



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DEL TRATAMIENTO CON
ATOMOXETINA SOBRE LA BIOGÉNESIS
MITOCONDRIAL EN CÉLULAS SH-SY5Y
DIFERENCIADAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

Daniela Vázquez González



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
VOCAL: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
SECRETARIO: JUAN CARLOS CORONA CASTILLO
1er. SUPLENTE: MANUEL GUTIERREZ AGUILAR
2° SUPLENTE: FRANCISCA MORAYNA GUTIERREZ LUNA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN
EN NEUROCIENCIAS DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FÉDERICO GÓMEZ**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Juan Carlos Corona Castillo

SUSTENTANTE:

Daniela Vázquez González

Índice General

Abreviaturas.....	I
Índice de figuras	IV
Resumen	V
I. Introducción	1
• Trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH)	1
• Fisiopatología.....	2
• Neurobiología y Mecanismos cerebrales en el TDAH	4
• Neuroquímica del TDAH y el sistema catecolaminérgico	7
• Estrés oxidativo y TDAH	10
• Tratamiento farmacológico del TDAH.....	13
• La Atomoxetina	15
• Mecanismos adicionales de la ATX.....	17
• La Mitocondria	19
• Biogénesis mitocondrial	22
• Células SH-SY5Y	26
II. Antecedentes	28
III. Justificación	29
IV. Hipótesis.....	29
V. Objetivos	29
Objetivo General.....	29
Objetivos Particulares.....	29
VI. Materiales y métodos.....	30
Cultivo celular	31
Extracción y cuantificación de proteínas	32
Inmunoréplica tipo Western	33
Extracción y cuantificación de RNA	33
qRT-PCR.....	36
Análisis estadístico	37
VII. Resultados	38

Diferenciación de células SH-SY5Y	38
Efecto del tratamiento con ATX sobre la biogénesis mitocondrial en células SH-SY5Y diferenciadas.	39
Efecto del tratamiento con ATX sobre la biogénesis mitocondrial a nivel de RNAm en células SH-SY5Y diferenciadas	42
VIII. Discusión.....	45
IX. Conclusiones	50
X. Perspectivas	50
XI. Referencias	51

Abreviaturas

$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
A	Adrenalina
AR	Acido trans-retinoico
ATP	Trifosfato de adenosina
ATX	Atomoxetina
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CAT	Catalasa
CCA	Corteza cingulada anterior
cDNA	ADN complementario
CoQ10	Coenzima Q10
COX	Citocromo c oxidasa
COX-I	Subunidad I del complejo IV
CPF	Corteza prefrontal
CTE	Cadena transportadora de electrones
DA	Dopamina
DA- β -H	Dopamina β -hidroxilasa
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DOPA	Dopamina descarboxilasa
EIM	Espacio intermembrana
ERR	Receptores nucleares relacionados con el estrógeno
FDA	Food and Drug Administration
FMNT	Feniletanolamina-N-metil-transferasa
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GIRK	Canales de potasio rectificadores de entrada asociados a proteína G
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación

GxE	Interacción gen-ambiente
HSP1/2	Promotores específicos de la cadena pesada 1 y 2
L-DOPA	L-Dihidrofenilalanina
MDA	Malondialdehído
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MPH	Metilfenidato
NA	Noradrenalina
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NET	Transportador de Noradrenalina
NMDA	Receptores N-metil-D-aspartato
NRF-1/2	Factor respiratorio nuclear 1 y 2
OSI	Índice de estrés oxidativo
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PBS	Amortiguador de fosfatos
PCR	Coactivador relacionado con PGC-1
PGC-1	Coactivador 1 del receptor y activado por proliferadores
PGC-1 α coactivador 1 α	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ (PPAR γ)
PON	Paraoxonasa
PPARs	Receptores activados por proliferador de peroxisomas
PPAR γ	Receptores activados por proliferador de peroxisomas γ
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Retrotranscripción
SDH-A	Subunidad del complejo II

SFB	Suero fetal bovino
SHR	Ratas preadolescentes con hipertensión espontánea
SNAP-25	Proteína asociada a sinaptosoma de 25kDa
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido dismutasa
TDH	Trastorno por déficit de atención e hiperactividad
TFAM	Factor de transcripción mitocondrial A
TFB1M	Factores de transcripción mitocondrial B1
TFB2M	Factores de transcripción mitocondrial B2
TH	Tirosina hidroxilasa
TOS	Estado total de antioxidantes
WB	Western Blot

Índice de figuras

Figura 1. Anomalías estructurales en pacientes con TDAH	5
Figura 2. Redes cerebrales involucradas en la neurobiología del TDAH.....	7
Figura 3. Biosíntesis de catecolaminas	8
Figura 4. Circuitos de los neurotransmisores involucrados en el TDAH	10
Figura 5. Esquema de la producción del estrés oxidativo y de las defensas antioxidantes.	12
Figura 6. Mecanismo de acción de la ATX.....	16
Figura 7. Componentes y metabolismo mitocondrial.....	21
Figura 8. Biogénesis mitocondrial..	25
Figura 9. Diagrama experimental	30
Figura 10. Separación de la muestra en la extracción de RNA.	35
Figura 11. Diferenciación de las células SH-SY5Y a un fenotipo parecido a neurona. .	38
Figura 12. Efecto del tratamiento con ATX sobre la biogénesis mitocondrial en células SH-SY5Y diferenciadas.....	40
Figura 13. Efecto del tratamiento con ATX sobre la expresión de proteínas involucradas en la biogénesis mitocondrial.	41
Figura 14. Imagen representativa de la integridad del RNA.	42
Figura 15. Efecto del tratamiento con ATX sobre la biogénesis mitocondrial a nivel de RNAm en células SH-SY5Y diferenciadas.....	44

Resumen

Antecedentes: El trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) es un trastorno de alta prevalencia en niños y adolescentes, el cual puede progresar hasta la edad adulta; es multifactorial y clínicamente heterogéneo, por lo que existen diferentes áreas del cerebro involucradas, entre las que destaca la corteza prefrontal, así mismo el desequilibrio en los sistemas dopaminérgicos y noradrenérgicos se han relacionado con los síntomas centrales que caracterizan este trastorno. El tratamiento comprende tanto terapia farmacológica como no farmacológica, los medicamentos de primera elección son los psicoestimulantes como el metilfenidato (MPH) y las anfetaminas, así como no psicoestimulantes que comprende a la atomoxetina (ATX). Estudios previos en el laboratorio demostraron que el tratamiento durante 7 días con ATX en células SH-SY5Y diferenciadas provocó un aumento en la producción de ROS, alteración en la función mitocondrial y aumento del proceso de autofagia en las concentraciones de 20 μM y 50 μM , así como un aumento en la masa mitocondrial y una disminución del proceso de autofagia en la concentración de 10 μM , por lo que el **objetivo** del presente estudio fue caracterizar el efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de ATX sobre la biogénesis mitocondrial en células SH-SY5Y diferenciadas. **Metodología:** Se empleó la línea celular SH-SY5Y derivada de neuroblastoma humano, la cual fue diferenciada a un fenotipo parecido a neurona empleando ácido retinoico durante 7 días, realizando a la par el tratamiento con las diferentes concentraciones de ATX. Posteriormente se realizó WB y qRT-PCR para identificar la expresión de los mediadores involucrados en la biogénesis mitocondrial. **Resultados:** Se observó un aumento en la expresión de las proteínas involucradas en el proceso de la biogénesis mitocondrial, así como del RNA mensajero con la concentración de ATX 10 μM , por el contrario, se observó un decremento en la expresión de estas proteínas, así como del mensajero con la concentración más alta de ATX (50 μM). **Conclusiones:** El tratamiento con ATX tiene un efecto dual sobre el proceso de la biogénesis mitocondrial, que depende de la concentración de ATX utilizada.

I. Introducción

- Trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH)

El TDAH o también conocido como trastorno hiperactivo es una afección neurológica del desarrollo, altamente prevalente multifactorial y clínicamente heterogéneo caracterizado por síntomas como hiperactividad, impulsividad y falta de atención (Biederman, 2005; Faraone et al., 2015; Purper-Ouakil et al., 2011). Es el trastorno más común entre niños y jóvenes de todo el mundo, en el 2007 un meta-análisis de más de 100 estudios estimó que la prevalencia mundial de TDAH en niños y adolescentes era del 5.3% (Voeller, 2004). Según datos de la Secretaría de Salud se calcula que en México existen alrededor de 1.5 millones de niños con TDAH, sin embargo, es importante aclarar que no existen estudios epidemiológicos a nivel nacional sobre la prevalencia del TDAH en la República Mexicana. Se sabe que los síntomas persisten incluso en la edad adulta hasta en el 50% de los casos y se asocian con deterioro funcional y mayor riesgo de depresión, abuso de sustancias y comportamiento antisocial (Kamradt, Momany, & Nikolas, 2018; Purper-Ouakil et al., 2011; Tejeda-Romero et al., 2018). En niños y adolescentes el TDAH afecta predominantemente a hombres y exhibe una proporción entre hombres y mujeres de 4:1 en estudios clínicos y de 2.4:1 en estudios de población. En la edad adulta esta discrepancia sexual casi desaparece, posiblemente debido a los sesgos que se derivan entre los pacientes que buscan tratamiento o los efectos específicos del sexo del TDAH en el curso del trastorno (Voeller, 2004)

Una característica clínica clave observada en pacientes con TDAH es la comorbilidad, la cual es otra dimensión clínicamente importante de la heterogeneidad del trastorno, cerca del 70% de los casos están asociados con comorbilidades (Voeller, 2004), algunos pacientes tienen un patrón complejo de problemas múltiples que incluyen trastornos de la comunicación, discapacidades intelectuales, trastorno del sueño, discapacidades de aprendizaje específicas, trastornos del estado de ánimo, comportamiento disruptivo, trastornos de ansiedad y por consumo de sustancias (Biederman, 2005; Kamradt et al., 2018). Estos síntomas comórbidos se ven reflejados en una variedad de contextos que incluyen entornos sociales, académicos y ocupacionales que afectan directamente las

percepciones de bienestar, ya que corren un alto riesgo de fracaso escolar, conflictos familiares, rechazo social y comportamiento delictivo (Voeller, 2004).

- Fisiopatología

Debido a la heterogeneidad del TDAH su fisiopatología involucra diversos factores como lo son:

a) Factores genéticos.

Los estudios han demostrado que los familiares de pacientes con TDAH tienen un mayor riesgo de padecer el trastorno, la mayoría de los estudios han identificado un aumento de dos a ocho veces el riesgo de TDAH en padres y hermanos de niños con TDAH (Biederman, 2005; Purper-Ouakil et al., 2011), sobre la base de datos del genoma completo (GWAS) aproximadamente el 40% de la heredabilidad del TDAH se puede atribuir a numerosas variantes genéticas comunes. Sin embargo, no se han identificado genes específicos de TDAH, pero diversos estudios arrojaron genes candidatos que sugieren una fuerte asociación del TDAH y los genes implicados en los sistemas de neurotransmisión catecolaminérgica, así como de la proteína asociada a sinaptosomas de 25 kDa (SNAP 25), la cual es una proteína presináptica de la membrana plasmática involucrada en la regulación de la liberación de neurotransmisores. Dichos sistemas han sido implicados en la fisiopatología del TDAH por los mecanismos de acción utilizados en el tratamiento clínico (Faraone & Mick, 2010; Swanson et al., 2007; Voeller, 2004). Aunque estas asociaciones son pequeñas y consistentes con la idea de que la vulnerabilidad genética al TDAH está mediada por muchos genes que presentan efectos mínimos. Estos pequeños efectos enfatizan la necesidad de futuros estudios de genes candidatos para implementar estrategias que proporcionen suficiente poder estadístico para detectar estos pequeños efectos (Faraone & Mick, 2010).

b) Factores ambientales.

Se han propuesto varios factores ambientales que podrían aumentar el riesgo de desarrollar TDAH (Pineda et al., 2007). La identificación de las causas ambientales es

complicada porque las asociaciones ambientales pueden surgir de otras fuentes, como las conductas de los niños o de los padres que le dan forma al entorno. Se han propuesto varios factores biológicos como contribuyentes al TDAH, incluidos los aditivos alimentarios/dietéticos, la contaminación por plomo, la exposición al cigarrillo y al alcohol materno durante el embarazo y el bajo peso al nacer (Biederman, 2005; Voeller, 2004). De todos ellos, se encontró que la exposición prenatal a la nicotina (Sourander et al., 2019) y el alcohol aumentan la incidencia de TDAH (Pineda et al., 2007), el tabaquismo materno prenatal se asoció con un aumento de 4 veces en el riesgo de TDAH ya que los receptores nicotínicos modulan la actividad dopaminérgica y se cree que la alteración dopaminérgica está involucrada en la fisiopatología del TDAH. Los estudios en animales han demostrado una correlación positiva entre la hiperactividad y la exposición crónica a la ingesta materna de nicotina durante el embarazo (Biederman, 2005; Swanson et al., 2007). La contaminación con plomo puede causar distracción, hiperactividad, inquietud y menor funcionamiento intelectual; el riesgo de TDAH se asoció con exposiciones al plomo incluso por debajo de 5 µg/dL, sin embargo, el plomo no es responsable de la mayoría de los casos de TDAH, y muchos niños con alta exposición al plomo no desarrollan TDAH (Biederman, 2005; Braun et al., 2006). Estudios recientes han evaluado la asociación de TDAH con bajo peso al nacer (<2500 g) o parto prematuro (<37 semanas de gestación). Estudios encontraron que los niños con TDAH eran 3.1 veces más propensos a tener bajo peso al nacer, incluso después de que los posibles factores de confusión, como la exposición al alcohol y los cigarrillos, fueran tomados en cuenta. Sin embargo, bajo el supuesto de una prevalencia poblacional de bajo peso al nacer de 8.2%, estimaron que el porcentaje de riesgo atribuible de la población era bajo (13.8%) y, por lo tanto, de importancia práctica limitada (Mick et al., 2002; Pineda et al., 2007). De manera similar a los factores genéticos los efectos de riesgo ambiental podrían reflejar cambios variables en muchos casos o más grandes en algunos otros. Además, en lugar de ser específicos del TDAH estos factores ambientales están asociados con diversos trastornos psiquiátricos (Biederman, 2005).

c) Interacciones gen-ambiente (GxE).

Además de los efectos principales del medio ambiente la alta heredabilidad del TDAH sugiere que las interacciones gen-ambiente (GxE) podrían ser un mecanismo principal por el cual los factores ambientales aumentan el riesgo del TDAH (Voeller, 2004). Las interacciones GxE funcionan de dos maneras: 1) un factor genético puede aumentar o disminuir el impacto de un ambiente en particular y 2) un factor ambiental puede activar un efecto genético. La interacción GxE puede explicar una proporción significativa de la heterogeneidad clínica del TDAH al aumentar la varianza fenotípica más allá de los efectos principales de los genes y el medio ambiente. Se ha informado la presencia de GxE entre diversas variantes genéticas y factores ambientales, como el tabaquismo materno, el consumo materno de alcohol durante el embarazo y la adversidad psicosocial, los resultados parecen ser más consistentes para los factores psicosociales en comparación con los factores prenatales (Purper-Ouakil et al., 2011; Swanson et al., 2007). El éxito futuro en estas interacciones requiere el uso de grandes conjuntos de datos que pueden combinar estudios genéticos a gran escala con los datos registrados sobre la exposición a riesgos ambientales (Voeller, 2004).

