos en la membrana. Además, ha demostrado efectos beneficiosos en algunos modelos de isquemia cerebral y efectos sinérgicos con otros fármacos probados en el tratamiento de la isquemia cerebral. En evaluaciones radiológicas, se demostró que la citicolina fue capaz de inducir una reducción en el volumen del infarto cerebral en algunos pacientes (Dávalos *et al.*, 2002).

Los antagonistas del receptor a glutamato, fueron los primeros fármacos propuestos para la neuroprotección, ya que bloquean el paso de iones sodio y calcio hacia el interior de la célula, previniendo la excitotoxicidad. El nimodipino, un inhibidor de los canales de calcio tipo L, no ha demostrado ser efectivo por vía oral y por vía sanguínea resulta perjudicial por sus efectos secundarios hemodinámicos. La flunaricina que actúa sobre los canales tipo T, tampoco ha

demostrado ser efectivo El selfotel (antagonista competitivo) y el dextrorfano, aptiganel y eliprodil (antagonistas no competitivos) no mostraron eficacia alguna. (Fernández *et al.*, 2008).

Como la activación del receptor NMDA requiere glicina, se pensó que un fármaco inhibidor selectivo del sitio de unión de la glicina, el gavetsinel, tuviera algún efecto neuroprotector, pero estadísticamente no resultó significativo. El magnesio como bloqueador de los receptores NMDA también se probó por vía oral, pero no resultó eficiente y presentaba efectos secundarios (Fernández *et al.*, 2008).

La lamotrigina, un anticonvulsivo cuyo mecanismo de acción se relaciona con la inhibición de la liberación de glutamato gracias al bloqueo de los canales de sodio voltaje dependientes, disminuye el daño isquémico, aunque no se ha probado en humanos. La fosfenitoína igualmente es un bloqueador de la liberación de glutamato, sin embargo presenta efectos adversos.

En la Dapsona se han descubierto propiedades neuroprotectoras, tiene un efecto antagonista contra las convulsiones inducidas por el ácido kaínico y la excitotoxicidad. Ríos en 2004, probó la capacidad de la Dapsona para proteger el daño neuronal ante la isquemia, en un modelo de rata, donde ocluye la Arteria Cerebral Media (MCA). El resultado de este trabajo revela una alta neuroprotección, mayor al 90%.

En un estudio realizado por Rodríguez, 1999, probó el efecto de la Dapsona en ratas a las cuales se les administró ácido quinolínico por vía intraestrial, con el objetivo de observar el posible efecto neuroprotector de la Dapsona después de la activación excesiva de los receptores NMDA. El ácido quinolínico produce una extensa necrosis y pérdida de neuronas del cuerpo estriado. Se observó que la Dapsona previno la toxicidad del cuerpo estriado de manera significativa.

3. Planteamiento del problema

Las personas que se les aplica un fármaco neuroprotector, después de haber sufrido un TCE o algún infarto cerebrovascular, han demostrado una mejoría notable en la plasticidad neuronal, además de que se limita el daño secundario causado por la excitotoxicidad generada. Esta terapia previene y restringe los daños provocados por la neuroinflamación y la excitotoxicidad, restaura la integridad del medio que se encuentra comprometido disminuyendo las secuelas. El objetivo de la mayoría de los neuroprotectores es la disminución en la liberación del glutamato, evitando así la muerte neuronal por apoptosis o necrosis, asimismo se evitaría la pérdida de funciones ejecutivas y cognitivas (Ríos & Díaz, 2012).

Lamentablemente, en la actualidad el fármaco ideal ante el daño neurodegenerativo no se ha diseñado, que conjuntamente no tenga efectos. Se han realizado considerables estudios acerca del mecanismo de acción de un verdadero neuroprotector, pero aún siguen existiendo dudas. La Dapsona, es uno de los medicamentos que ha demostrado ser efectivo ante el TCE. Sin embargo, el mecanismo de acción de la neuroprotección sigue siendo desconocido. Por ello, en esta investigación, es de gran relevancia estudiar el efecto de la Dapsona en los canales Na_v , debido a la participación de este canal en la excitotoxicidad (Ríos, 2007).

El presente trabajo se realizó en la corteza motora, debido a que en la corteza cerebral de rata existe una gran cantidad de neuronas excitatorias, mayor a un 90% (Feldmeyer, 2012). La población de las neuronas piramidales gigantes es la que se encuentra en su mayoría en las capas V y VI de la corteza motora de rata (Rivara *et al.*, 2003), por este motivo serán estudiadas.

4. Hipótesis

Si la Dapsona reduce la excitabilidad neuronal, entonces la administración de Dapsona reducirá las corrientes de sodio activadas por voltaje en neuronas de la corteza motora agudamente disociadas de la rata.

5. Objetivos

General

Determinar el efecto de la Dapsona sobre la corriente de sodio activada por voltaje en las neuronas piramidales de la corteza motora, agudamente disociadas, de la rata.

Particulares

1. Caracterizar la corriente de sodio activada por voltaje en neuronas piramidales de la corteza motora de la rata.
 - a. Realizar la curva de voltaje-dependencia del pico de la corriente de sodio.
 - b. Medir el tiempo al pico y la amplitud al pico de la corriente de sodio por un pulso de 20 ms de -80 a 0 mV.
 - c. Medir la constante de tiempo de inactivación de la corriente de sodio por un pulso de 20 ms de -80 a 0 mV.
 - d. Confirmar el efecto de un bloqueador específico (TTX) de los canales de sodio dependientes de voltaje sobre las neuronas piramidales de la CM.

2. Analizar el efecto de Dapsona, a diferentes concentraciones, sobre parámetros electrofisiológicos de la corriente de sodio en neuronas piramidales de la corteza motora de la rata.
 - a. Realizar la curva de voltaje dependencia del efecto de la Dapsona sobre el pico de la corriente de sodio.
 - b. Medir el tiempo al pico y la amplitud al pico de la corriente de sodio por un pulso 20 ms de -80 a 0 mV.
 - c. Medir la constante de tiempo de inactivación de la corriente de sodio por un pulso 20 ms de -80 a 0 mV.

6. Metodología

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Neuromodulación, dirigido por el Doctor Jorge Luis Valente Flores Hernández, en el Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, ubicada en 14 sur No. 6301 Colonia San Manuel, Puebla, Puebla, México. En el período de tiempo ocupado entre los meses de mayo a julio del 2015.

Para realizar la investigación, se adquirieron ratas macho cepa Wistar de 100 a 120 gramos, con 30 días de edad, estas se obtuvieron del bioterio Claude Bernard, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

El protocolo de disociación que se usó ya ha sido previamente descrito por Flores y colaboradores en el 2000 y 2002, el cual se describe a continuación:

- Las ratas se anestesian con pentobarbital (a una dosis de 50 mg por cada Kg) y se decapitarán.
- Se extrae rápidamente el cerebro, colocándolo en solución fría de Isetionato sódico con bajo calcio (en mM): 140 isetionato de sodio, 2 KCl, 2 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 23 glucosa, 15 HEPES, pH = 7.4, 300 - 310mOsm/L y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 N^G-nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico, gasificada con O₂.
- Posteriormente se obtienen rebanadas coronales de 350 µm con ayuda de un vibratomo (Campden), mientras se encuentran sumergidas en isetionato sódico.
- Las rebanadas se mantienen entre 1 a 6 horas a temperatura ambiente (20-22° C) en una solución salina balanceada de Earle (EBSS, SIGMA) amortiguada con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) suplementada con (en mM): 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, y una osmolaridad de 300–310mOsm/L.