- Neurobiología y Mecanismos cerebrales en el TDAH

La neurobiología del TDAH no se comprende completamente; sin embargo, existe una gran variación en la propagación, la frecuencia de aparición y el grado de deterioro de los síntomas en el TDAH, lo que involucra que las redes neurológicas asociadas con él sean altamente heterogéneas, no obstante, hay pruebas sólidas de diferencias cerebrales estructurales, funcionales y neuroquímicas en el TDAH en regiones que soportan funciones cognitivas vitales. Aunque hay inconsistencias entre los estudios, es notable que el patrón de déficits que ha surgido en los estudios neurobiológicos, de neuroimagen y neuropsicológicos del TDAH a lo largo del ciclo de vida, apoya que existen anomalías estructurales cerebrales en pacientes con este trastorno, y los hallazgos más comunes involucran una disminución en el volumen cerebral, el cerebelo y las estructuras subcorticales, además de maduración más lenta y conectividad reducida en la corteza prefrontal (CPF), la corteza cingulada anterior (CCA) y los ganglios basales (**Figura 1**)

(Biederman, 2005; Castellanos, Sonuga-Barke, Milham, & Tannock, 2006; Shaw et al., 2007).

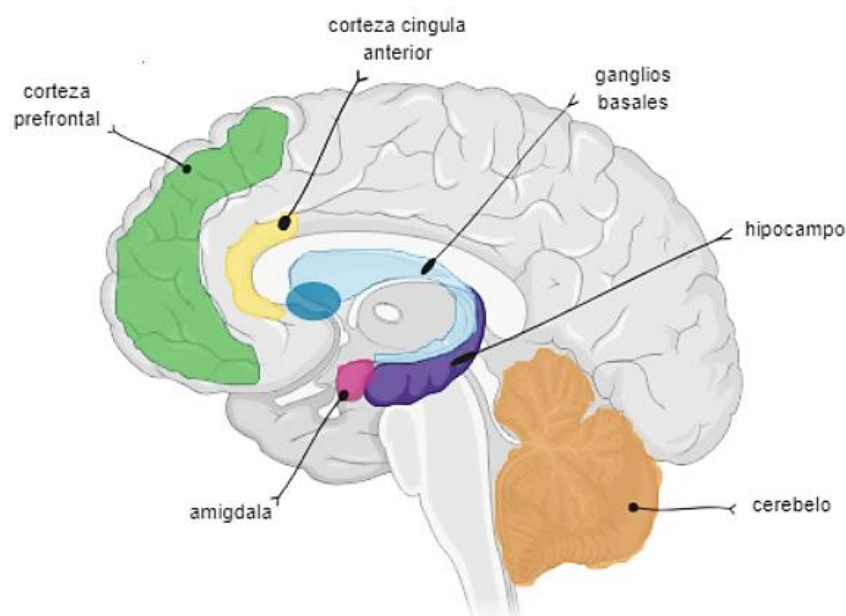


Figura 1. Anomalías estructurales en pacientes con TDAH. Los hallazgos comunes sugieren ciertas alteraciones en la maduración y disminución en el peso de la corteza prefrontal, corteza cingulada anterior y estructuras subcorticales, que comprenden el hipocampo, la amígdala, los ganglios basales y el cerebelo.

Alteraciones en la CPF y sus redes neuronales se han asociado al TDAH, la CPF tiene una gran cantidad de funciones cognitivas, la CPF dorsolateral está vinculada a la memoria de trabajo y la CPF ventromedial a la toma de decisiones complejas y planificación estratégica (Shaw et al., 2007; Voeller, 2004). Así mismo, como se mencionó anteriormente se identifican anomalías en la CCA y el sistema corticoestriatal. La CCA tiene fuertes conexiones con la CPF dorsolateral y se considera que desempeña un papel fundamental en el procesamiento cognitivo complejo, en particular en la detección de objetivos, selección de respuestas, detección de errores y toma de decisiones basada en recompensas, además está conectada con centros subcorticales, como la amígdala, el tálamo, el estriado y el tronco cerebral, por lo que recientemente la CCA ha atraído una atención considerable como una de las estructuras principales implicadas en este trastorno (Makris et al., 2008).

Las redes o circuitos cerebrales (**Figura 2**) que han mostrado una falta de activación involucrados en el TDAH comprenden: la red frontoestriatal (flechas amarillas), que se ha relacionado con el control cognitivo y el procesamiento de recompensas; la red frontoparietal (flechas cafés) que media los procesos ejecutivos dirigidos a objetivos; el control ejecutivo (flechas negras) y la red corticocerebelosa (flechas rojas) coordinan el funcionamiento ejecutivo, es decir, la planificación, el comportamiento dirigido a objetivos, la inhibición de la respuesta y la memoria de trabajo; la red de recompensa (flechas azules) en la cual la CFP, tálamo, ganglios basales y núcleo accumbens están en el centro de la red cerebral que responde a la anticipación; la red atencional (flechas verdes) en la que se relacionan la corteza frontal, la corteza motora suplementaria y la corteza parietal; y por último la red de alerta (flechas moradas), en donde el área corticofrontal, parietal y el tálamo interactúan intensamente en esta red, que apoya el funcionamiento atencional (Purper-Ouakil et al., 2011; Voeller, 2004).

Debido a la complejidad de los circuitos prefrontales, aún no está claro si las anomalías prefrontales en el TDAH son secundarias a las alteraciones de la CPF o a las áreas cerebrales con proyecciones frontales. Por lo tanto, el término "fronto-subcortical" proporciona una descripción neuropsicológica adecuada del TDAH y denota una disfunción cognitiva o de comportamiento que parece frontal pero que podría verse influida por proyecciones subcorticales (Biederman, 2005). Sin embargo, los pacientes con TDAH también han mostrado una activación temporal y parietal reducida, estos hallazgos de anomalías funcionales en las áreas parietales y temporales superiores confirman la evidencia reciente de que la disfunción cerebral en el TDAH no se limita a las redes fronto-subcorticales sino que se extiende a las áreas del cerebro temporo-parietales durante las tareas de atención y control cognitivo (Rubia et al., 2009).

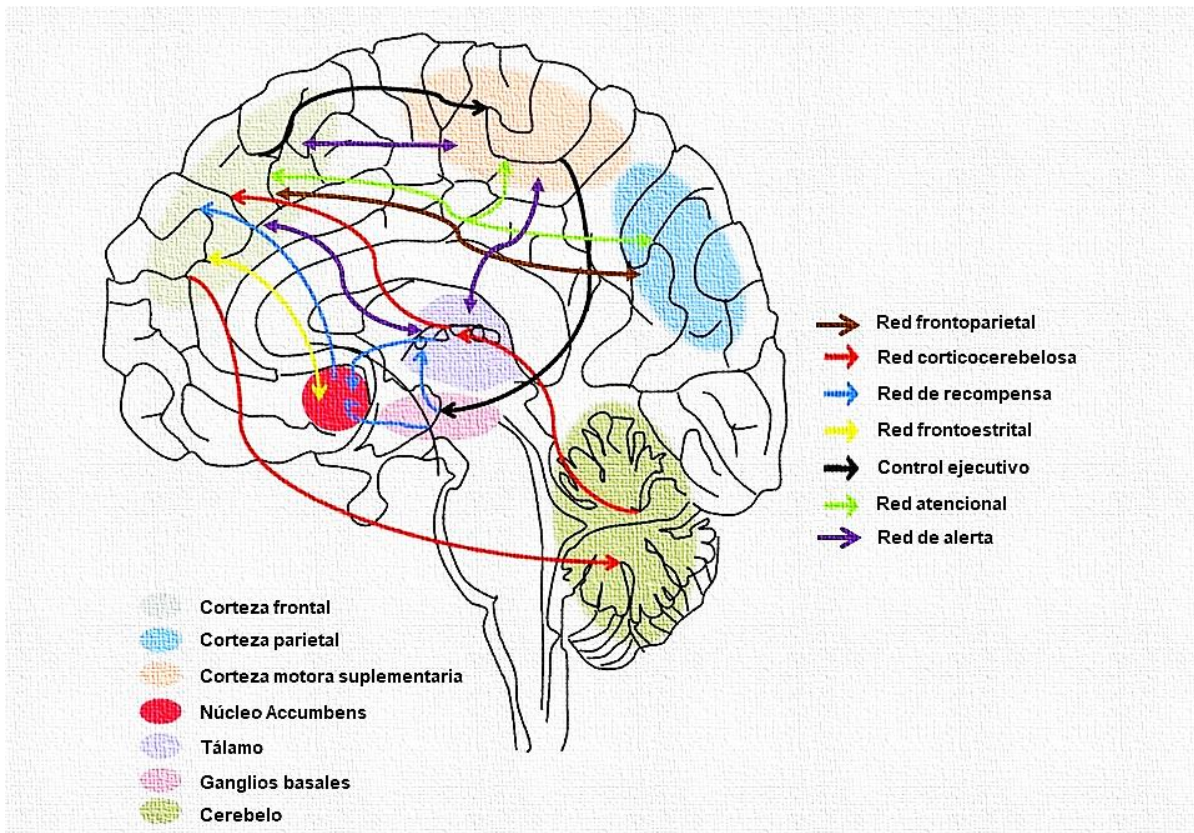


Figura 2. Redes cerebrales involucradas en la neurobiología del TDAH. Se esquematiza las principales redes neuronales, así como las áreas del cerebro que las conectan y se ven involucradas en el TDAH. (Tomado y modificado de Purper-Ouakil et al., 2011)

Una revisión detallada de las regiones y redes involucradas en el TDH indica que las alteraciones difusas y más específicas en las estructuras cerebrales y las redes neuronales posiblemente se combinan en este trastorno y conducen a fenotipos cerebrales organizados (Purper-Ouakil et al., 2011).

- Neuroquímica del TDAH y el sistema catecolaminérgico

Los mecanismos de la fisiopatología del TDAH no se comprenden completamente, aunque el desequilibrio en los sistemas dopaminérgicos y noradrenérgicos se han relacionado con los síntomas centrales que caracterizan este trastorno. Las vías de los sistemas fronto-subcorticales asociadas con el TDAH son ricas en catecolaminas, que

como se mencionó anteriormente son los principales genes candidatos involucrados en la fisiopatología del trastorno, dado el importante papel de las catecolaminas en el TDAH, cabe esperar alteraciones en el metabolismo de estos neurotransmisores (Biederman, 2005).

Las catecolaminas son neurotransmisores que incluyen a la adrenalina (A), noradrenalina (NA) y dopamina (DA), las cuales son sintetizadas a partir de la tirosina. En la biosíntesis de las catecolaminas (**Figura 3**) participan cuatro enzimas: la tirosina hidroxilasa (TH), que cataliza el primer paso de conversión de la tirosina en L-Dihidroxifenilalanina (L-DOPA); la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (DOPA descarboxilasa) catalizadora de la conversión de L-DOPA en DA; la dopamina β -hidroxilasa (DA- β -H), que convierte la DA en NA, y por último la feniletanolamina-N-metil-transferasa (FNMT), que cataliza la conversión de la NA en A (Taira et al., 2012).

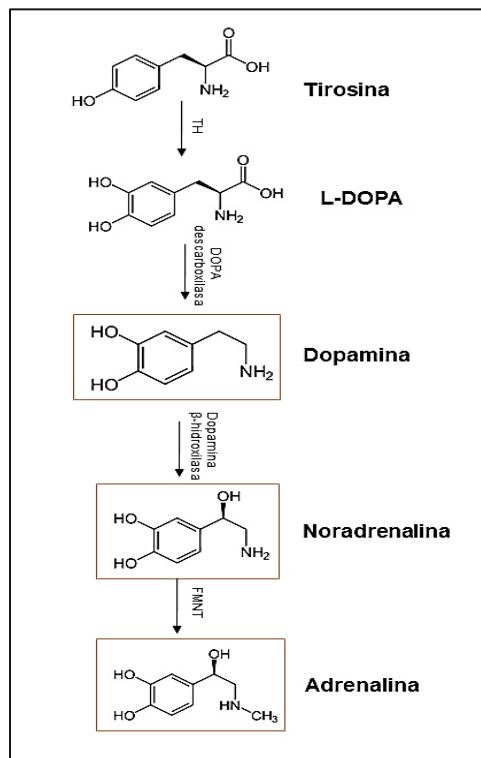


Figura 3. Biosíntesis de catecolaminas. Ruta de la síntesis de dopamina, noradrenalina y adrenalina. TH: Tirosina hidroxilasa, FNMT: feniletanolamina-N-metil-transferasa (Tomado y modificado de Taira et al., 2012).

La DA desempeña un papel importante en la planificación y el inicio de respuestas motoras, la activación, el cambio, la reacción a novedad y el procesamiento de recompensa (Voeller, 2004), las neuronas dopaminérgicas están presentes mayoritariamente en el área tegmental ventral del cerebro-medio, la parte compacta de la sustancia negra y el núcleo arcuato del hipotálamo, se conectan a través de distintas vías a varias áreas del cerebro, pero las vías relacionadas principalmente con los circuitos neuronales afectados por el TDAH son: la vía mesocortical la cual es una ruta de neuronas que conecta al área tegmental ventral a la corteza cerebral, en particular a nivel del lóbulo frontal; la vía mesolímbica que comienza en el área tegmental ventral del mesencéfalo y se conecta con el sistema límbico por medio del núcleo acuminado, la amígdala cerebral y el hipocampo, así como con la CPF; la vía nigroestriada que se conecta hacia ganglios basales y cuerpo estriado (**Figura 4** flechas rojas) (Velasco Martín & Álvarez González, 1988). Por otro lado, el sistema noradrenérgico influye en la modulación de la excitación, la relación señal-ruido en las áreas corticales, los procesos cognitivos dependientes del estado, preparación cognitiva de estímulos urgentes, la motivación, el estado de alerta y vigilia, el nivel de conciencia, la neuromodulación de los mecanismos de recompensa, aprendizaje y memoria (Tellez, 2000; Voeller, 2004). Las neuronas noradrenérgicas están localizadas en el locus coeruleus y en el área tegmental lateral, desde allí proyectan sus conexiones al tálamo, la amígdala, el hipocampo, el hipotálamo y la corteza cerebral (**Figura 4** flechas azules) (Velasco Martín & Álvarez González, 1988).

Estudios a pacientes con TDAH establecen que presentan una transmisión deficiente de DA y NA que afectan la función de la CPF (Bouchatta et al., 2018). Pliszka et al., (1996) sugieren que una actividad noradrenérgica reducida contribuye a los déficits de atención y la distracción, así mismo una pérdida de DA podría inducir déficits y perjudicar las funciones ejecutivas.

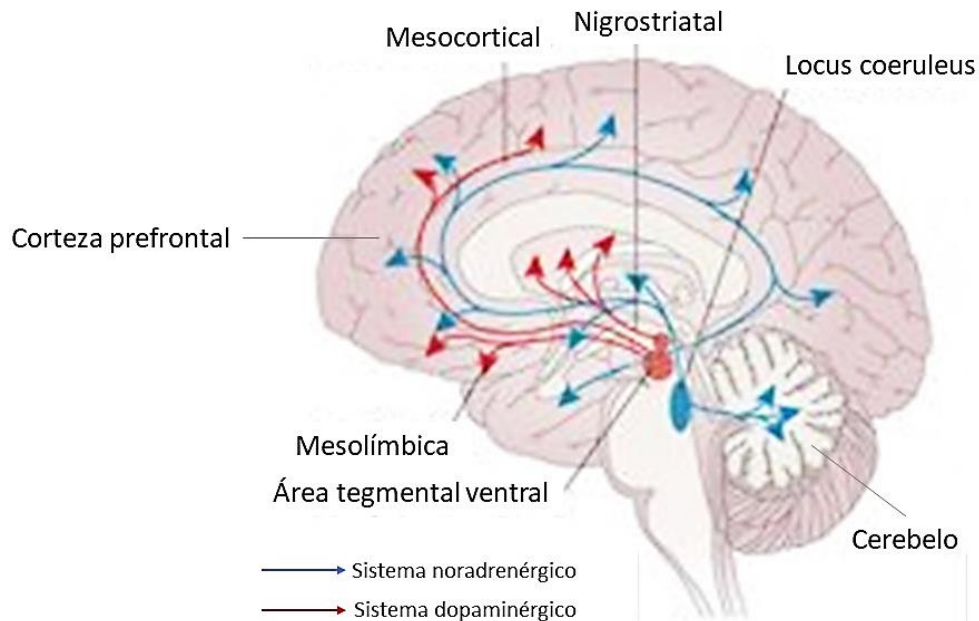


Figura 4. Circuitos de los neurotransmisores involucrados en el TDAH. Áreas del cerebro involucradas en las vías del sistema dopaminérgico y noradrenérgico. Tomado y modificado de (Faraone et al., 2015).

- Estrés oxidativo y TDAH

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés), como el superóxido, el óxido nítrico, el peroxinitrito y el peróxido de hidrógeno, son moléculas inestables que pueden reaccionar con diferentes macromoléculas (Kelly, Havrillal, Brady, Abramo, & Levin, 1998). Se generan durante el metabolismo celular normal, y se ha establecido que más del 90% de las ROS son producidas por las mitocondrias, debido a que la mayoría de estas se generan a través del escape de electrones en la cadena transportadora de electrones mitocondrial (CTE) (Lushchak, 2014). Las ROS y RNS también pueden generarse a partir de la irradiación con luz ultravioleta, contaminantes ambientales, por neutrófilos, eosinófilos y macrófagos durante la inflamación (Fox, 2011). A través de su influencia en las proteínas, los ácidos grasos y el ADN, las ROS y las RNS tienen numerosos papeles fisiológicos esenciales involucrados en la regulación de la función celular (Fox, 2011; Lushchak, 2014).

En condiciones normales (**Figura 5**), las ROS y RNS están reguladas por un sistema de equilibrio antioxidante multinivel y complicado que opera ya sea para eliminar las ROS y RNS o para minimizar sus efectos. El grupo de antioxidantes incluye a la coenzima Q 10 (CoQ10), el glutatión (GSH), la vitamina C (ácido ascórbico) y E (tocoferol), carotenoides, antocianinas y polifenoles, además comprenden diferentes enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPX) y la catalasa (CAT) (Kelly et al., 1998; Lushchak, 2014; Fox, 2011). Algunas proteínas, incluidas las proteínas de fase aguda, como la albúmina, la transferrina, la haptoglobina y la ceruloplasmina, también funcionan como antioxidantes al unirse a las ROS y RNS (Lopresti, 2015).

La producción excesiva de ROS puede dañar lípidos, proteínas, DNA, y por este medio, ejercer un estrés oxidativo sobre el organismo. Un estado de estrés oxidativo ocurre cuando hay un desequilibrio entre las ROS y las defensas antioxidantes; este equilibrio puede ser perturbado bajo diferentes circunstancias como: 1) aumento del nivel de moléculas endógenas y exógenas que entran en autooxidación junto con la producción de ROS, 2) agotamiento de las defensas de antioxidantes en el cuerpo y 3) inactivación de las enzimas antioxidantes (Lushchak, 2014). El estrés oxidativo puede ser perjudicial para el organismo y provocar cambios estructurales y funcionales que producen lesiones celulares. Tiene efectos perjudiciales de amplio alcance; promueve la muerte celular (apoptosis), contribuye al envejecimiento y a enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento, promueve el crecimiento maligno de cánceres, y contribuye a todas las enfermedades inflamatorias (como glomerulonefritis, artritis reumatoide y lupus eritematoso) (Verlaet et al., 2019). Además, el estrés oxidativo se ha implicado en diversas enfermedades neurológicas, entre ellas esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y otras (Dimitrion et al., 2017). El estrés oxidativo también tiene la capacidad de dañar los sistemas de defensa mitocondrial, perpetuando aún más las ROS y RNS, lo que deriva en la amplia gama de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Fox, 2011). Algunos órganos, como el cerebro, son más vulnerables a los efectos perjudiciales del estrés oxidativo provocado por las ROS y RNS debido a su alto nivel de utilización de oxígeno y menor concentración de antioxidantes, así mismo el alto contenido de lípidos del cerebro empeora el problema porque los lípidos actúan como un sustrato para la oxidación (Lopresti, 2015).

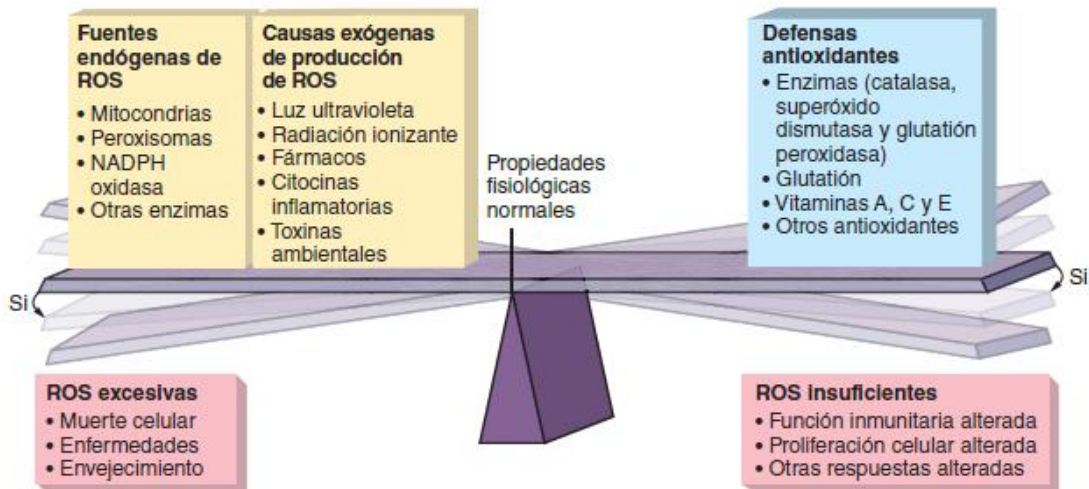


Figura 5. Esquema de la producción del estrés oxidativo y de las defensas antioxidantes. Las propiedades fisiológicas normales requieren que las ROS y RNS se mantengan en equilibrio (Tomado de Fox, 2011)

Se ha demostrado que los niños y adultos con TDAH tienen un aumento de biomarcadores de RNS y ROS en sangre, orina y saliva (Lopresti, 2015). Diversos estudios indican que existe un desequilibrio oxidativo en niños y adolescentes con TDAH debido a que presentan niveles de oxidantes más altos, por ejemplo, se ha reportado que existe un aumento en el estado total de oxidantes (TOS) y en el índice de estrés oxidativo (OSI) (Sezen et al., 2016), así como niveles más altos de malondialdehído (MDA) el cual es el producto de degradación de las principales reacciones en cadena que conducen a la oxidación de ácidos grasos polinsaturados y por lo tanto funciona como un marcador de estrés oxidativo, en niños (Ceylan et al., 2010; Verlaet et al., 2019) y adultos (Bulut et al., 2013, 2007), además de un incremento en la concentración de óxido nítrico tanto en niños (Ceylan et al., 2012; Ceylan et al., 2010), como en adultos (Selek et al., 2008). Por otro lado, los informes sobre la actividad antioxidante son inconsistentes con respecto al TDAH, ya que existen estudios que reportan una disminución en algunas enzimas antioxidantes como la GPX (Ceylan et al., 2010) y la SOD (Selek et al., 2008), así como de la paraoxonasa (PON) lo cual es una enzima asociada a lipoproteínas de alta densidad (HDL) que juega un papel antioxidante, ya que

protege tanto a las HDL, y a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la modificación oxidativa. Se ha demostrado que la deficiencia de esta enzima se relaciona con una mayor susceptibilidad a la peroxidación lipídica (Bulut et al., 2013; Ceylan et al., 2012; Sezen et al., 2016). Sin embargo, existen estudios que reportan aumento de GSH (Verlaet et al., 2019) o de otros antioxidantes como la Vitamina E (Spahis et al., 2008) o que no existe ningún cambio en los antioxidantes de los pacientes con TDAH con respecto a los controles sanos (Karababa et al., 2017; Oztop, Altun, Baskol, & Ozsoy, 2012), además de reportar un aumento en los niveles de MDA (Oztop et al., 2012; Spahis et al., 2008) así como de TOS (Karababa et al., 2017). Finalmente un meta-análisis realizado en 2015 sugiere que los pacientes con TDAH tienen niveles normales de producción de antioxidantes, pero que su respuesta al estrés oxidativo es insuficiente, lo que lleva a un daño oxidativo (Joseph, Zhang-James, Perl, & Faraone, 2015).

Sumado a lo anterior, estudios en modelos de animales han demostrado que medicamentos empleados en el TDAH, como el metilfenidato (MPH), tienen un impacto sobre el estrés oxidativo, ya que el tratamiento con dicho medicamento aumentó la producción de ROS y disminuye la actividad de algunas enzimas antioxidantes como la CAT y la SOD (Comim et al., 2014; Martins et al., 2006). Además, el TDAH se asocia con una mayor exposición al tabaquismo prenatal, a la exposición postnatal con plomo y a otros contaminantes ambientales. Así, la nicotina y la exposición al plomo pueden aumentar significativamente la actividad de las ROS y RNS. Además, los trastornos que presentan mayor comorbilidad con el TDAH como la depresión, las condiciones de ansiedad y el trastorno bipolar, están asociados con un aumento de las ROS y RNS, lo que podría explicar, en parte, el aumento de ROS observado en el TDAH (Lopresti, 2015).

- Tratamiento farmacológico del TDAH

Los cambios en la función dopaminérgica y noradrenérgica parecen ser necesarios para la eficacia clínica de los tratamientos farmacológicos del TDAH. Un modelo plausible para los efectos de los medicamentos en el TDAH sugiere que, a través de las vías dopaminérgicas y/o noradrenérgicas, estos agentes aumentan las influencias inhibitorias

de la actividad cortical frontal en las estructuras subcorticales (Biederman, 2005). Por ello todos los tratamientos farmacológicos del TDAH optimizan la señalización de las catecolaminas en la CPF. La elección de la medicación se basa en la evaluación de la gravedad de los síntomas, la presencia de comorbilidades y qué periodos del día son preferibles para aliviar los síntomas (Voeller, 2004).

Los medicamentos de primera elección para el tratamiento del TDAH son los psicoestimulantes que comprenden al metilfenidato (MPH) y las anfetaminas, los cuales reducen los síntomas del TDAH (es decir, la falta de atención, la hiperactividad, e impulsividad), los mecanismos de acción de estos fármacos incluyen inhibir el transportador de DA y bloquear la recaptura de DA y NA en la neurona presináptica, lo que aumenta la liberación de estas catecolaminas en el espacio extraneuronal. Los psicoestimulantes actúan principalmente sobre los receptores de dopamina tipo D1 en la CPF y sobre los receptores tipo D2 en el estriado (Biederman, 2005; Purper-Ouakil et al., 2011). Los efectos adversos comunes de los estimulantes son el insomnio inicial, disminución en el apetito, disforia e irritabilidad, aunque también se han asociado la aparición de tics y estados de ansiedad aguda (Voeller, 2004). Por otro lado, está el tratamiento con fármacos no psicoestimulantes, de los cuales existen dos clases aprobados para el tratamiento del TDAH; la atomoxetina (ATX), el cual es un fármaco que bloquea selectivamente el transportador NA y las formulaciones de acción prolongada de dos fármacos agonistas de los receptores α -adrenérgicos; la guanfacina y la clonidina que actúan en los receptores α -2A postsinápticos para mejorar la transmisión de la NA (Purper-Ouakil et al., 2011). Estos medicamentos son eficaces en el tratamiento del TDAH, pero los efectos sedantes de los agonistas α 2-adrenérgicos limitan su uso en algunos pacientes (Voeller, 2004). Se cree que los efectos terapéuticos de la estimulación con DA implican un debilitamiento de las conexiones de red inapropiadas, es decir, produciendo una disminución de "ruido" mientras que la transmisión de NA mejorada puede funcionar al fortalecer las conexiones apropiadas, es decir, producir un aumento de "señal" (Sontag et al., 2010). Los niveles óptimos de NA que actúan en receptores α 2-adrenérgicos sinápticos y los niveles de dopamina que actúan con receptores D1 son esenciales para la función de la CPF, por lo que el empleo

de estos medicamentos mejoran la neurotransmisión de NA y DA prefrontal (Koda et al., 2010) .

El conocimiento actual sobre los mecanismos neurobiológicos de los tratamientos farmacológicos en el TDAH sugiere que, a pesar de que hay algunos solapamientos, los medicamentos muestran efectos diferenciales con los psicoestimulantes que tienen efectos amplios sobre los déficits de atención y los síntomas motores y los no psicoestimulantes que probablemente tengan una acción más específica en la CPF. Los recientes desarrollos en la investigación terapéutica han ampliado la gama de medicamentos para el tratamiento del TDAH (Corona, 2018). Sin embargo, es necesario que la investigación mejore los tratamientos dirigidos a los patrones de síntomas individuales, el nivel de desarrollo y, posiblemente, el estado de maduración cerebral (Purper-Ouakil et al., 2011).

- La Atomoxetina

La atomoxetina (ATX) se aprobó por la Food and Drug Administration (FDA, por sus siglas en inglés) como un nuevo medicamento para el tratamiento del TDAH, la cual se comercializó en el 2002, la ATX actúa inhibiendo selectivamente el transporte de NA a nivel presináptico, incrementando así los niveles de este neurotransmisor en el espacio sináptico (**Figura 6**) (Tzavara et al., 2006). Además, se ha probado con éxito en el tratamiento del TDAH en el contexto de la comorbilidad con tics, ansiedad y depresión, asimismo algunos datos sugieren que la ATX puede mejorar modestamente la dislexia (Voeller, 2004). Las ventajas clínicas de la ATX con respecto a los tratamientos con estimulantes es que no hay ningún potencial de abuso, ya que no presenta ningún efecto conocido en regiones del cerebro relacionadas con el abuso de drogas, como el núcleo accumbens o el estriado (Koda et al., 2010). Además es menos propensa que el MPH a exacerbar el sueño en pacientes pediátricos con TDAH (Purper-Ouakil et al., 2011). Los efectos adversos comunes incluyen dolor de cabeza, dolor abdominal y náuseas, la mayoría de los efectos reportados fueron leves o moderados. Aproximadamente, del 40-50% de los pacientes no responden al tratamiento con MPH, pero sí al tratamiento con ATX, y hasta el 75% de los pacientes que responden al tratamiento con MPH también lo

hacen a la ATX (Garnock-Jones & Keating, 2009). Un estudio realizado en ratones mostró que el tratamiento agudo con ATX en dosis de 0.3-3 mg/kg y crónico (1 mg/kg) aumentó significativamente los niveles de NA y DA en la corteza prefrontal pero no en el estriado; el aumento en los niveles de DA puede deberse a que el aumento de NA puede activar a las neuronas dopaminérgicas y así favorecer el incremento en los niveles de DA (Koda et al., 2010).