- Alrededor de 1 hora de incubación se toma una rebanada de corteza motora para su tratamiento enzimático (Papaina 15 mg/40 ml de HBSS) en la solución balanceada de Hanks (HBSS, SIGMA) amortiguada con HEPES burbujeada con O₂ a 37° C, durante 10 minutos. Suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 N^G-nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico.
- Transcurrido el tiempo de la digestión enzimática, el tejido se lava con la solución de isetionato sódico y posteriormente se disocia mecánicamente con pipetas Pasteur de diferentes calibres (pulidas al fuego). La suspensión de células se siembra en cajas Petri de poliestireno (Nunclon Surface, NUNC) montadas en el microscopio invertido de registro.
- Después de 10 minutos de incubación, la suspensión se lava con una solución de fondo (en mM): 140 NaCl, 23 Glucosa, 15 HEPES, 2 KCl, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂ y 1% rojo fenol, burbujeada con O₂, pH=7.4 ajustado con NaOH, con una Osmolaridad de 300-310mOsm/L; para su posterior registro por medio de la técnica de fijación de voltaje.

Para la obtención de datos, se empleó la técnica de célula completa con fijación de voltaje de Bargas y colaboradores, 1994. Los electrodos de registro son estirados de tubos capilares de borosilicato (1B120F-4, WPI, Sarasota, Fl.) y con una resistencia de 8±2 MΩ.

La solución interna para registro de corrientes de Na⁺ y Ca²⁺, se encuentra compuesta de (en mM): 175 N-metil-D-glutamina (NMDG), 40 HEPES, 2 MgCl₂, 10 ácido etilen glicol-bis (β -aminoetil éter) -N, N, N', N'-tetraacético (EGTA), 12 fosfocreatina, 3 Na₂ATP, 0.35 Na₃GTP, 0.1 leupeptina, pH = 7.3 con H₂SO₄, una osmolaridad de 265 - 270mOsm/L.

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

Los registros se obtienen con un amplificador para fijación de voltaje "voltage clamp" Axopatch 1D (Molecular Devices, Foster City, CA), controlado con el programa pClamp Versión 8.2 (Molecular Devices, Foster City, CA) ejecutándose en una computadora con procesador Pentium con una interface tipo Digidata 1322A (Molecular Devices, Foster City, CA).

La resistencia de las micropipetas de registro debe oscilar entre 4-8MΩ en ±25 MΩ. El potencial de membrana se mantuvo en -70mV mientras no hay protocolo activo.

Los fármacos fueron aplicados con un sistema de doble capilar con un ángulo de 45° entre ellos, un ángulo de 30° con respecto al fondo con la punta en el fondo del plato de registro y una distancia de ± 200 μm de la célula a registrar. La solución concentrada de Dapsona o Stock de Dapsona es de 100 mM se preparó con DMSO al 50%, a partir del cual se prepararon por dilución las concentraciones experimentales a utilizar. Teniendo dilución mínima de DMSO a 3:1000 (300 μM).

Un capilar llevaba la solución externa (control más DMSO 1:1000) y el otro llevaba esta misma más Dapsona (a la concentración deseada a partir del stock de DMSO-Dapsona 100 mM). El intercambio de solución se realizó por la apertura de válvulas solenoides (The Lee Company, Essex CO LFAA 1201718H) comandadas por el Digidata 1322^a (Molecular Devices, Foster City, CA) y un aparato de control fabricado en el laboratorio.

La célula se bañó por la solución del primer capilar con la solución externa, después del cambio, la célula se bañó con la solución del segundo capilar conteniendo el Stock durante 5s para posteriormente regresar a la solución control. El tiempo en que el electrodo detecta el cambio de las condiciones iónicas

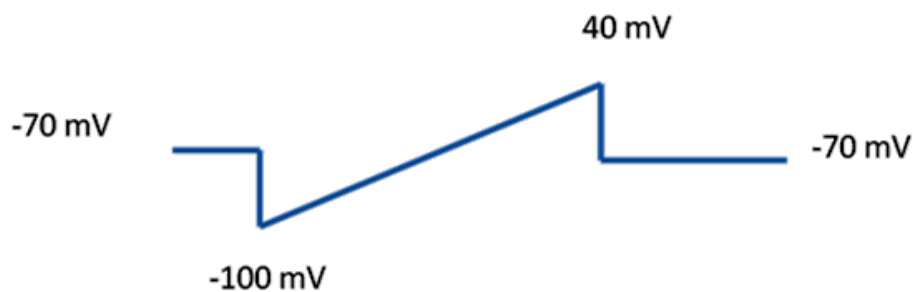
entre una solución y otra es de 6ms. La Dapsona fue preparada como solución concentrada en DMSO-AGUA 1:1 100 mM que es 1000 veces la concentración más alta a utilizar.

Posteriormente se aplicó la Dapsona. Un capilar tendrá la solución control o la solución con Dapsona (stock 5 mM). Las concentraciones que se utilizaron de Dapsona fueron 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M y 300 μ M.

6.1 Protocolos electrofisiológicos

6.1.1 RAMPA

Se fija un potencial de membrana a -80 mV y se aplicará una rampa de voltaje de -100 mV hasta +40 mV, con un delta de cambio de 140 mV en 100 ms o 140 μ V / 100 μ s. Este pulso para genera las corrientes de Na⁺ y Ca²⁺, este protocolo nos permite determinar la viabilidad celular. No tenemos expresión de la corriente de Potasio debido a que la solución control contiene Cesio y Bario que obstruyen las corrientes de potasio.



6.1.2 Pulso

Para la inducción de corrientes de Sodio (I_{Na^+}) se realizó un pulso cuadrado de -80 mV a +20 mV durante 16 ms. Del cual se cuantificará:

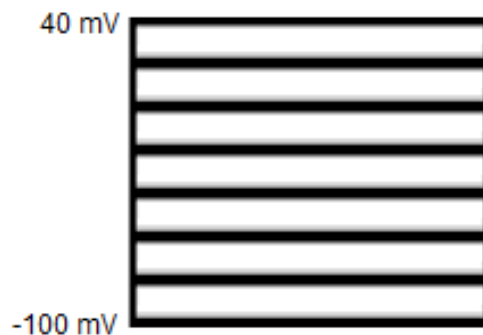
Amplitud del Pico

Tiempo al Pico

Constante temporal de inactivación (τ).

6.1.3 IV (Corriente-Voltaje)

Este protocolo consiste en aplicar 14 pulsos cuadrados de voltaje con un intervalo de 10mV desde -100 mV hasta +30 mV con un potencial de mantenimiento de -80 mV.



6.2 Análisis de datos

Los ajustes y las gráficas fueron realizados en el programa Origen 7 (Micro cal Software Inc., Norte Hampton, MA) y Sigma Plot 11.0 (Systat Software, Inc. Sigma Plotfor Windows).

Para el análisis de la curva dosis efecto, se determinó la CE_{50} de Dapsona, (cuyo valor corresponde a la concentración a la cual se observa el 50% de la corriente máxima, se toma en cuenta la densidad de corriente (pA/pF), la cual indica una relación entre el valor máximo de la corriente y el tamaño de la célula para estandarizarla de acuerdo a su capacitancia. Con los datos obtenidos de la

densidad de corriente se realizó un ajuste con la ecuación de Hill [$Y=M_{\max} (E^n/K^{n_{ox}})$] utilizando el programa Origen 7.0, donde M_{\max} es el valor máximo, K es la concentración efectiva 50 (CE_{50}) y n es el coeficiente de Hill. Empleando un ajuste logístico tipo sigmoidea con el programa Origen. La fórmula empleada para el ajuste es la siguiente:

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

Donde:

A_1 = tamaño total del pico

A_2 = estado estacionario (SS)

x = valor de la concentración

$X_0 = CE_{50}$

p = pendiente (coeficiente o pendiente de Hill)

Los datos fueron analizados primeramente con una prueba de Shapiro (0.05) para determinar el comportamiento de una distribución normal, para los datos de la curva dosis-efecto se ocupará una ANOVA de medidas repetidas con una prueba de Bonferroni, $P < 0.05$.