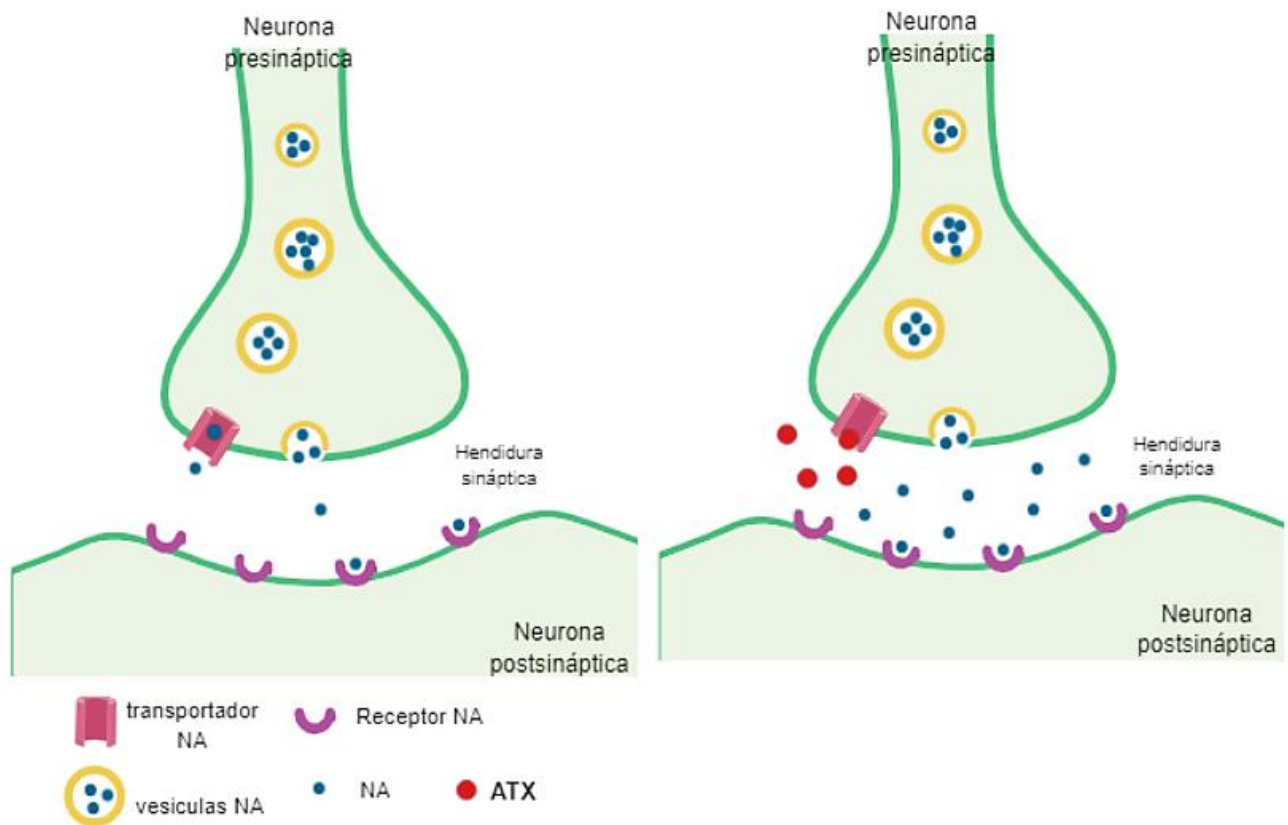


Figura 6. Mecanismo de acción de la ATX. La ATX bloquea el transportador de NA en la neurona presináptica por lo que aumenta los niveles de NA en el espacio sináptico (Tzavara et al., 2006).

- Mecanismos adicionales de la ATX

Varios estudios han indicado que la ATX también afecta algunas vías de transducción de señales por lo que es importante identificar principalmente qué vías moleculares potencialmente desconocidas se ven afectadas por la ATX. Un estudio realizado en ratas analizó los genes que podrían estar involucrados en el mecanismo molecular de los efectos de la ATX, se analizaron los cambios relativos en la expresión del RNAm en la CPF de ratas tratadas con 0.05 mg/kg de ATX durante las etapas de la infancia y la adolescencia temprana, debido a que esta área del cerebro ha sido reportada como una región objetivo principal para la ATX (Lempp et al., 2013). Los resultados revelaron la expresión diferencial de 125 genes en la CPF de ratas jóvenes después de 21 días de tratamiento con atomoxetina, de esos genes se enfocaron en el estudio de la proteína asociada a sinaptosoma de 25 kDa (SNAP-25), que es un gen candidato para el TDAH y una importante proteína de vesícula involucrada en el crecimiento axonal, la plasticidad sináptica y la regulación del neurotransmisor; las subunidades α -1 y β -3 del receptor GABA A, y complejo III de la ubiquinol-citocromo c reductasa (Uqcrc2). Observaron que existe una regulación a la alza en la expresión del RNAm y un aumento significativo en los niveles de proteínas de estos genes, por lo que indica que el fármaco está involucrado en la regulación transcripcional y de traducción de estos genes. Dado que la regulación negativa de los receptores GABA podría ser un mecanismo fisiopatológico en el TDAH, los aumentos inducidos por los fármacos en los niveles de los receptores podrían contrarrestar este mecanismo al mejorar la transducción de las señales GABAérgicas y reducir la concentración extracelular de GABA. Uqcrc2 es una enzima del complejo III mitocondrial involucrada en el transporte de electrones de la cadena respiratoria, se ha demostrado que la regulación de este gen está alterada en el CPF de los humanos que sufren un trastorno bipolar, lo que indica su participación en los trastornos psiquiátricos. Por otro lado, el aumento de la expresión de SNAP-25 apunta hacia un posible mecanismo terapéutico activo adicional de atomoxetina que implica un efecto sobre la exocitosis de neurotransmisores en la hendidura sináptica (Lempp et al., 2013), ya que SNAP-25 es una proteína unida a la membrana en las neuronas, que junto con sintaxina-1 y sinaptobrevina en el complejo de acoplamiento SNARE (complejo molecular que

facilita la fusión de vesículas en la secreción de un neuromediador), regula la exocitosis de vesículas sinápticas (Schiavo, Matteoli, & Montecucco, 2000).

Los receptores tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) son receptores de glutamato y están involucrados en los procesos de desarrollo neuronal y plasticidad, así como en procesos de aprendizaje y memoria. Un estudio en neuronas cultivadas investigó el posible impacto de la ATX en los receptores tipo NMDA. Analizaron si la ATX en concentraciones clínicamente relevantes afectaba a los receptores NMDA en las neuronas de diferentes regiones del cerebro, y encontraron que la ATX bloqueó el receptor NMDA (Ludolph et al., 2010). Los datos en este estudio podrían ser prueba de que la alteración de la neurotransmisión glutamatérgica podría desempeñar un papel fundamental en la fisiopatología del TDAH (Dorval *et al.* 2007; Ludolph et al., 2010).

Los mecanismos moleculares subyacentes a los diversos efectos de la ATX aún no se han aclarado lo suficiente. Los canales de potasio rectificadores de entrada asociados a proteínas G (GIRK, por sus siglas en inglés), tienen una función importante en la regulación de la excitabilidad neuronal y la frecuencia cardíaca, y se ha sugerido que la modulación del canal GIRK es un tratamiento potencial para varios trastornos neuropsiquiátricos y arritmias cardíacas. Los canales neuronales de GIRK son predominantemente heteromultímeros compuestos de subunidades GIRK1 y GIRK2 en la mayoría de las regiones cerebrales, u homomultímeros compuestos de subunidades GIRK2 en la sustancia negra. Se ha demostrado en ovocitos de *Xenopus* inyectados con RNAm para las subunidades GIRK, que la ATX inhibe los canales de tipo cerebral GIRK1/2 y GIRK2, así como los canales del tipo cardíaco GIRK1/4, se sugiere que la atomoxetina puede causar un cambio conformacional alostérico en los canales GIRK. Lo anterior revela una característica novedosa de uso clínico de la ATX. La inhibición del canal GIRK puede contribuir a algunos de los efectos terapéuticos de la ATX y los efectos secundarios relacionados con el sistema nervioso y la función cardíaca (Kobayashi, Washiyama, & Ikeda, 2010).

En un estudio realizado con un modelo animal establecido de TDAH, con ratas preadolescentes con hipertensión espontánea (SHR, por sus siglas en inglés), se observó la administración subcrónica de ATX sobre la plasticidad neuronal, a través de

un análisis detallado de la expresión y señalización del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el cual juega un papel importante en la promoción de la supervivencia, la diferenciación y la plasticidad sináptica neuronal (Tabuchi, Sakaya, Kisukeda, Fushiki, & Tsuda, 2002), para establecer la contribución de estos mecanismos en la farmacoterapia del TDAH (Fumagalli et al., 2010). Analizaron la expresión del exón I, IV y VI de BDNF, que están altamente expresados en el cerebro (Tabuchi et al., 2002), así como de la proteína madura, y encontraron que la ATX aumentó los niveles de RNAm de BDNF total en el hipocampo, CPF y corteza frontal; de igual manera aumento los niveles de RNAm del exón I y IV de BDNF y produjo un aumento significativo de los niveles de proteína madura de BDNF en la fracción sinaptosomal bruta, en la corteza prefrontal, además el análisis de la señalización mediada por BDNF en la corteza prefrontal reveló que ATX mejoró la fosforilación de AKT y GSK3 β (Fumagalli et al., 2010). La proteína quinasa B (AKT) forma parte de la vía de transducción de señales que promueve la supervivencia y el crecimiento en respuesta a señales extracelulares, AKT activado media las respuestas posteriores, incluida la supervivencia celular, el crecimiento, la proliferación, la migración celular y la angiogénesis, mediante la fosforilación de una gama de proteínas intracelulares. Por otro lado, la glucógeno sintasa quinasa 3- β es una enzima involucrada en el metabolismo energético y el desarrollo de células neuronales (Chen et al., 2013). La expresión mejorada de BDNF y la actividad de su vía de señalización promovida por ATX en la CPF podrían resultar beneficiosas para la plasticidad celular y la resistencia neuronal que mantienen la cognición (Fumagalli et al., 2010).

- La Mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos y móviles, que se desplazan entre estados "individuales" y de "red" caracterizados por morfologías distintas, esferas discretas o túbulos interconectados (Uittenbogaard & Chiaramello, 2014). Las mitocondrias desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de la integridad celular, así como en la fisiología y la patología del SNC (Corona & Duchon, 2015a). Son los principales productores de ATP en las células a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS),

mantienen la homeostasis del calcio, son productores de radicales libres y blancos de lesión inducida por ellos mismos, así mismo regulan la señalización de defensas antioxidantes, son reguladores de la homeostasis iónica y del estado redox; están directamente involucradas en el transporte de metabolitos, proteínas, en el metabolismo de lípidos, aminoácidos y actúan regulando las rutas de muerte celular, bajo estrés patológico, las mitocondrias generan una cantidad adicional de ROS y RNS y reciben una afluencia masiva de calcio (Corona & Duchon, 2015a; Li, Hou, & Hao, 2017; Palikaras et al., 2015).

Estructuralmente, las mitocondrias están compuestas por: la membrana mitocondrial externa (MME), el espacio intermembrana (EIM), la matriz que está encerrada por la membrana mitocondrial interna (MMI) la cual forma invaginaciones y estructuras en forma de saco dentro de la matriz de las mitocondrias, que se conocen como crestas, las cuales se expanden ampliamente en la superficie de la membrana, en la ocurren las transformaciones bioenergéticas que son fundamentales para la función mitocondrial (**Figura 7**). La MMI aloja los complejos de proteínas de la cadena de transporte de electrones (CTE) y proporciona una barrera altamente eficiente y selectiva para el flujo de iones; la matriz mitocondrial contiene las enzimas que impulsan el ciclo de Krebs y la beta-oxidación; la MME no se invagina y tiene una permeabilidad estrictamente menos regulada, lo que permite el paso de sustancias de bajo peso molecular, entre el citosol y MMI (Corona & Duchon, 2015a; Fox, 2011).

La permeabilidad y el transporte de metabolitos y proteínas entre la mitocondria y el resto de la célula son críticos en la biogénesis mitocondrial, en el mantenimiento de la competencia de la fosforilación oxidativa y la producción de ATP (Corona & Duchon, 2015a; Khacho, Harris, & Slack, 2019).

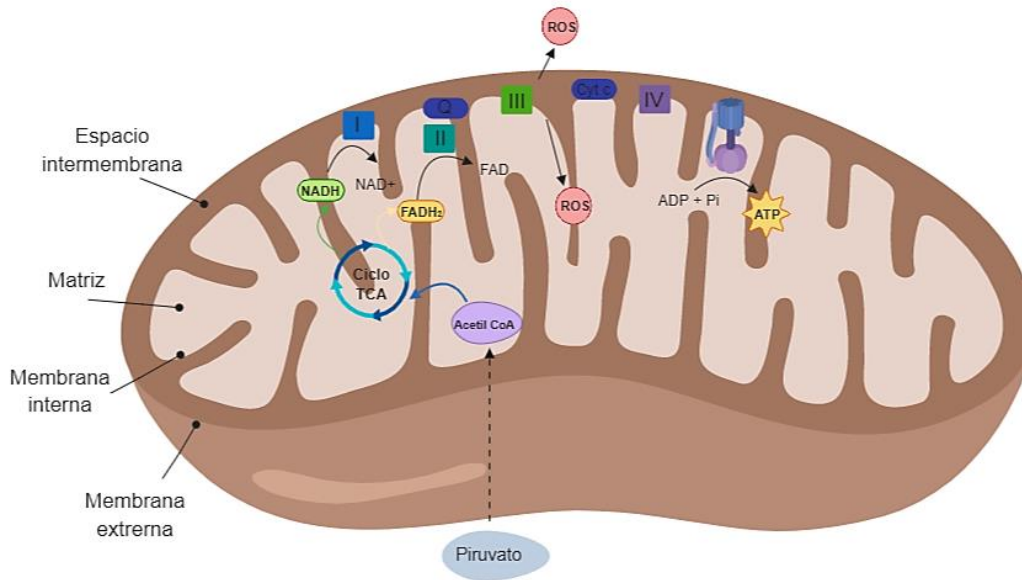


Figura 7. Componentes y metabolismo mitocondrial. Representación esquemática de algunos de los componentes del metabolismo mitocondrial, ilustra los metabolitos generados por el ciclo de Krebs y CTE, que incluye la generación de ATP, especies reactivas de oxígeno (ROS) y metabolitos que sirven como señalización.

El cerebro es un órgano que consume mucha energía, consume más del 20% de la energía total producida por el organismo, aunque solo representa entre 2 y 3% del peso corporal total. Las mitocondrias ocupan hasta el 40% del volumen citoplásmico de las células neuronales, por lo tanto, las neuronas en desarrollo dependen en gran medida de las mitocondrias para asumir su necesidad de energía asociada con la remodelación del citoesqueleto, el crecimiento axonal y dendrítico, el transporte axonal de vesículas sinápticas y la transmisión sináptica (Uittenbogaard & Chiaramello, 2014). De manera similar, un cerebro maduro requiere más del 50% del consumo de energía del cerebro para mantener la homeostasis y la plasticidad sináptica. Un sello distintivo del metabolismo cerebral es el estrecho acoplamiento entre la demanda y el suministro de energía, que implica la regulación constante de la homeostasis mitocondrial y la correcta localización de las mitocondrias en los distintos compartimentos subcelulares de las neuronas para atender las necesidades metabólicas regionales únicas en respuesta a señales (Li et al., 2017); por lo tanto, las mitocondrias no están distribuidas uniformemente entre los dominios subcelulares, el soma, el axón y las dendritas, se

transportan a compartimentos específicos de neuronas caracterizados por un alto consumo de ATP (Uittenbogaard & Chiaramello, 2014). En consecuencia, una biogénesis mitocondrial disfuncional o una alteración en el proceso de autofagia, las cuales son dos características patológicas de enfermedades neurodegenerativas, conducen a un metabolismo alterado, así como un procesamiento disfuncional de los circuitos neuronales y de la conectividad funcional en las neuronas maduras (Khacho et al., 2019; Li et al., 2017; Uittenbogaard & Chiaramello, 2014).

Dado todas las funciones que desempeña la mitocondria, está ejerce como un centro importante para varias vías distintas pero interconectadas, que son necesarias para el desarrollo neuronal, la supervivencia, la actividad, la conectividad y la plasticidad (Li et al., 2017), así mismo las mitocondrias tienen una vida media más larga en las neuronas que en otras células somáticas, su renovación es esencial para el desarrollo neuronal y la supervivencia adecuados (Uittenbogaard & Chiaramello, 2014).

- Biogénesis mitocondrial

La biogénesis mitocondrial es un proceso mediante el cual las células generan nuevas proteínas mitocondriales y, si es necesario, aumentan la masa mitocondrial. Varios factores fisiológicos y farmacológicos pueden producir la activación y regulación de este proceso, como hormonas, factores de crecimiento, fluctuaciones de temperatura (Corona & Duchon, 2015a). Además, se ha considerado una respuesta al aumento del trabajo, como en el ejercicio del músculo, o a los cambios en la disponibilidad de nutrientes, así como gases endógenos (Li et al., 2017). Estudios recientes han vinculado los defectos respiratorios celulares y la producción de ROS a la activación de la biogénesis mitocondrial como una estrategia utilizada por la célula para responder a diversos trastornos mitocondriales (Suliman & Piantadosi, 2014; Tapia, 2006).

La biogénesis mitocondrial es un proceso complejo que requiere una regulación bigenómica coordinada para ejecutar varios procesos distintos: 1) síntesis de la membrana mitocondrial interna y externa; 2) síntesis de proteínas codificadas por la mitocondria; 3) síntesis e importación de proteínas mitocondriales con codificación

nuclear; y 4) replicación del ADN mitocondrial (ADNmt) (Li et al., 2017; Uittenbogaard & Chiaramello, 2014). Dado el hecho de que el genoma mitocondrial tiene una capacidad de codificación limitada, la mayoría de la síntesis de proteínas mitocondriales está bajo el control del genoma con codificación nuclear. El ADNmt es una molécula bicatenaria circular de 16,569 pb que codifica 37 genes, estos genes mitocondriales controlan la síntesis de 13 subunidades de proteínas de la CTE y 24 componentes de RNA: 22 RNAt y dos RNAr, necesarios para la síntesis de proteínas mitocondriales (Fox, 2011; Onyango et al., 2010). Ninguno de los genes mitocondriales codifica proteínas directamente involucradas en la replicación y el mantenimiento del ADNmt, la mayoría de las ~1500 proteínas mitocondriales diferentes están codificadas por el ADN nuclear (ADNn), se traducen en el citoplasma y se transportan a las mitocondrias, por lo tanto, la masa mitocondrial funcional está influenciada por la interferencia nuclear y el contexto celular (Uittenbogaard & Chiaramello, 2014).

El proceso de biogénesis mitocondrial está vinculado a la degradación y eliminación de mitocondrias senescentes y dañadas a través de un proceso conocido como; autofagia mitocondrial o mitofagia. El mantenimiento de una población mitocondrial adecuada y funcional durante la vida útil de las neuronas es crítico e implica un equilibrio entre la biogénesis mitocondrial y la mitofagia, a este proceso normalmente se le llama control de calidad mitocondrial, el cual a menudo está alterado en muchas enfermedades neurológicas y, por lo tanto, este proceso es un determinante clave de la salud mitocondrial y la función celular adecuada (Suliman & Piantadosi, 2014). Por otro lado, se ha propuesto que defectos en la mitofagia contribuyen a la pérdida neuronal en las enfermedades neurodegenerativas, y varias líneas de evidencia sugieren que la función mitocondrial influye sustancialmente en el proceso de autofagia; por consiguiente, el sistema de control de calidad mitocondrial es esencial para mantener una población mitocondrial funcional en las neuronas (Suliman & Piantadosi, 2014; Uittenbogaard & Chiaramello, 2014).

El circuito regulador responsable de modular la biogénesis mitocondrial en respuesta a señales fisiológicas y el desarrollo está compuesto por los miembros de la familia de coactivadores de la transcripción, tales como: el receptor activado por proliferadores de

peroxisomas γ (PPAR γ) coactivador 1 α (PGC-1 α) y otros dos miembros, PGC-1 β y el coactivador relacionado con PGC-1 (PRC), todos ellos conocidos por interactuar con la familia de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), los cuales son factores de transcripción nucleares que pertenecen a la superfamilia de receptores esteroideos. La familia de PPARs incluye a: PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ (Corona & Duchon, 2015a, 2015b, 2016; Hock & Kralli, 2009; Uittenbogaard & Chiaramello, 2014). PGC-1 α se expresa en altos niveles en tejidos con altas demandas metabólicas, como corazón, tejido adiposo, músculo esquelético, riñón y cerebro; PGC-1 α es altamente versátil, comúnmente llamado el regulador maestro de la biogénesis mitocondrial, ya que aumenta la expresión de varios factores de transcripción relevantes y coopera con ellos para potenciar su actividad transcripcional (Corona & Duchon, 2015a, 2015b; Nirwane & Majumdar, 2018; Onyango et al., 2010; Uittenbogaard & Chiaramello, 2014).

Además, PGC-1 α actúa como coactivador de otros factores de transcripción nuclear, tales como: el factor nuclear respiratorio 1 y 2 (NRF-1 y NRF-2), el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) y los factores de transcripción mitocondrial B1 y B2 (TFB1M y TFB2M), interactúa con ellos proteína-proteína para estimular su actividad transcripcional y aumentar los niveles de expresión y sus actividades, lo que resulta en una mayor expresión de proteínas mitocondriales codificadas por el ADNn (**Figura 8**) (Corona & Duchon, 2015a, 2015b; Li et al., 2017; Uittenbogaard & Chiaramello, 2014).

NRF1 y NRF2 activan a TFAM y se unen a las regiones promotoras de los genes nucleares que codifican las subunidades de los cinco complejos en la CTE, lo que aumenta el ensamblaje del aparato respiratorio y regula los genes involucrados en la biosíntesis del hemo, proteínas relacionadas con la maquinaria de importación mitocondrial, RNAt sintetas y proteínas ribosómicas mitocondriales (Corona & Duchon, 2015a; Li et al., 2017). TFAM es un miembro del grupo de factores de transcripción de alta movilidad que es esencial para regular la transcripción y la replicación del ADNmt, se une a las secuencias del promotor mitocondrial, los dos promotores específicos de la cadena pesada (HSP1 y HSP2) y el promotor específico de la cadena ligera (LSP) de una manera específica a la secuencia para iniciar la transcripción (Picca & Lezza, 2015; Uittenbogaard & Chiaramello, 2014).

Además de la biogénesis mitocondrial, PGC-1 α regula vías mitocondriales críticas para el metabolismo neuronal, como la oxidación de ácidos grasos y el metabolismo de OXPHOS. La familia de los receptores nucleares relacionados con estrógenos (ERR) cumplen una función central en el circuito regulador de PGC-1. ERR α , ERR β y ERR γ tienen una homología significativa con los receptores clásicos de estrógeno en el dominio de unión al ligando, pero no se unen al estrógeno ni a ningún ligando endógeno conocido (receptores nucleares “huérfanos”). En cooperación con PGC-1 α , se ha demostrado que ERR α regula los genes en prácticamente todas las vías de la transducción de energía mitocondrial y la síntesis de ATP, incluidos la oxidación de ácidos grasos, el ciclo de Krebs y OXPHOS (Dorn et al., 2015; Hock & Kralli, 2009). Como indicado anteriormente, PGC-1 α es un coactivador transcripcional expresado de manera ubicua que se identificó inicialmente como el coactivador del receptor PPAR γ , un regulador de la termogénesis adaptativa en el tejido adiposo marrón que regula el almacenamiento de ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa. Los genes activados por PPAR γ estimulan el metabolismo de lípidos y la adipogénesis en las células adiposas (Corona & Duchon, 2016; Hock & Kralli, 2009).

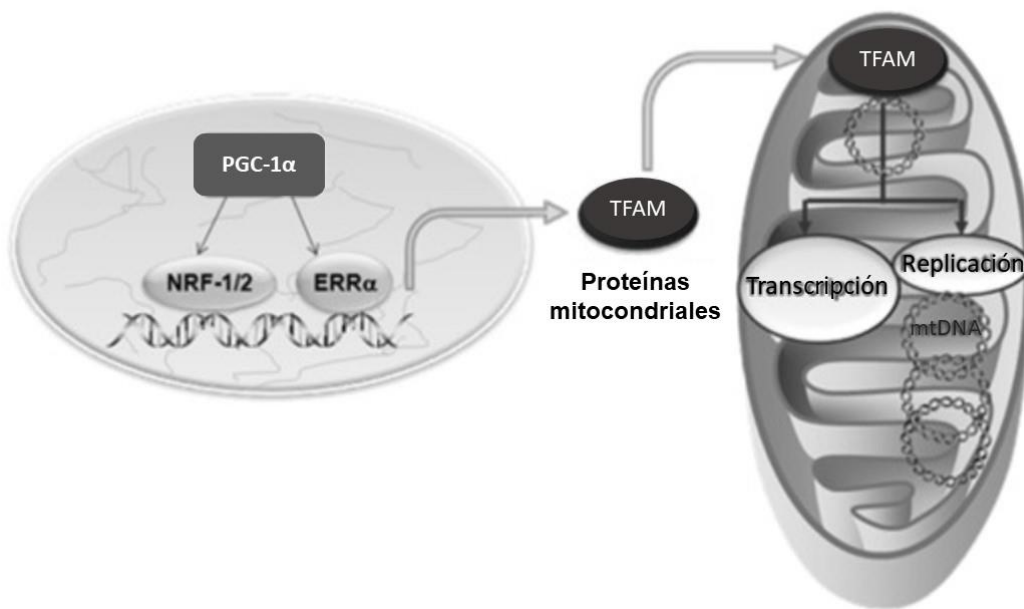


Figura 8. Biogénesis mitocondrial. Representación esquemática de las principales proteínas que participan en la biogénesis mitocondrial. (Tomado y modificado de Picca & Lezza, 2015).

- Células SH-SY5Y

La línea celular SH-SY5Y, es una línea celular derivada de humanos utilizada en la investigación científica. La línea celular original, llamada SK-N-SH, de la que se subclonó, se aisló de una biopsia de médula ósea tomada de una mujer de cuatro años con neuroblastoma a principios de la década de 1970 (Biedler et al., 1973; Xie, Hu, & Li, 2010). Se considera que la línea celular es de tipo neuronal, dada su morfología y la capacidad de diferenciarse a un fenotipo neuronal (Biedler et al., 1973). Las células SH-SY5Y pueden diferenciarse luego del tratamiento con una variedad de agentes, incluyendo; el ácido retinoico (AR), éster de forbol, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), dibutilil AMP cíclico (dBcAMP) (Xie et al., 2010). Así, las células SH-SY5Y pueden diferenciarse hacia una variedad de fenotipos neuronales, incluidos los dopaminérgicos, adrenérgicos o colinérgicos según el agente utilizado (Kovalevich & Langford, 2013).

La diferenciación neuronal implica una serie de eventos específicos, que incluyen la formación y extensión de procesos neuríticos, el aumento de la excitabilidad eléctrica de la membrana plasmática, la formación de sinapsis funcionales positivas a la sinaptofisina y la inducción de enzimas, neurotransmisores y receptores de neurotransmisores específicos para neuronas (Kovalevich & Langford, 2013). La diferenciación da como resultado células SH-SY5Y con un fenotipo neuronal funcionalmente maduro, convirtiéndose en una población estable y mostrando un crecimiento extenso de neuritas con similitud morfológica a las neuronas maduras (Xie et al., 2010). Las células diferenciadas expresan tirosina hidroxilasa (TH) y la dopamina- β -hidroxilasa características de las neuronas dopaminérgicas (Kovalevich & Langford, 2013). Además, expresan el transportador de noradrenalina (NET) y el transportador de monoamina vesicular (VMAT), característico de las neuronas adrenérgicas (Biedler et al., 1978; Kovalevich & Langford, 2013), también expresan el transportador de dopamina (DAT), así como los subtipos de receptores de dopamina 2 y 3 (D2R y D3R). Todo lo anterior convierte a estas células en un sistema in vitro ideal para el estudio de la neurotoxicidad de los medicamentos utilizados como terapia para el TDAH, así como para la búsqueda de algunos de los mecanismos celulares y moleculares.

Las células SH-SY5Y no diferenciadas se caracterizan morfológicamente por cuerpos celulares no polarizados similares a neuroblastos con pocos procesos truncados. Las células tienden a crecer en grupos y las células parecen crecer unas encima de otras en la región central de una masa celular (Biedler et al., 1973; Kovalevich & Langford, 2013). Las células indiferenciadas proliferan continuamente, expresan marcadores neuronales inmaduros y carecen de marcadores neuronales maduros, se caracterizan por marcadores indicativos de proliferación, como el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) (Kovalevich & Langford, 2013).

II. Antecedentes

Previamente en nuestro laboratorio, encontramos que altas concentraciones (20 y 50 μM) de ATX en células SH-SY5Y diferenciadas a un fenotipo parecido a neuronas, causaron muerte celular, produjeron un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) tanto citosólicas, así como mitocondriales, causaron una disminución en la masa mitocondrial, así como una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, también disminuyeron los complejos II y IV de la CTE e incrementaron el proceso de autofagia (Corona et al 2019; manuscrito enviado a Scientific Reports).

De manera interesante, la dosis de 10 μM de ATX aumentó la masa mitocondrial y disminuyó la autofagia, a pesar de la inducción de ROS citosólicas y mitocondriales. Por lo tanto, demostramos que la ATX tiene un efecto dual dependiendo de la dosis utilizada, lo que indica que ATX produce efectos terapéuticos activos adicionales sobre el estrés oxidativo y sobre la función mitocondrial más allá de la inhibición de la recaptura de norepinefrina (Corona et al 2019; manuscrito enviado a Scientific Reports).