7. Bioética

El uso de animales en la investigación biomédica ha contribuido enormemente en el aumento del conocimiento y desarrollo de la ciencia. Sin embargo, el hecho de experimentar con seres que sienten dolor, implica una responsabilidad hacia ellos por parte de los investigadores. La experimentación en animales requiere de normas y lineamientos éticos que les aseguren condiciones mínimas de sufrimiento y maximización de su bienestar (Vanda, 2003).

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

El Título V de la Ley General de Salud, el cual se refiere a la Investigación para la Salud, en el artículo 96, en el apartado III, establece que la investigación para la salud comprende el desarrollo de acciones que contribuyan a la prevención y control de los problemas de salud que se consideren prioritarios para la salud. En el presente estudio se investiga el mecanismo de acción de un medicamento destinado a aminorar los efectos secundarios después de accidente cerebrovascular (Título V, Investigación para la Salud, Ley General de Salud, 2015).

En el Título XII, Control Sanitario de Productos y Servicios y de su importación y Exportación, cabe resaltar que el medicamento usado para la investigación, la Dapsona, es usado únicamente con fines de investigación básica, no se administra a ningún sujeto de investigación directamente (Título XII, Control Sanitario de Productos y Servicios y de su Importación y Exportación, Ley General de Salud, 2015). La Dapsona utilizada en este proyecto es donada por el Dr. Camilo Ríos Castañeda del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" que ha patentado la Dapsona como agente neuroprotector.

En la presente investigación no se busca obtener algún beneficio, ni se pretende promover el uso de la Dapsona sin la sustentación, ni los fundamentos adecuados, como establece el Título XIII de la Ley General de Salud, la publicidad referente a la salud (Título XIII, Publicidad, Ley General de la Salud, 2015). El objetivo de la investigación a corto plazo es estudiar el mecanismo y a largo plazo, en futuras investigaciones establecer el mecanismo por el cual la Dapsona actúa limitando el daño neuronal después de un accidente cerebrovascular.

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

La Declaración de Helsinki, marca que el uso de animales es esencial para el progreso médico, sin embargo, exige que la investigación respete el bienestar de los animales usados en investigación, se debe tratar a los animales de una forma compasiva y que el uso de animales es necesario para lograr un resultado importante cuando no se disponga de ningún otro método posible (Declaración de la AMM sobre el Uso de Animales en Investigación Biomédica, 2013).

La Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, establece que el uso de animales de experimentación requiere de manipulación de personal calificado. El Pasante de Lic. Luis Enrique Juárez Ramírez, encargado de llevar a cabo todas al técnicas, vigilando que la rata sea tratada dignamente, limitando el dolor y garantizando el bienestar durante el transcurso de la investigación, posee una constancia de Manejo y Vías de Administración en Ratas de Laboratorio, impartida por el Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, Cuidado y uso de animales de laboratorio, 2001).

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

En cuanto a la Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, para la organización y funcionamiento de laboratorios clínicos, la cual garantiza que se satisface la organización y funcionamiento del laboratorio, se hace constar que el Laboratorio de Neuromodulación del Instituto de Fisiología de la BUAP es un laboratorio de Investigación Básica y que no trata con humanos para ser considerado como un laboratorio de nivel clínico. Sin embargo, cumple con las exigencias marcadas en la NOM 007-SSA3-2011 (NOM-007-SSA3-2011, para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos, 2012).

Respaldo por la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la presente investigación tienen como objetivo el desarrollo de acciones que contribuyan al conocimiento en procesos biológicos, a la prevención y el control de problemas de salud. Asimismo, se satisface lo establecido en el Título Tercero, De la investigación de Recursos Profilácticos, de Diagnósticos, Terapéuticos y Rehabilitación, en el Capítulo II, De investigación Farmacológica (Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, 1984).

El Manual de Procedimientos de Bioseguridad del Instituto de Investigación de la Universidad Autónoma de México, es un documento que establece reglas y estándares que permiten el manejo adecuado y la reducción del riesgo biológico por exposición no intencional con material infeccioso. Además se hace hincapié en la cultura de bioseguridad como un concepto amplio que comprende: protección del personal, prácticas y protocolos de Bioseguridad, entrenamiento de personal y estudiantes para el manejo prudente del material biológico, el uso y mantenimiento

de instalaciones y equipo, y los recursos en infraestructura e ingeniería. La investigación presente, también se rige por el Manual de Bioseguridad del Instituto de Investigación de la UNAM (Manual de Procedimientos de Bioseguridad del Instituto de Investigación de la UNAM, 2010).

Tomando en cuenta la Declaración de Basilea, el cual es un llamamiento en favor de mayor confianza, transparencia y comunicación en torno a la investigación con animales, nos comprometemos a proteger a los animales que sean confiados y no infligir ningún dolor, daño o sufrimiento innecesario, siguiendo los niveles de diseño experimental y del cuidado de los animales. Se buscarán alternativas a minimizar el número de animales sacrificados en el periodo de investigación. Se evitarán repeticiones innecesarias en experimentación animal puesto que somos conscientes de que sin el empleo de animales en la investigación, no sería posible superar los desafíos sociales y humanitarios derivados de estos problemas. A pesar de los nuevos y refinados métodos alternativos, los experimentos con animales seguirán siendo esenciales, en el futuro previsible, para la investigación biomédica (Declaración de Basilea, 2010).

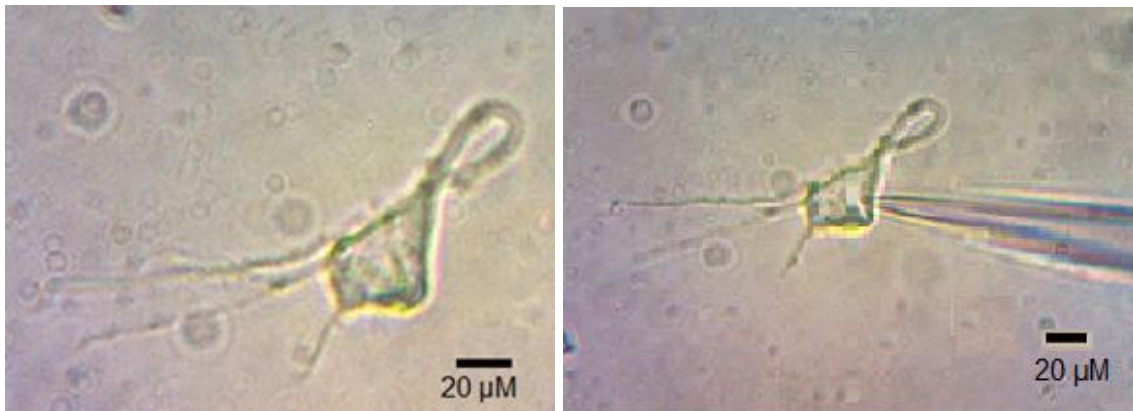
Los alumnos que laboran en el laboratorio de Neuromodulación, así como cada alumno en el Instituto de Fisiología de la BUAP tienen que tomar el curso de manejo de animales de laboratorio impartido en el Bioterio Claude Bernard.