III. Justificación

Distintos estudios han demostrado que la ATX tiene varios mecanismos de acción adicionales a la inhibición de la recaptura de norepinefrina, afectando varias vías de transducción de señales y alterando la expresión génica. Sin embargo, no se sabe de la participación de la ATX sobre los distintos procesos mitocondriales. Por esta razón en este proyecto se estudió, si la administración de ATX altera la biogénesis mitocondrial, vislumbrando así efectos adicionales no contemplados.

IV. Hipótesis

Si el tratamiento con atomoxetina induce un aumento en la producción de ROS, afecta la dinámica mitocondrial y produce efectos sobre la autofagia, por lo tanto, producirá alteraciones sobre la biogénesis mitocondrial en células SH-SY5Y diferenciadas a un fenotipo parecido a neurona.

V. Objetivos

Objetivo General

Caracterizar el efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de ATX sobre la biogénesis mitocondrial en células SH-SY5Y diferenciadas.

Objetivos Particulares

1. Diferenciar células SH-SY5Y a un fenotipo parecido a neurona.
2. Evaluar el efecto del tratamiento con ATX sobre la expresión de proteínas involucradas en la biogénesis mitocondrial en células SH-SY5Y diferenciadas.
3. Evaluar el efecto del tratamiento con ATX sobre la expresión de los genes de proteínas involucradas en la biogénesis mitocondrial en células SH-SY5Y diferenciadas.

VI. Materiales y métodos

El análisis del efecto del tratamiento con ATX sobre las células SH-SY5Y y la biogénesis mitocondrial se realizó de acuerdo al esquema de la **Figura 9**.

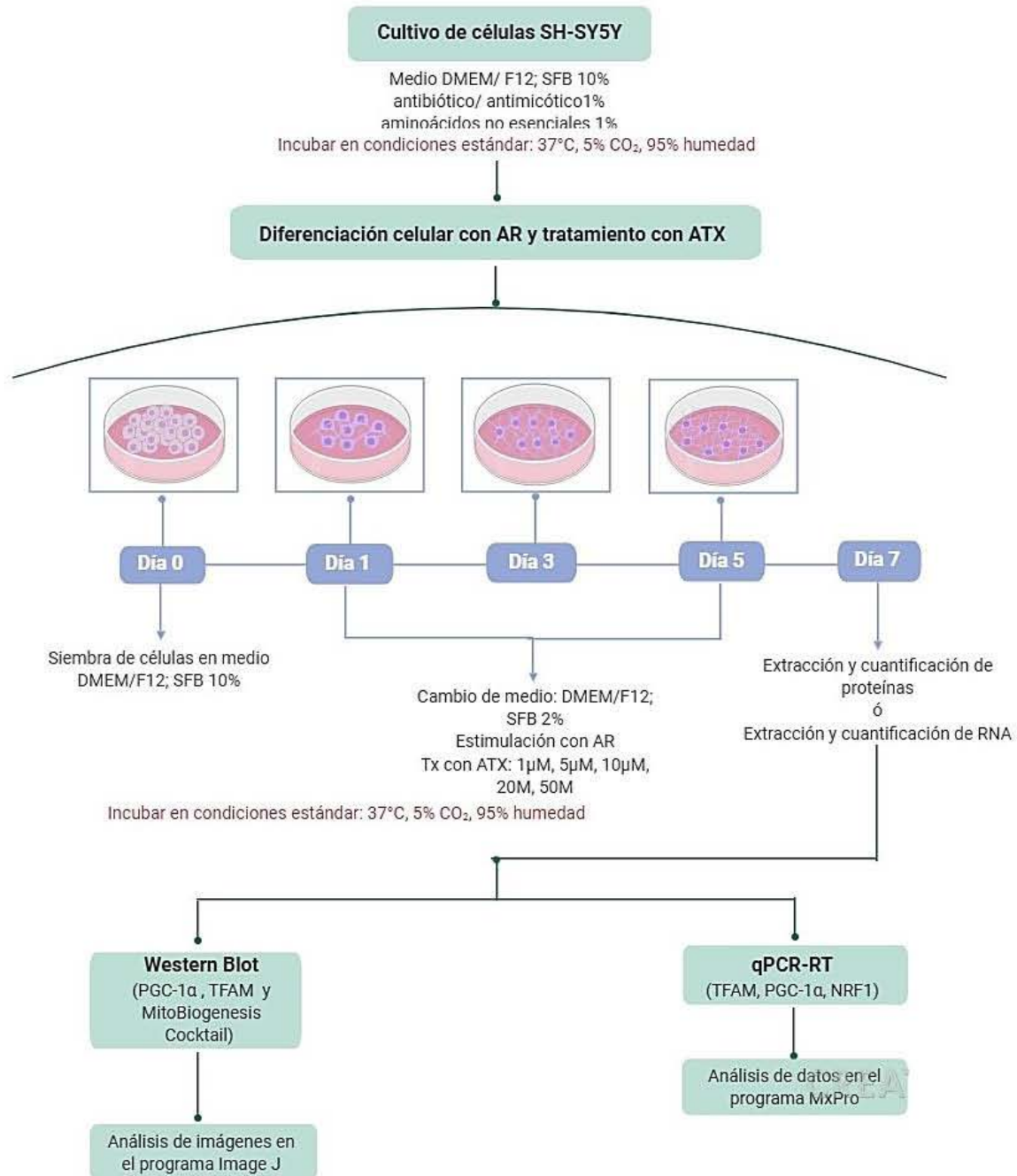


Figura 9. Diagrama experimental. Representación esquemática del proceso experimental seguido en el presente trabajo. SFB: suero fetal bovino, AR: ácido retinoico, ATX: atomoxetina, Tx: Tratamiento.

Cultivo celular

Todos los experimentos en este estudio se llevaron a cabo utilizando la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, las células fueron cultivadas en placas P100 con medio DMEM/F12, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, adicionado con antibiótico/antimicótico (ampicilina, estreptomina y anfotericina) al 1% y con aminoácidos no esenciales al 1%; se incubaron en condiciones estándar a 37°C, 5% de CO₂ y humedad al 95%, cambiando el medio cada 48 horas hasta obtener una confluencia aproximada del 80% en la placa de cultivo. Posteriormente, se retiró el medio de la placa de cultivo y se realizaron dos lavados con amortiguador de fosfatos (PBS 1X), consecuentemente se agregó tripsina 0.05% - EDTA 1X para desprender la células adheridas a la placa de cultivo, una vez desprendidas las células fueron transferidas a un tubo con medio de cultivo y se centrifugaron a 1.250 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante con vacío y el botón fue resuspendido en 3 mL del medio de trabajo, posteriormente se realizó una dilución 1:10 para el conteo de células en la cámara de Neubauer en la cual se colocaron 10 µL de la dilución, una vez realizado el conteo se hicieron los cálculos necesarios para sembrar la cantidad de células requeridas; las células restantes se sembraron en placas nuevas para su proliferación.

Diferenciación celular y tratamiento con atomoxetina (ATX)

Para la diferenciación a un fenotipo parecido a neuronas se sembraron sobre una matriz de membrana basal (Matrigel) aproximadamente 1 millón de células en placas P35 (para el análisis mediante inmunoréplica tipo Western), y 8 millones de células en placas P100 (para la qRT-PCR); el medio empleado para la diferenciación fue el mismo, solo con disminución del porcentaje de SFB al 1%, así mismo las células se estimularon con ácido trans-retinoico (AR) 10 µM en ausencia de luz, debido a la sensibilidad del mismo. Las células pueden diferenciarse de un estado similar a un neuroblasto en neuronas humanas maduras a través de una variedad de mecanismos diferentes, la diferenciación de las células SH-SY5Y se basa en la privación gradual del suero y la adición de ácido retinoico con el cual cuando se diferencian, estas células se extienden, se ramifican, disminuyen la proliferación y en algunos casos polarizan. Se ha demostrado que la adición de AR induce la diferenciación celular a través de varios mecanismos, incluida la

detención de la progresión del ciclo celular de G0/G1, aumentando la expresión de los inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) p21 y p27 Kip1 y la mejora de la actividad PI3K/AKT que desempeña un papel en el desarrollo y la diferenciación de las neuritas (Shiple, Mangold, & Szpara, 2016). Además, el tratamiento con AR altera la expresión de 13 factores de transcripción que se sabe estimulan específicamente el desarrollo, diferenciación y función neuronal proporcionando así a las células un estado de transcripción pro-diferenciación hacia un fenotipo neuronal (Korecka et al., 2013).

Se realizaron 3 administraciones de AR a las células para su diferenciación durante 7 días, al mismo tiempo también se realizó el tratamiento con ATX al cual se le agregó la cantidad de ATX necesaria para cada una de las distintas concentraciones de trabajo (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M y 50 μ M) el grupo control fueron células diferenciadas sin el tratamiento con ATX (Ver diagrama experimental).

Extracción y cuantificación de proteínas

Para la extracción de proteínas totales, las placas de cultivo fueron colocadas en hielo, se les retiró el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados para retirar los residuos del medio con PBS 1X frío el cual fue retirado por decantación, posteriormente se les adicionó 50 μ L de amortiguador de lisis (amortiguador RIPA comercial - Thermo Scientific), el cual contiene tres detergentes iónicos y no iónicos que permiten la extracción de manera eficaz de proteínas presentes en la membrana, el citoplasma y el núcleo a partir de células sometidas a cultivo, incluidas células de placas y células en suspensión, a éste se le agregó 10 μ L de inhibidor de proteasas por cada mililitro de amortiguador empleado, el cual funcionaba para evitar la degradación de las proteínas, se raspó toda la superficie de la placa de cultivo con ayuda de un “cell scraper” (raspador) y se recuperó el volumen en un microtubo, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C, se recolectó el sobrenadante en microtubos nuevos y se tomaron 10 μ L para realizar la cuantificación. Se determinó la cuantificación de proteínas totales espectrofotométricamente a 280 nm empleando un SpectroStar Nano, se realizó la lectura por duplicado de cada muestra y posteriormente se obtuvo el promedio de las lecturas realizadas.

Inmunoréplica tipo Western

El inmunoblot, electrotransferencia o Western blot, es una técnica que permite la identificación de proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas, mediante la separación electroforética de las mismas y la visualización de las proteínas de interés mediante su marcaje con el uso de anticuerpos apropiados (Hayat, 1995). Para esto a los lisados celulares se les agregó la cuarta parte de su volumen total de amortiguador de Laemmli 4X, se mezclaron con vortex por aproximadamente 10 s. Se cargaron 100 µg de las muestras y se separaron electroforéticamente mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10% y luego se transfirieron a membranas de polivinildifluoruro (PVDF) por transferencia húmeda; para asegurar una carga semejante en todas las muestras, las membranas se tiñeron con una solución de rojo de Ponceau, el cual es un colorante que permite teñir las proteínas en la membrana. Las membranas se boquearon durante 60 min con 10 mL de leche al 0.5% disuelta en TBS-Tween 0.1%, pH 7.4, finalizado el tiempo de bloqueo se lavaron 3 veces por 5 min con TBS-Tween 0.1%, pH 7.4. Posteriormente las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en 10 mL de albumina al 10% en TBS-Tween durante toda la noche a 4°C, los anticuerpos empleados fueron: PGC-1α (1:100, Santa Cruz Biotechnology), TFAM (1:200, Santa Cruz Biotechnology) y MitoBiogenesis™ Cocktail (1:1000, Abcam), después de lavar con TBS-Tween 0.1%, pH 7.4 las membranas fueron incubadas por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) diluido en 10 mL de leche al 0.5% disuelta en TBS-Tween 0.1%, pH 7.4, se realizó finalmente un último lavado con TBS-Tween 0.1%, pH 7.4 y las membranas se expusieron al sustrato quimioluminiscente. Las imágenes se tomaron mediante el sistema Fusion Solo (Viber Lumark); se utilizó beta-actina (1:3000 - Abcam) como control de carga. El análisis de las imágenes obtenidas se realizó con el programa Fiji ImageJ.

Extracción y cuantificación de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo empleando TRIzol® el cual es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, durante la homogenización de la muestra o la lisis el TRIzol® mantiene la integridad del RNA mientras rompe las células y disuelve los componentes celulares (Chomczynski & Sacchi, 1987). El principio de la

base del método es que el RNA se separa del ADN después de la extracción con una solución ácida que contiene tiocianato de guanidinio, acetato de sodio, fenol y cloroformo, seguido de centrifugación. En condiciones ácidas, el RNA total permanece en la fase acuosa superior, mientras que la mayor parte del ADN y las proteínas permanecen en la interfase o en la fase orgánica inferior (Chomczynski & Sacchi, 2006); para ello las placas de cultivo se colocaron en hielo y se les retiró el medio de cultivo, se les agregó 1 mL de TRIzol® a las células ($2-5 \times 10^6$) resuspendiendo varias veces para homogeneizar la muestra y lograr el lisado de las células, una vez homogeneizada la muestra se incubó durante 5 min en hielo y posteriormente se agregó 0.2 mL de cloroformo por cada mililitro de TRIzol empleado, se agitó vigorosamente en vortex por 30 s y se incubó en hielo por 10 min, se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min a 4 °C, la muestra se separa en 3 fases (**Figura 10**): una fase orgánica fenol-cloroformo de color rosa en la cual está presente el DNA, una interfase de color blanco donde están presentes todas las proteínas y restos celulares y una fase acuosa superior en donde se encuentra el RNA; se recuperó la fase acuosa en un microtubo cuidando de no mover cualquiera de las otras fases para evitar contaminación de la muestra, añadir a la fase acuosa 0.5 mL de isopropanol, el cual favorece la precipitación del RNA, por cada mililitro de TRIzol empleado y mezclar suavemente por inversión e incubar a -20 °C durante toda la noche, centrifugar a 13,000 rpm por 10 min a 4°C, se observará la formación del botón el cual presenta una consistencia de gel color blanco en la parte lateral y el fondo del tubo, retirar el sobrenadante por decantación y lavar el pellet con 0.5 mL de etanol al 70%, centrifugar a 7,000 rpm durante 5-10 min, retirar el sobrenadante con ayuda de una micropipeta y se dejó evaporar el exceso de etanol en el tubo evitando que el botón de RNA se seque por completo, se observó el cambio de color del botón de blanco a transparente, finalmente se resuspendió el botón de RNA en 30-60 μ L agua tratada con Dietil-pirocarbonato (DEPC), la cantidad de agua empleada depende del tamaño del botón obtenido, y se realizaron dos alícuotas una de 10 μ L para la cuantificación y electroforesis de RNA que será almacenada a -20 °C y otra con el volumen restante para realizar la retrotranscripción de cDNA almacenada a -70 °C.

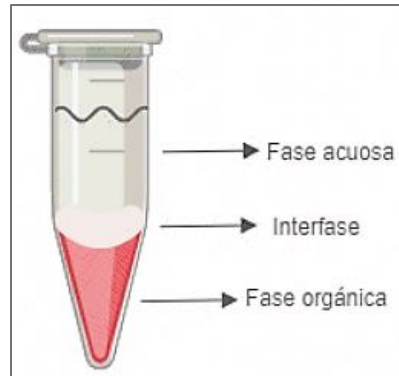


Figura 10. Separación de la muestra en la extracción de RNA. La muestra tratada con TRIzol® se separa en tres fases: una fase orgánica de color rosa inferior, una interfase blanca y una fase acuosa superior.