8. Resultados

8.1 Parámetros

En total se registraron un total de 58 células. Únicamente se tomó en cuenta a aquellas células que presentaron una resistencia de membrana mayor a $800\text{ M}\Omega$ y una resistencia de acceso menor a $25\text{ M}\Omega$. La capacitancia de las neuronas piramidales osciló entre los 12 y 19 pF . A continuación, se muestran las figuras 9 y 10 que representan a las neuronas piramidales gigantes de corteza motora de rata, capas V y VI, las fotografías se tomaron antes del inicio del registro, lo que permitió apreciar su morfología.

Figura 9 y 10: Morfología de las neuronas piramidales gigantes.

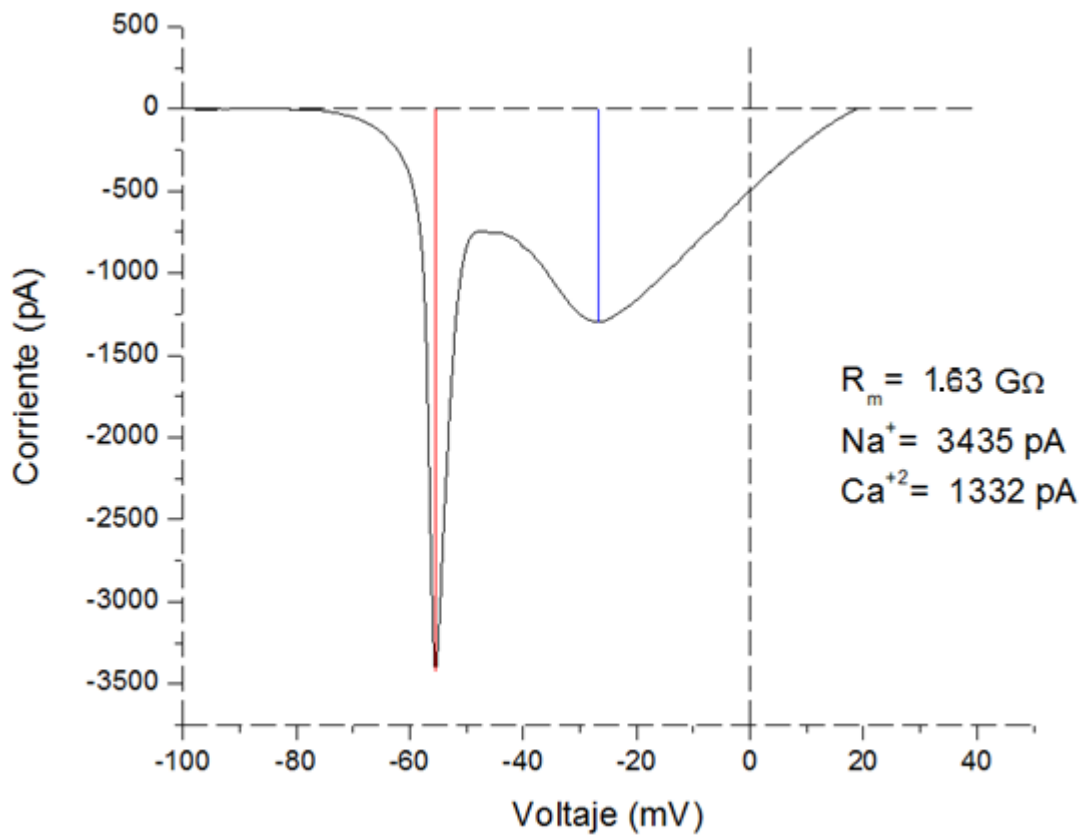


Morfología de las neuronas piramidales gigantes. En la primera figura se observa una neurona piramidal gigante, se distingue el soma en forma piramidal, así como la dendrita apical. En la segunda figura se muestra la misma neurona piramidal durante el registro electrofisiológico.

8.2 Resultados de los protocolos aplicados.

Al inicio de cada registro electrofisiológico se realizó una rampa de voltaje de -100 mV a 40 mV con una duración de 200 mS, esto con el objetivo de evaluar la estabilidad celular al presentar una corriente de Na^+ y Ca^{+2} (Gráfica 1).

Gráfica 1: Registro de corrientes de Na^+ y Ca^{+2} .

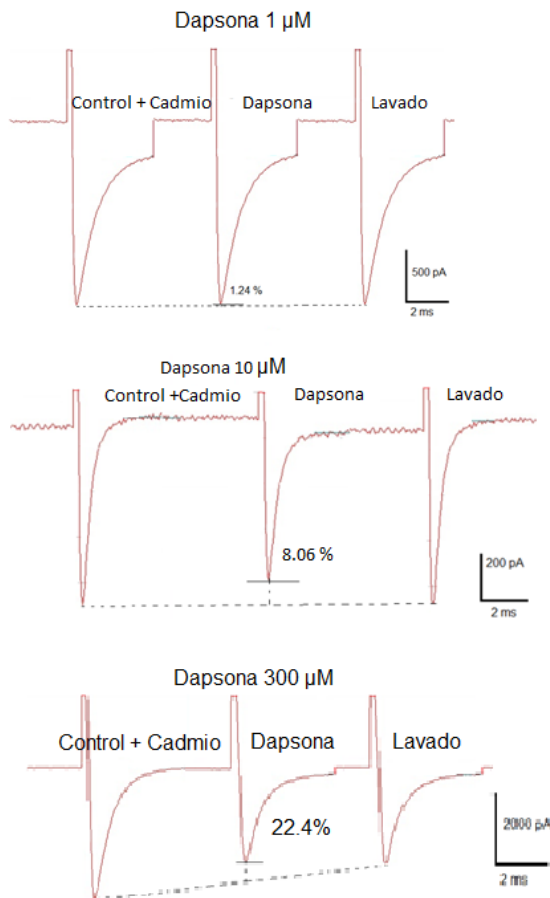


Registro de corrientes de Na^+ y Ca^{+2} . La corriente de Na^{+2} , tiene un pico máximo a -56 mV y la corriente de Ca^{+2} , tiene un pico máximo a 27 mV.

8.3 Efecto de la Dapsona sobre la corriente de Na⁺ activada por voltaje.

Se evaluó el efecto de la Dapsona a diferentes concentraciones (1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM y 300 μM) sobre la corriente de Na⁺ activada por voltaje en neuronas piramidales de corteza motora de rata, capas V y VI. Para lo cual se analizaron 41 células.

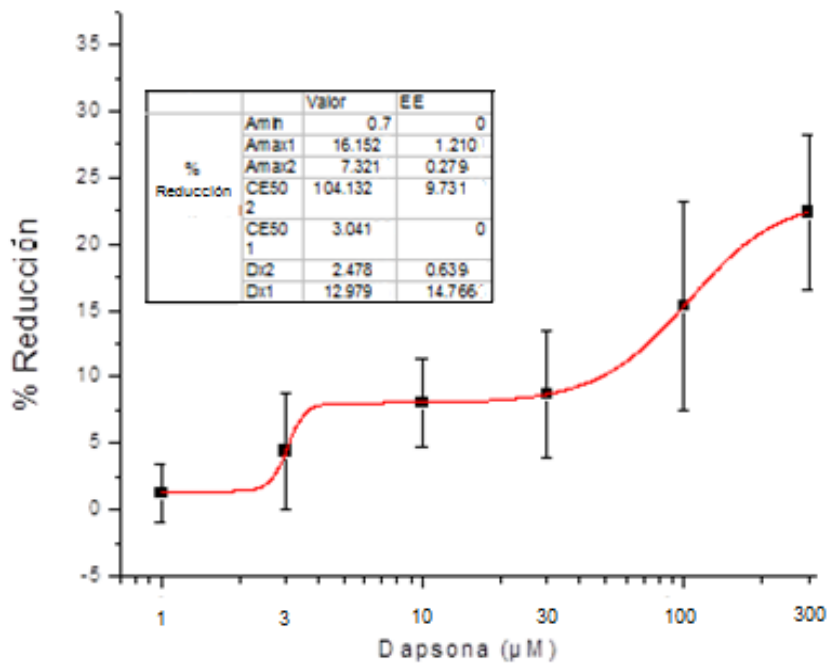
Gráfica 2: Trazos representativos del efecto de la Dapsona en la corriente de Na⁺ activada por voltaje.