La cuantificación de la muestra se realizó espectrofotométricamente a 280 y 260 nm, para la lectura de proteínas y ácidos nucleicos respectivamente en un SpectroStar Nano empleando 2 μL de la alícuota de RNA destinada para este fin y agua DEPC como blanco, para conocer la concentración de RNA el valor obtenido en la lectura de 260 nm se multiplica por 40 (para RNA o DNA de cadena sencilla) se divide entre 1000 y el resultado se expresa como $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; así mismo se determinó la pureza del RNA mediante la lectura de la relación 260/230 en donde un valor mayor a 1.5 y mayor a 1.7 en la relación 260/280 indica una pureza aceptable de la muestra de RNA y por lo tanto se considera funcional, valores inferiores indican contaminación de la muestra por fenol, carbohidratos o sales, así como por proteínas o compuestos aromáticos respectivamente (Díaz-Alonso et al., 2013). Para evaluar la integridad del RNA obtenido se realizó un gel de agarosa al 1% en amortiguador de corrida Tris-acetato-EDTA (TAE) al 1X, posteriormente se cargaron 4 μL del marcador de peso molecular y 5 μL de las muestras de RNA, y se agregó 1 μL del amortiguador de carga a cada muestra, que contiene SYBR® Green el cual funciona como indicador de la migración de los fragmentos de RNA (**Figura 13**), además, contiene glicerol para agregar densidad y EDTA para inhibir las actividades de las nucleasas. Se realizó la electroforesis por aproximadamente 60 minutos a 80 volts y la lectura se realizó mediante el sistema Fusion Solo (Viber Lumark).

qRT-PCR

La PCR en tiempo real es una técnica de biología molecular que se utiliza para detectar y cuantificar ácidos nucleicos para numerosas aplicaciones, en la cual los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, ya que el marcaje con compuestos fluorescentes permite la recopilación de datos a medida que la PCR avanza (Costa, 2004). La PCR de transcripción reversa o qRT-PCR es una variante de la PCR convencional que permite el uso de RNA como molde, dado que este es usualmente de una sola hebra y es sensible al calor, es necesario realizar una transcripción reversa (RT) antes de iniciar la amplificación por PCR. La transcripción reversa a partir de la hebra de RNA genera cDNA el cual es estable al calor y puede resistir la metodología PCR (Díaz-Alonso et al., 2013). Las reacciones de RT se realizaron en un volumen de 20 μ L empleando el Sistema de síntesis de cDNA SuperScript™ II RT (Invitrogen) se partió de 2 μ g del RNA total extraído y se mezcló con Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 μ g/mL), dNTP Mix (10 mM de cada uno, dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y se incubó por 5 min a 65 °C, tras esa incubación se añadió el 5X first-strand buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂] y el DTT 100 mM se incubó a 42 °C durante 2 min, posteriormente se añadió la enzima SuperScript™ II RT y se incubó por 50 min a 42 °C, finalmente se inactiva la reacción calentando durante 15 min a 70 °C.

Las PCR cuantitativas se llevaron a cabo en el sistema de detección Mx3000P qPCR System (Agilent Technologies) usando LightCycler® 480 Probes Master (Roche Molecular Systems) con sondas TaqMan Universal ProbeLibrary probes (Roche Molecular Systems). 5 μ L del cDNA sintetizado se agregó a la reacción de PCR que se llevó a cabo en un volumen final de 15 μ L, cada mezcla de reacción contiene: 10 μ L de 2X LightCycler® 480 Probes Master, 4 μ L de agua grado PCR, 0.8 μ L de la mezcla de oligonucleótidos (sentido y antisentido) y 0.2 μ L de la sonda. El programa que se llevó a cabo para amplificar los fragmentos fue el siguiente: precalentamiento a 95 °C – 10 min, 40 ciclos (desnaturalización 95 °C – 10 s, alineamiento 50 °C – 1 min, extensión a 72 °C – 10 s) y una extensión final a 40 °C – 10 s. Las muestras se analizaron por duplicado en la misma placa de reacción utilizando GAPDH como control endógeno. El análisis de datos se realizó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Los oligonucleotidos específicos utilizados para cada gen fueron los siguientes:

Gen	Secuencia 5' a 3'
PPARGC1A	FW – TGAGAGGGCCAAGCAAAG
	RW – ATAAATCACACGGCGCTCTT
TFAM	FW – GAACAACACTACCCATATTTAAAGCTCA
	RW – GAATCAGGAAGTTCCTCCA
NRF1	FW – GACGCCGAGCTAAGCAGTT
	RV – CGTCTTGGGTCAGAGTGTCC
Gen endógeno	
GADPH	FW – AGCCACATCGCTGAGACA
	RV – GCCCAATACGACCAAATCC

Análisis estadístico

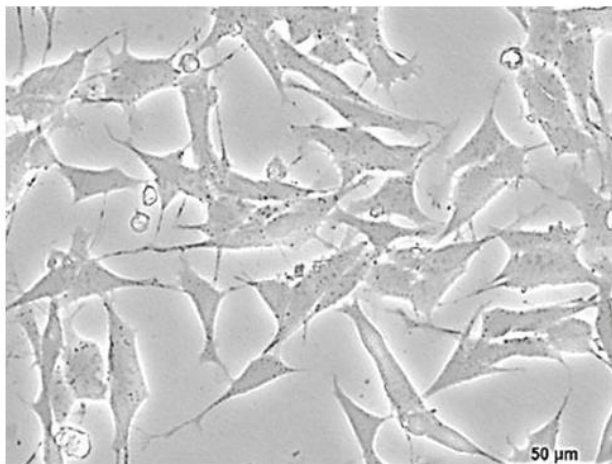
El análisis se realizó con el programa GraphPad Prism 6, los valores de la media \pm SEM de 4 experimentos independientes fueron analizados por ANOVA de una vía, seguido de una prueba *pos hoc* de Bonferroni, tomando en cuenta el nivel mínimo de significancia del 95%, por lo que se tomaron como diferencia significativa con respecto al control los valores de $p < 0.05$.

VII. Resultados

Diferenciación de células SH-SY5Y

Las células SH-SY5Y se diferenciaron a un fenotipo parecido a neurona empleando AR durante 7 días. En la **figura 11A**, se pueden observar las células sin diferenciar las cuales se muestran compactas, no tan alargadas y sin o pocas prolongaciones, en cambio en la **figura 11B**, se muestran las células diferenciadas después de la adición de AR, las cuales presentan extensión de los procesos neuríticos, característicos de neuronas maduras, los que se conectan entre sí formando una red, así mismo exhiben una morfología más alargada.

A



B

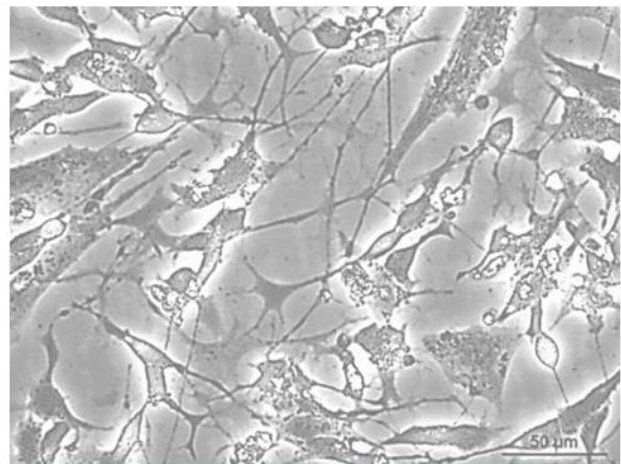


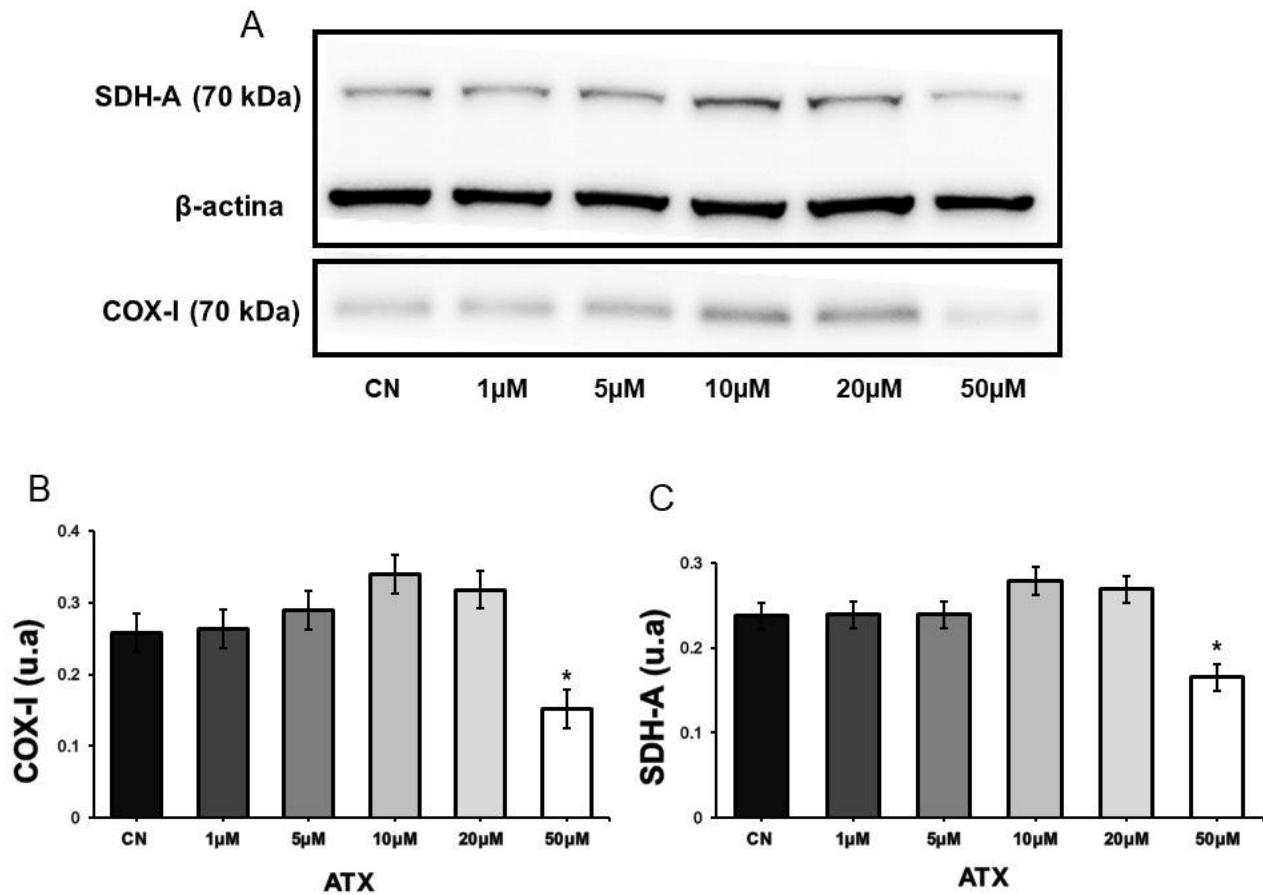
Figura 11. Diferenciación de las células SH-SY5Y a un fenotipo parecido a neurona. Imágenes representativas de la diferenciación celular, en (A) se observan las células sin diferenciar y en (B) células diferenciadas después de la adición de AR cada 48 horas. Imágenes tomadas en microscopio invertido de campo claro.

Efecto del tratamiento con ATX sobre la biogénesis mitocondrial en células SH-SY5Y diferenciadas.

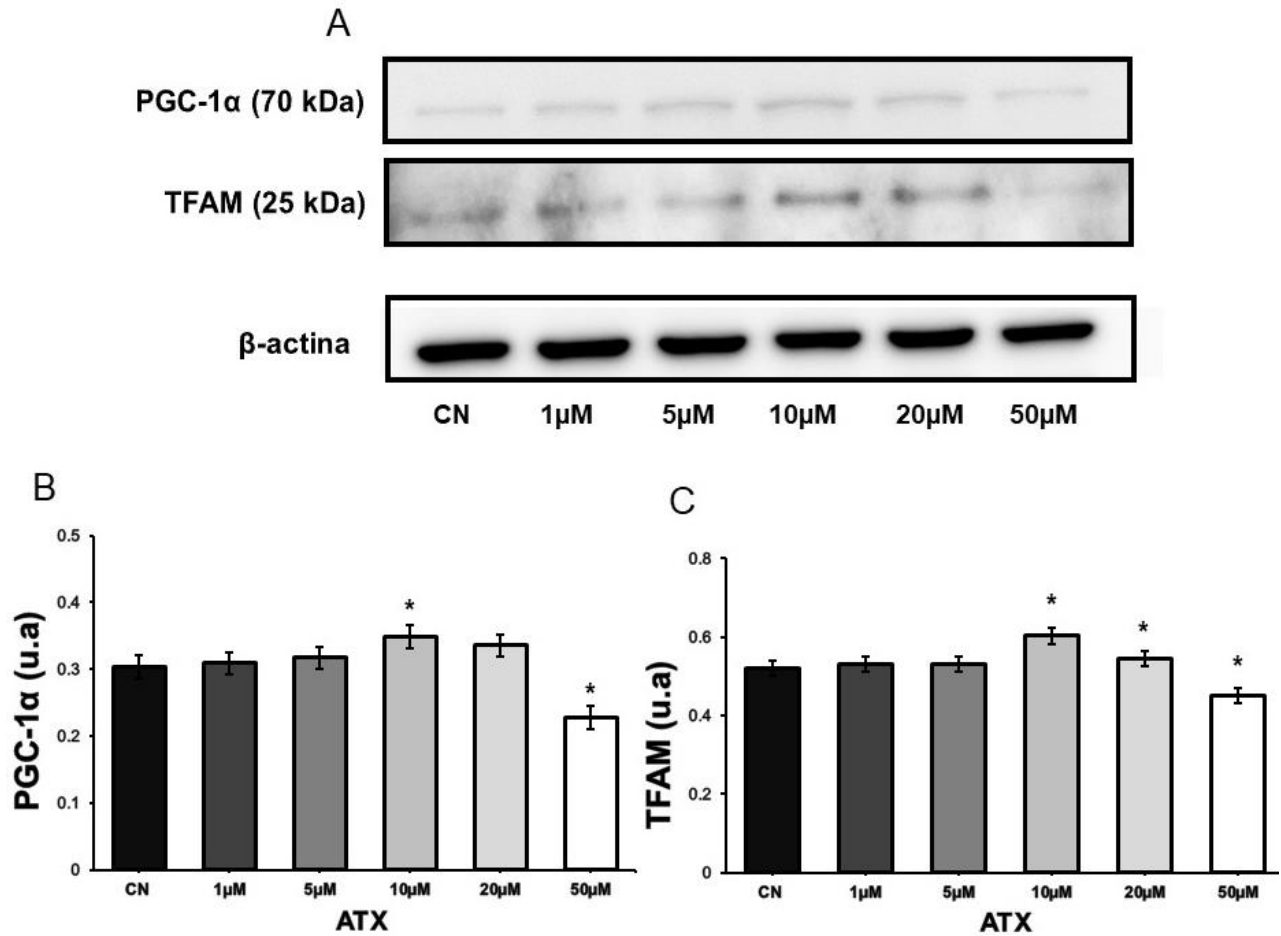
Para determinar si el tratamiento con ATX podía alterar el proceso de la biogénesis mitocondrial, se realizó la técnica de inmunoréplica tipo Western utilizando un cóctel comercial MitoBiogenesis™ Cocktail (Abcam), el cual fue diseñado para estudiar la regulación de la biogénesis mitocondrial y estrés celular en respuesta a un estímulo. Los componentes principales de este cóctel son anticuerpos contra dos proteínas, las cuales son subunidades de dos complejos de la CTE, la subunidad I del Complejo IV (COX-I), que está codificada por el ADNmt, y la subunidad de 70 kDa del Complejo II (SDH-A), que está codificada por el ADNn, también incluye un anticuerpo contra β -actina, la cual es usado como control de carga. En la **figura 12A**, se muestra el WB representativo donde se observa que conforme aumenta la concentración de ATX, disminuye la cantidad de ambas proteínas, principalmente en la concentración de 50 μ M. Esto se corroboró en la **figura 12B y C**, que muestra la cuantificación de la expresión de dichas subunidades, en donde se observó que el tratamiento con ATX 50 μ M produjo una disminución estadísticamente significativa con respecto al grupo control para ambas proteínas. Sin embargo, se observó un aumento en la expresión de dichas proteínas con la concentración de 10 μ M, aunque este aumento no fue estadísticamente significativo, por otro lado, las demás concentraciones no fueron estadísticamente significativas con respecto al grupo control. Consecuentemente, estos datos nos demuestran que la ATX es capaz de inducir cambios sobre la regulación de la biogénesis mitocondrial.