Trazos representativos del efecto de la Dapsona en la corriente de Na⁺ activada por voltaje. Se muestra el porcentaje de bloqueo del pico de la corriente con diferentes concentraciones de Dapsona (1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM y 300 μM) (N=41 células).

Se graficó el porcentaje de reducción con respecto a la media \pm ESM de cada una de las concentraciones utilizadas (Gráfica 3), mediante un ajuste logístico sigmoide reportando un bloqueo máximo de $16.15 \pm 1.21\%$, una concentración efectiva al 50 (CE₅₀) de $7.32 \pm 0.27\mu\text{M}$. Los datos fueron comparados estadísticamente con la prueba ANOVA de medidas repetidas con una post prueba de Bonferroni ($p < 0.001$), resultando con una diferencia significativa entre las diferentes concentraciones ($p < 0.001$).

Gráfica 3: Curva de concentración – efecto de la Dapsona.



Curva de concentración – efecto de la Dapsona a diferentes concentraciones. Se graficó el porcentaje de reducción a partir de la densidad de corriente.

8.4 Voltaje - dependencia del efecto de la Dapsona sobre el pico de la corriente de sodio.

Se registraron 57 células para estudiar el papel de la voltaje-dependencia del efecto de la Dapsona sobre el pico de la corriente de sodio (Gráfica 4). Se utilizaron diferentes concentraciones de Dapsona (1, 3, 10, 30, 100 y 300 μM), sometidas a un protocolo de Corriente-Voltaje.

Gráfica 4: Trazo de la reducción de la corriente de sodio, bajo el efecto de la Dapsona a diferentes concentraciones, sometidas a un protocolo de Corriente-Voltaje.

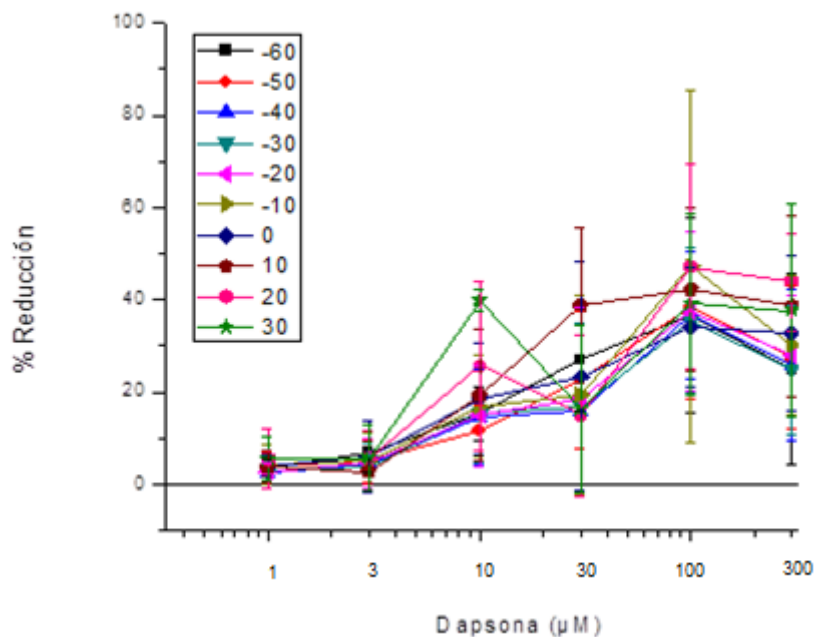


Gráfico 4: Trazos representativos de la corriente de sodio bajo el efecto de Dapsona (1, 3, 10, 30, 100 y 300 μM), sometidas a un protocolo de Corriente - Voltaje.

8.5 Efecto de la Dapsona sobre el Tiempo al pico

Se evaluó el efecto de la Dapsona sobre el tiempo al pico de la corriente de sodio activada por voltaje. Para lo cual se analizaron 43 células que corresponden a la corteza motora, capas V y VI.

Gráfico 5: Trazos representativos del tiempo al pico de sodio bajo el efecto de Dapsona.

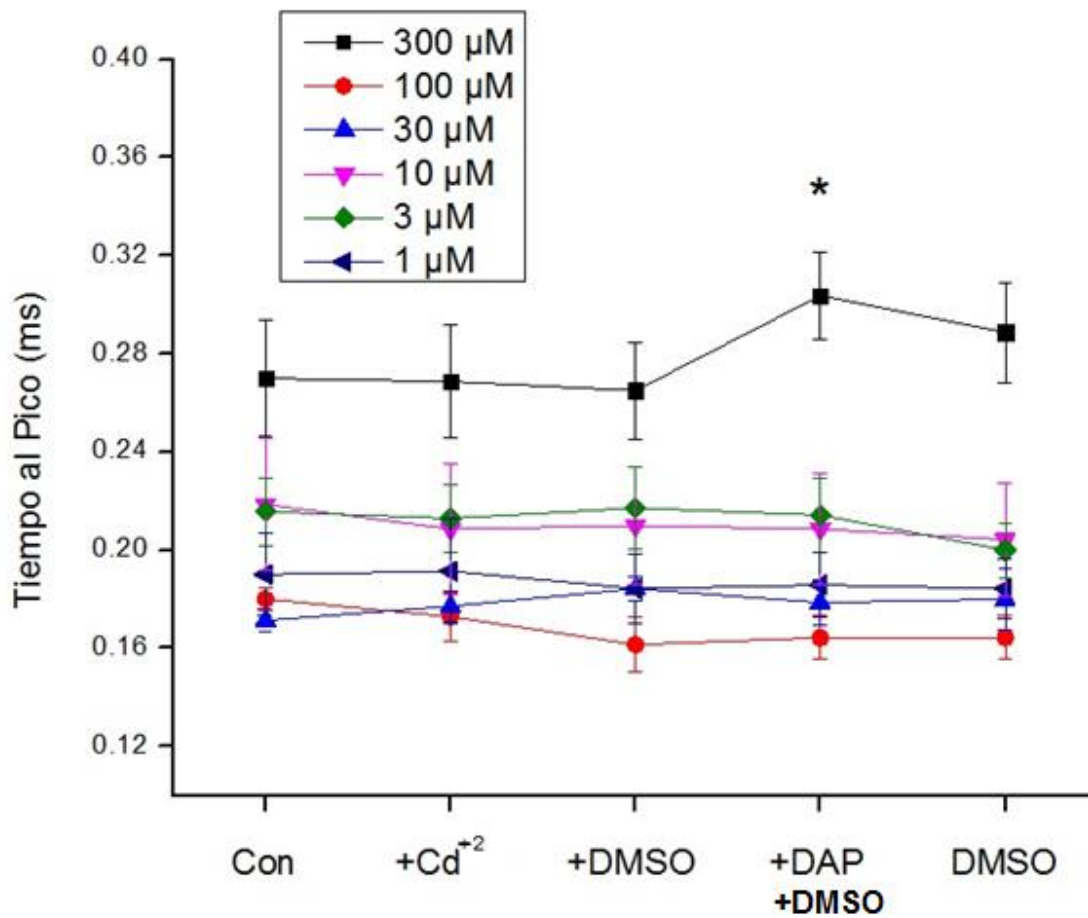


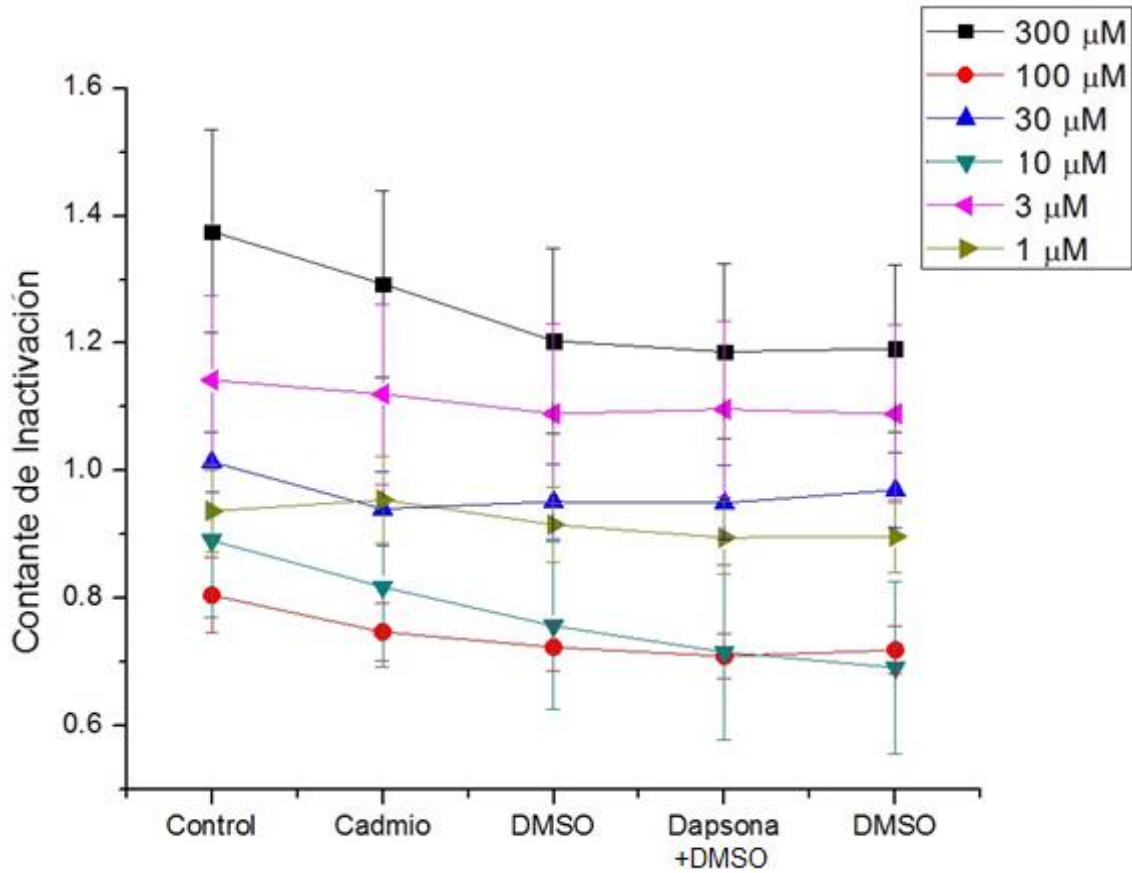
Gráfico 5: Trazos representativos del tiempo al pico de sodio bajo el efecto de Dapsona (1, 3, 10, 30, 100 y 300 μM).

* p=0.05

8.6 Efecto de la Dapsona sobre la constante de inactivación.

Se evaluó el efecto de la Dapsona sobre la constante de inactivación de la corriente de sodio activada por voltaje. Para lo cual se analizaron 44 células que corresponden a la corteza motora, capas V y VI.

Gráfico 6: Trazos representativos de la constante de inactivación de sodio bajo el efecto de Dapsona.



Trazos representativos de la constante de inactivación de sodio bajo el efecto de Dapsona (1, 3, 10, 30, 100 y 300 µM).

9. Discusión

9.1 Efecto de la Dapsona sobre la corriente de sodio activada por voltaje.

Los resultados representan los primeros estudios acerca del efecto de la Dapsona sobre la corriente de sodio activada por voltaje en neuronas piramidales de la corteza motora de rata, capas V y VI. El uso del DMSO se justifica debido a su baja toxicidad y su característica para penetrar membranas biológicas sin provocarle un daño estructural significativo (Kais *et al.*, 2013).

El desarrollo de un agente neuroprotector adecuado para el tratamiento del infarto isquémico ha fallado cuando se trata de aplicar al campo clínico. El objetivo de las actuales terapias se ha concentrado en la limitación de la penumbra isquémica, esto con la esperanza de mejorar los resultados clínicos (Stankowski & Gupta, 2011).

De acuerdo a una investigación llevada por López-Naranjo, en el año 2003, la Dapsona, así como sus derivados, muestran actividad anticonvulsiva producida por ácido kaínico, disminuyendo la duración de las convulsiones y su periodo de latencia (López-Naranjo *et al.*, 2003).

En estudios previos, en modelos de ratas con isquemia cerebral, la Dapsona fue asociada con efectos neuroprotectores. La Dapsona no presenta reacciones adversas significativas, una de las reacciones adversas más significativas es la anemia hemolítica (Jollow *et al.*, 1995), en el hígado puede producir hepatitis (Lorenz *et al.*, 2012), otros efectos adversos incluyen náuseas, dolor de cabeza y erupción cutánea (Poschenrieder *et al.*, 2014); a altas concentraciones, a partir de 300 μM , la Dapsona es citotóxica (Ríos *et al.*, 2007).

Se llevó a cabo un estudio piloto, en el cual se probaba la Dapsona en pacientes con infarto cerebral. Los resultados fueron concluyentes, la Dapsona muestra ser un medicamento útil y seguro para el tratamiento del infarto cerebral, demostrando que los mejores resultados se obtuvieron al aplicar el tratamiento

dentro de las primeras 10 horas después del infarto cerebral (Nader-Kawachi *et al.*, 2007).

En condiciones fisiológicas, el funcionamiento principal de la neurona es conducir impulsos eléctricos en forma de potenciales de acción. Para poder transmitir correctamente, iones como Na^+ , K^+ y Ca^{+2} deben mantenerse a diferentes concentraciones a través de la membrana celular. Es por eso, que el 50 – 60% del total de ATP sintetizado en el cerebro es necesario para la actividad de las bombas iónicas dependientes de energía, las cuales son las responsables para el mantenimiento de los gradientes de concentración electroquímicos (Stankowski & Gupta, 2011).

Cuando ocurre un infarto isquémico, la producción de ATP disminuye afectando el funcionamiento apropiado de las bombas iónicas dependientes de ATP, resultando en la discapacidad de las neuronas para mantener la homeostasis iónico. En consecuencia la concentración de Na^+ citosólico se incrementa y la concentración de K^+ disminuye llevando a la despolarización de la membrana neuronal (Stankowski & Gupta, 2011).

El lugar donde ocurrió la isquemia cerebral, la pérdida del potencial de membrana da lugar a la despolarización neuronal en condiciones de anoxia, este evento es caracterizado por la muerte neuronal en esta región cerebral acompañado de la apertura de canales dependientes de voltaje de Ca^{+2} , permitiendo la entrada de Ca^{+2} dentro de la neurona. Además, en esta región se propagan potenciales de acción hacia las zonas circundantes, suceso conocido como Despolarizaciones periinfárticas, el cual puede estar ocurriendo hasta 3-4 horas después del infarto isquémico. Este es un objetivo donde las posibles terapias farmacológicas actúen con mayor índice de éxito, en la zona que rodea al infarto isquémico inicial, con la meta de reducir el daño causado por el ictus cerebral (Stankowski & Gupta, 2011). Estudios han demostrado que el bloqueo del canal de Na^+ contrarrestan los eventos suscitados después del infarto cerebral. Fármacos como lidocaína, tetrodotoxina o lamotrigina se han probado como

neuroprotectores debido a su habilidad para disminuir la depleción de ATP. Sin embargo, ninguno de estos ha sido exitoso en pruebas clínicas dirigidas hacia humanos. Es aquí donde la Dapsona demuestra su efecto neuroprotector, en el bloqueo del canal de Na^+ , previo a que la zona del infarto comienza a propagar el daño a las zonas circundantes. Favorecido, por el hecho de que la Dapsona ha demostrado ser un neuroprotector viable para el tratamiento del infarto cerebral en humanos (Stankowski & Gupta, 2011).

Se realizaron estudios para observar una posible dependencia de voltaje de Dapsona en la corriente de Na^+ , encontrando que no tiene una relación con el cambio de voltaje. Se presenta una reducción de la corriente al pico, este porcentaje de reducción permanece durante los cambios de voltaje.

Durante la presente investigación se realizó una evaluación del efecto de la Dapsona sobre el tiempo al pico de la corriente de sodio activada por voltaje. No se aprecia una interferencia en el tiempo al pico, a excepción de la concentración $300 \mu\text{M}$ en la que si se observa un retardo de la corriente de Na^+ para alcanzar el pico.

En la realización de la investigación se realizó una evaluación del efecto de la Dapsona sobre el tiempo al pico de la corriente de sodio activada por voltaje. No se observa que la Dapsona interfiera en la constante de inactivación durante los potenciales de acción.

Los resultados presentes muestran que al aplicar la Dapsona en el protocolo de la Rampa de voltaje, en neuronas de la Corteza Motora, con diferentes concentraciones ($1 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$) produce una disminución en el pico de la corriente de sodio, es probable que esto se deba a la interacción con el canal iónico y la disminución del número de canales activados de sodio. Los datos obtenidos demuestran que la Dapsona sigue un parámetro sigmoideo, es asequible que se debe a que la Dapsona está activando un canal específica de sodio ($\text{Na}_v 1.1$. o $\text{Na}_v 1.6$ (Xu *et al*, 2003).

10. Conclusiones

Con base en los objetivos propuestos tenemos:

1. La Dapsona tiene un efecto bloqueador sobre la corriente de sodio activada por voltaje, el bloqueo máximo fue de 22.42% a 300 μM .
2. La Dapsona no tiene una relación dependiente de voltaje para bloquear la corriente de sodio activada por voltaje.
3. La Dapsona no interfiere en el tiempo al pico de la corriente de sodio activada por voltaje, a excepción de 300 μM , donde el tiempo al pico aumenta.
4. La Dapsona no interfiere en el constante de inactivación de la corriente de sodio activada por voltaje.

11. Referencias

- Aarabi B & Simard JM** (2009). Traumatic brain injury. *Curr Opin Crit Care* 15: 548-53.
- Bagal SK, Chapman ML, Marron BE, Prime R Storer RI & Swain NA** (2014). Recent progress in sodium channel modulators for pain. *Bioorg Med Chem Lett* 24(16):3690-9.
- Bannister AP** (2005). Inter and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex. *Neuroscience Research* 53:95-103.
- Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y & Surmeier DJ** (1994). Cellular and molecular characterization of Ca²⁺ currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* 14:6667-6686.
- Braak H & Braak E** (1976). The pyramidal cells of Betz within the cingulate and precentral gigantopyramidal field in the human brain. A Golgi and pigment architectonic study. *Cell and tissue research* 172(1):103-19.
- Burbano E, Burbano S & Gracia C** (2003). Física General. Madrid, España: Tebar.
- Catterall WA & Swanson TM** (2015). Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Mol Pharmacol* Apr 6. Pii. Mol. 114.097659.
- Clavellina MM & Moreno GC** (2014). Dapsona: su uso en dermatología. *Dermatología CMQ* 2014; 12(1):47-51.
- Dávalos A, Castillo J, Alvarez-Sabin, Secades JJ, Mercadal J, López S, Cobo E, Warach S, Sherman D, Clark WM & Lozano R** (2002). Oral citocoline in acute ischemic stroke: an individual patient data pooling analysis of clinical trials. *Stroke* 33:2850-57.
- De Andrés I, Garzón M & Reinoso F** (2011). Functional anatomy of non-REM sleep. *Front. Neurol* doi:10.3389/fneur.2011.00070.
- Declaración de la AMM sobre el Uso de Animales en Investigación Biomédica.** Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones éticas en seres humanos, Brasil, Fortaleza, Octubre 2013.
- Declaración de Basilea.** Basel, Suiza, 29 de noviembre de 2010.

- Díaz AR, Mendez MA, Galván SA, Nava CR, Santander I, Balderas G & Rios C** (2013). Antioxidant, anticonvulsive and neuroprotective effects of dapsone and phenobarbital against kainic acid-induced damage in rats. *Neurochem Res* 38(9):1819-27
- Farhi D, Bógen E, Wolkeenstein & Chosidow O** (2005). Dapsona en dermatología. *EMG-Dermatología Vol 39(3):1-12.*
- Feldmeyer D** (2012). Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. *Front Neuroanat*;6:24.
- Fernández FJ, Hernández F, Argandoña L Galindo MF, Segura T & Jordán J** (2008). Farmacología en el ictus isquémico agudo. *Rev Neurol*; 47:253-60.
- Flores-Hernández J, Cepeda C, Hernández- Echegaray E, Calvert CR, Jokel ES, Fienberg AA, Greengard P & Levine MS** (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized neurons: of D1 receptors and DARPP-32. *Journal of Neurophysiology* 88(6):3010-3020.
- Flores-Hernandez J, Hernández S, Snyder GL, Yan Z, Fienberg AA, Moss SJ, Greengard P & Surmeier DJ** (2000). D(1) dopamine receptor activation reduces GABA (A) receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *Journal of Neurophysiology* 83(5):2996.3004.
- Fuster JM** (2001). The prefrontal cortex—an update: time is of the essence. *Neuron*: 30(2):319-33.
- Giza CC & Hovda DA** (2001).The Neurometabolic Cascade of Concussion. *J AthlTrai*36: 228-235.
- Godin AL** (2002). Evolution of voltage-gated Na (+) channels. *J Exp Biol.* 205 (Pt 5):575-84.
- Guerriero RM, Giza CC & Rotenberg A** (2015). Glutamate and GABA Imbalance Following Traumatic Brain Injury. *Curr Neurol Neurosci Rep* 15(5):545.
- Herculano-Houzel S, Mota B, Wong P &Kaas JH** (2010). Connectivity-driven white matter scaling and folding in primate cerebral cortex. *Proceeding of the National Academy of Sciences.* 107(44):19008-19013.
- Hooks BM, Mao T, Gutnisky DA, Yamanawi N, Svoboda K & Sheperd GMC** (2013). Organization of cortical and thalamic input to pyramidal neurons in mouse motor cortex. *Journal of Neuroscience* 16(13):4129-34.
- Jollow DJ. Bradshaw TP & McMillan DC** (1995). Dapsone-induced hemolytic anemia. *Drug Metab Rev.* 1995;27(1-2):107-24.

- Kandel ER, Schwartz JH & Jessell TM** (2000). Principles of neural science. *New York: McGraw-Hill, health Professions Divisions*, p. xli, 1414p.
- Kais B, Schneider KE, Keiter S, Henn K, Ackermann C & Braunbeck T** (2013). DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-Implications for the fish embryo test (FET). *Aquatic Toxicology* 140– 141 (2013) 229– 238.
- Lai TW, Zhang S & Wang YT** (2014). Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 115: 157-88.
- Lin TY, Huang WJ, Wu CC, Lu CW & Wang SJ** (2014). Acacetin Inhibits Glutamate Release and Prevents Kainic Acid-Induced Neurotoxicity in Rats. *PLoS One* 9(2):e88644.
- Leciñasa Cases M, Pérez GP & Diez Tejedor E** (2004). Recomendaciones para el tratamiento y prevención del ictus. *Rev Neurol* 39:465-486.
- Levine AJ, Lewallen KA & Pfaff SL** (2012). Spatial organization of cortical and spinal neurons controlling motor behavior K. *Curr Opin Neurobiol*,22(5):812-21.
- López Naranjo F, Castañeda CL, Rojas IO, Martínez AM., Krazov JJ & Manjarrez JM** (2003). Anticonvulsant activity of Dapsone Analogs. *Electrophysiologic Evaluación. Archives of Medical Research.* 34: 269-272.
- Lorenz M, Wozel G & Schmitt J** (2012). Hypersensitivity reactions to dapsone: a systematic review. *Acta Derm Venereol.* 2012 Mar;92(2):194-9.
- Lozano D, Gonzales-Portillo GS, Acosta S, de la Pena I, Tajiri N, Kaneko Y & Borlongan CV** (2015). Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: etiology, clinical consequences, and therapeutic opportunities. *Neuropsychiatr* 11:97-106.
- Manual de Procedimientos de Bioseguridad del Instituto de Investigación. México, DF, 25 de octubre de 2010.
- Moreno H & Moreno B** (2005). Transmisión sináptica-canales de calcio y liberación de neurotransmisores. *Revista de Ciencia de la salud* 3(1) 47-61.
- Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. México, DF, 22 de agosto de 2001.
- Norma Oficial Mexicana 062-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. México, DF, 22 de agosto de 2012.

- Nader-Kawachi J, Góngora-Rivera F, Santos-Zambrano J, Calzada P & Ríos C** (2007). Neuroprotective effect of dapsone in patients with acute ischemic stroke: pilot study. *Volume 29, Issue 3 (01 April 2007), pp. 331-334.*
- Nelson PC** (2005). Física biológica: energía, información y vida. *Londres, Inglaterra: Reverté.*
- Nieuwenhuys R, Voogd & Van Huijzen** (2009). El Sistema Nervioso Humano. 617.
- Parikh S, Koch M & Narayan RK** (2007). Traumatic brain injury. *Int Anesthesiol CLIN 45: 119-35.*
- Park E, Bell J & Baker A** (2008). Traumatic Brain Injury: can the consequences be stopped? *CMAJ 178: 1163-1170.*
- Paxinos G** (2004). The Rat Nervous System. 730, 735.
- Prashant BM, Rishikesh VA & Rajesh JO** (2012). Antipileptic Drugs: An Overview. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences. Vol. (1)2.*
- Poschenrieder F, Schulz C & Hamer OW** (2014). Eosinophilic pneumonia toxicity induced by Dapsone. *Rofo. 2014 Feb;186(2):178-9. doi: 10.1055/s-0033-1350517. Epub 2013 Aug 30.*
- Purves D, George JA, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia AS, McNamara JO & White LE** (2008). *Neuroscience 4th ed. Sinauer Associates. pp. 432-4.*
- Quincozes-Santos A, Bobermin LD, Tramontina AC, Wartchow KM, Tagliari B, Souza DO, Wyse AT & Goncalves CA** (2014). Oxidative stress mediated by NMDA, AMPA/KA channels in acute hippocampal slices: neuroprotective effect of resveratrol. *Toxicol In Vitro 28(4): 544-51.*
- Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. México, DF, 7 de febrero de 1984.
- Ríos C & Díaz A** (2012). Agentes y mecanismos neuroprotectores relacionados con el estrés oxidante en el infarto cerebral. *Mensaje Bioquímico Vol XXXVI 171-99.*
- Ríos C, Nader-Kawachi J, Rodríguez-Payán AJ & Nava-Ruiz C** (2004). Neuroprotective effect of dapsone in an occlusive model of focal ischemia in rats. *Brain Res (2):212-5.*
- Ríos RS, Castaño MB & Bernabeu GM** (2007). Farmacoterapia de las secuelas cognitivas secundarias a traumatismo craneoencefálico. *Rev Neurol Vol. 45: pp 563-570.*

- Rivara CB, Sherwood CC, Bouras C & Hof PR** (2003). Stereologic characterization and spatial distributions patterns of Betz cells in the human primary motor cortex. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 270 (2): 137-151.
- Rodriguez E, Méndez-Armenta M, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Barroso-Moguel R, Rodríguez F, Ríos C & Santamaría A** (1999). Dapsone prevents morphological lesions and lipid peroxidation induced by quinolinic acid in rat corpus striatum. *Toxicology*. 139(1-2)111-18.
- Sánchez-Cervelló DJ & Albina-Chicote ML** (2003). Organización supraespal del movimiento. *Fisiología dinámica. Barcelona: Masson. p.166.*
- Sánchez-Saldaña L.** (2008). Medicamentos antiguos y vigentes en dermatología. *Dermatología Peruana 2008, Vol 18(3).*
- Spruston N** (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature Reviews Neuroscience* 9, 206-211.
- Stankowski, J. N., & Gupta, R** (2011). Therapeutic Targets for Neuroprotection in Acute Ischemic Stroke: Lost in Translation? *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(10), 1841–1851.
- Suzuki Y, Takagi Y, Nakamura R, Hashimoto K & Umemura K** (2003). Ability of NMDA and non-NMDA receptor antagonists to inhibit cerebral ischemic damage in aged rats. *Brain Research* 964:116-120.
- Título V, Investigación para la Salud. Ley General de Salud, México, DF, 4 de junio de 2015.
- Título XII, Control Sanitario de Productos y Servicios y de su Importación y Exportación. Ley General de Salud, México, DF, 4 de junio de 2015.
- Título XIII, Publicidad. Ley General de Salud, México, DF, 4 de junio de 2015.
- Ueta Y, Hirai Y, Otsuka T & Kawaguchi** (2013). Direction-and distance- dependent inter areal connectivity of pyramidal cell subpopulations in the rat frontal cortex. *Frontiers in Neural Circuits*, 7(164):1-16.
- Valverde F** (2002). Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Frontiers in Neural circuits* 7(85):1-10.
- Vanda BC** (2003). La experimentación biomédica en animales en los códigos bioéticos. *Laborat-acta Vol. 15 No.2.*

- Xu X, Guo F, Lv X, Feng R, Min D, Ma L, Liu Y, Zhao J, Wang L, Chen T, Shaw C, Hao L, Cai J** (2003). Abnormal changes in voltage-gated sodium channels Na(V)1.1, Na(V)1.2, Na(V)1.3, Na(V)1.6 and in calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase II, within the brains of spontaneously epileptic rats and tremor rats. *Brain Res Bull.* 2013 Jul;96:1-9.
- Yang L, Yang Q, Zhang K, Li YJ, Wu YM, Liu SB, Zheng LH & Zhao MG** (2014). Neuroprotective Effects of Daphnetin against NMDA Receptor-Mediated Excitotoxicity. *Molecules* 19(9), 14542-14555.
- Yu FH & Catterall WAN** (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*, 4:207.
- Zhou Y & Danbolt NC** (2014). Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm* 121(8) 799-817.