Con el objetivo de corroborar nuestros resultados, se realizó la detección de otras dos proteínas clave involucradas en el proceso de la biogénesis mitocondrial, las cuales son: PGC-1 α y TFAM. Como se observa en el WB representativo de la **figura 13A** conforme se aumenta la concentración de ATX se va disminuyendo la expresión de ambas proteínas, principalmente con la concentración de 50 μ M en donde se observa una disminución estadísticamente significativa. Además, también se puede observar un incremento estadísticamente significativo en la expresión de dichas proteínas con la concentración de 10 μ M, lo cual se corroboró al realizar la cuantificación (**Figura 13B-C**). Asimismo, en la proteína TFAM se observa un incremento significativo en la

expresión con la concentración de 20 μM . Por consiguiente, estos resultados nos demuestran que la ATX puede tener un efecto dual sobre el proceso de la biogénesis mitocondrial, dependiendo de la concentración utilizada.



*Figura 12. Efecto del tratamiento con ATX sobre la biogénesis mitocondrial en células SH-SY5Y diferenciadas. En (A) se muestra el WB representativo de la expresión de las proteínas COX-I y SDH-A en células SH-SY5Y diferenciadas tratadas con distintas concentraciones de ATX. En (B) cuantificación de la expresión de la proteína SDH-A. (C) cuantificación de la proteína COX-I. β -actina se utilizó como control de carga. Todos los datos se presentan como la media \pm SEM de 4 experimentos independientes para cada proteína. *Indica una diferencia significativa con respecto al control con $p < 0.05$. CN= grupo control.*



*Figura 13. Efecto del tratamiento con ATX sobre la expresión de proteínas involucradas en la biogénesis mitocondrial. En (A) Se muestra el WB representativo de la expresión de las proteínas PGC-1 α y TFAM en células SH-SY5Y diferenciadas tratadas con distintas concentraciones de ATX. En (B) la cuantificación de la expresión de la proteína TFAM. (C) de la proteína PGC-1 α . β -actina fue utilizada como control de carga. Todos los datos se presentan como la media \pm SEM, de 4 experimentos independientes para cada proteína. *Indica una diferencia significativa con respecto al control con $p < 0.05$. CN= grupo control.*

Efecto del tratamiento con ATX sobre la biogénesis mitocondrial a nivel de RNAm en células SH-SY5Y diferenciadas

Se realizó la extracción de RNA total de las células SH-SY5Y diferenciadas con las distintas concentraciones de ATX, obteniendo en cada una de las muestras un valor mayor a 1.5 en la relación 260/230 y un valor mayor a 1.7 en la relación 260/280, dichas relaciones nos indican la pureza de la muestra, por lo que todas se encontraban libres de contaminantes como fenol, carbohidratos, sales, proteínas o compuestos aromáticos. Así mismo se evaluó la integridad de las muestras en gel de agarosa al 1% y como se observa en la **figura 14**, aunque existía cierto grado de degradación en las muestras, estas se encontraban en su mayoría intactas, logrando observar las dos subunidades de RNAr, la de 28S más intensa que la 18S.

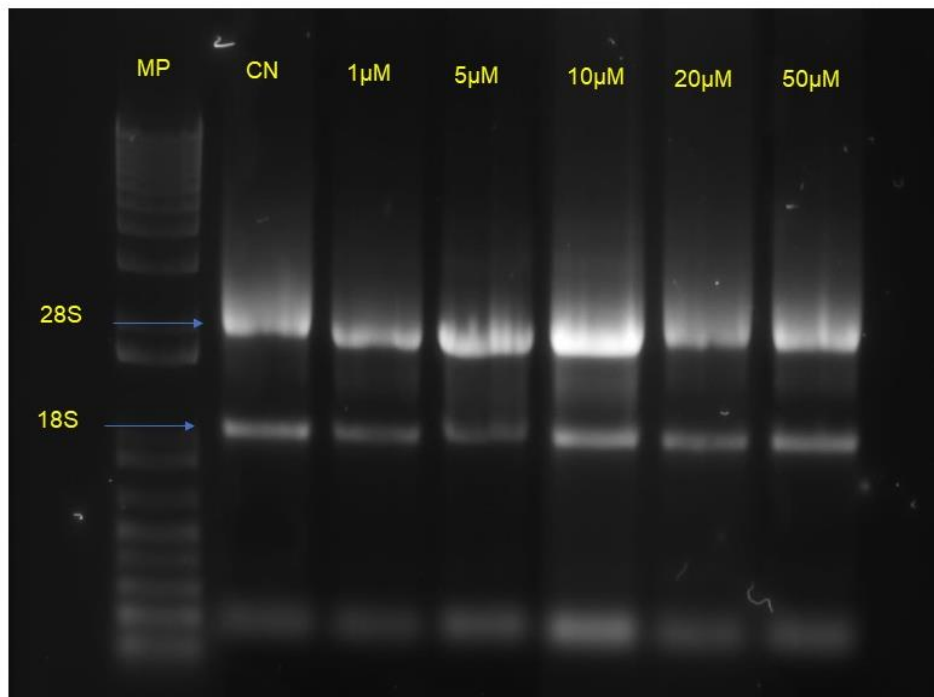


Figura 14. Imagen representativa de la integridad del RNA. Se extrajo el RNA total de las células SH-SY5Y con las distintas concentraciones de ATX, observándose dos bandas las cuales representan las subunidades del RNAr, en gel de agarosa al 1%. MP: marcador de peso molecular.

Para determinar si las alteraciones observadas en la biogénesis mitocondrial debido el tratamiento con ATX se deben solo a cambios en la expresión a nivel de proteína o si el tratamiento también provoca cambios a nivel de transcrito, se realizó una qRT-PCR, para analizar la expresión génica de mediadores clave en la biogénesis mitocondrial como los son: TFAM, NRF-1 y PGC-1 α . En la **figura 15A** se observa la representación de la curva de amplificación de los genes, en donde no se muestra la amplificación de PGC-1 α , ya que no se logró obtener la expresión del gen; sin embargo, sí se observa la amplificación de los demás genes. En la **figura 15C** se observa la cuantificación del gen NRF-1, que, aunque es visible una tendencia a incrementar en la expresión génica con la concentración de ATX 10 μ M, no es estadísticamente significativo. Sin embargo, al igual que en nuestros resultados previos, con las altas concentraciones de ATX se observa una tendencia a disminuir la expresión, la cual no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control, esto fue debido a que las desviaciones obtenidas fueron muy grandes, así como la media de los 3 experimentos, y en cada experimento individual.

La cuantificación del gen TFAM se observa en la **figura 15B**, en donde se muestra un aumento estadísticamente significativo con la concentración de 10 μ M con respecto al grupo control. Sin embargo, con las altas concentraciones de ATX hay una disminución en la expresión del gen, aunque no es estadísticamente significativa, confirmando que debido a errores experimentales la media obtenida de los resultados en los experimentos individuales es muy grande, ya que estos fueron muy diferentes entre sí, pero presentaron una tendencia. No obstante, los resultados obtenidos de la expresión de los genes y de las proteínas nos permiten determinar que el tratamiento con ATX tiene efectos duales, dependiendo de la concentración utilizada, sobre el proceso de la biogénesis mitocondrial.

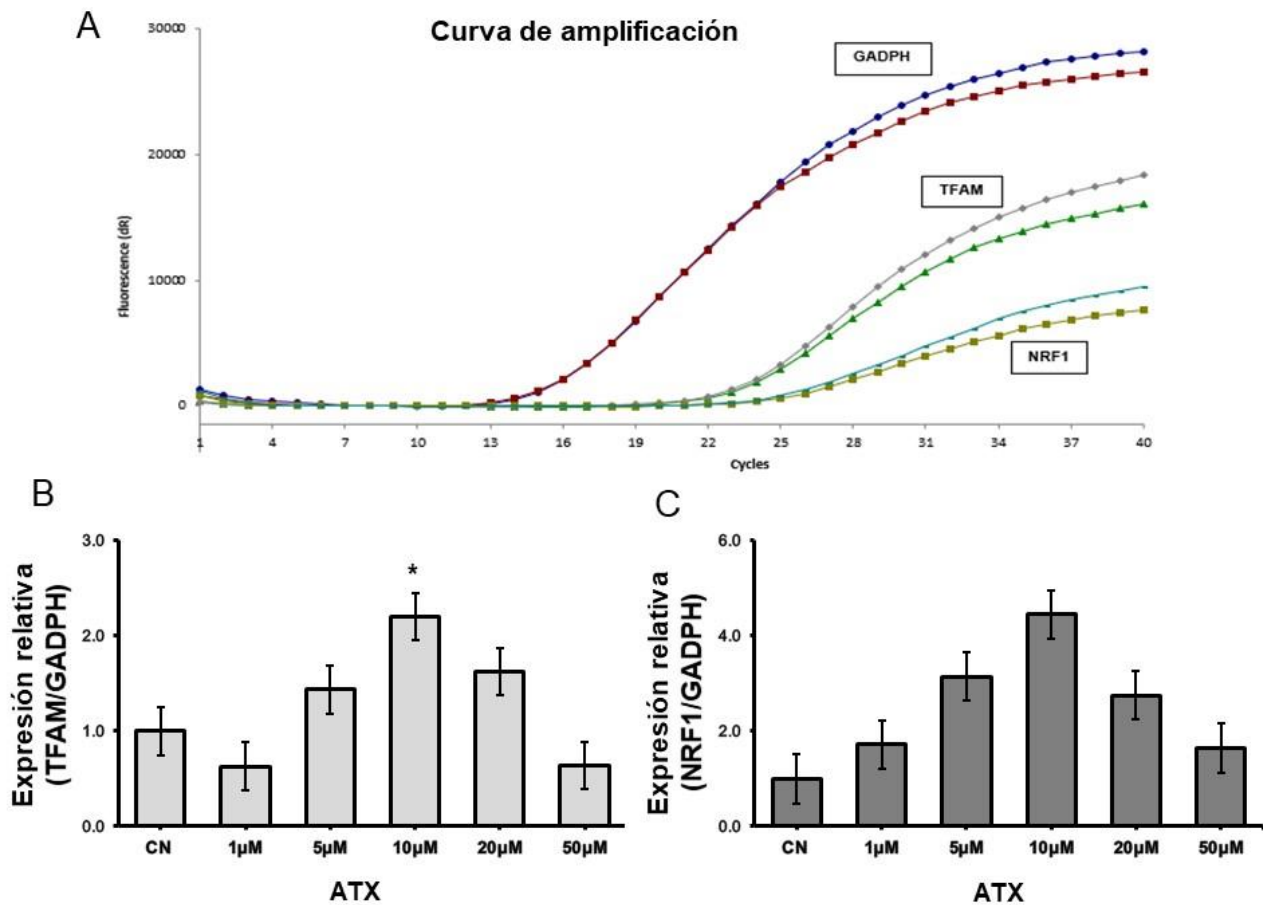


Figura 15. Efecto del tratamiento con ATX sobre la biogénesis mitocondrial a nivel de RNAm en células SH-SY5Y diferenciadas. En (A) se observa la curva de amplificación representativa de los genes NRF1 y TFAM, por duplicado. En (B) la cuantificación de expresión génica del gen NRF1. En (C) la cuantificación de la expresión génica del gen TFAM. Todos los datos de qRT-PCR se analizaron y corrigieron con GADPH como gen endógeno y se representan como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes por duplicado. *Indica una diferencia significativa con respecto al grupo control con $p < 0.05$. CN= grupo control.

VIII. Discusión

Alteraciones en la vía catecolaminérgica (DA y NA) se han asociado con el TDAH, tales como déficits en el metabolismo y una transmisión deficiente de DA y NA que afectan la función de la CPF (Biederman, 2005), por lo que los tratamientos farmacológicos del TDAH optimizan la señalización de las catecolaminas en esta zona del cerebro. La ATX actúa inhibiendo selectivamente el transporte de NA a nivel presináptico, incrementando así los niveles de este neurotransmisor en el espacio sináptico, además se ha demostrado que aumenta significativamente los niveles de DA y NA en la CPF, hipocampo, cerebelo e hipotálamo (Bymaster et al., 2002; Koda et al., 2010; Tzavara et al., 2006). Sin embargo, se ha demostrado que las catecolaminas (NA y DA) se autooxidan fácilmente generando especies altamente reactivas, como la dopamina quinona producida por la autooxidación de DA, que además conducen a la disfunción mitocondrial y estrés oxidativo (Bindoli, Rigobello, & Deeble, 1992; Goldstein, Kopin, & Sharabi, 2014; Miyazaki & Asanuma, 2008; Napolitano, Manini, & D'Ischia, 2011). Por lo tanto, una acumulación excesiva de estos neurotransmisores debida al tratamiento con ATX podría hacer que se autooxiden y comiencen la generación de ROS, esto se apoya en el hecho de que los efectos del tratamiento con ATX podrían ser neurotóxicos, como lo demuestran los efectos neurodegenerativos en el cerebelo y el hipocampo de ratas (Altunkaynak et al., 2016), por lo que se sugiere que la neurotoxicidad asociada a la ATX por la formación de ROS surge como resultado debido a la autooxidación de catecolaminas. Así mismo, resultados previos en el laboratorio han demostrado que el tratamiento durante 7 días con la concentración de 50 μM de ATX en células SH-SY5Y diferencias a un fenotipo parecido a neuronas incrementa la producción de ROS citosólicas y mitocondriales, lo que implica que la ATX podría ser una fuente importante de ROS. En este sentido, como se ha mencionado anteriormente, el TDAH está asociado a un incremento en los niveles de ROS, provocando así estrés oxidativo lo que conlleva a daños mitocondriales y celulares. Curiosamente, el incremento de H_2O_2 , un oxidante principal generado por las mitocondrias disfuncionales, suprime la liberación de dopamina estriatal (Avshalumov & Rice, 2003; Joseph et al., 2015) que puede ser un mecanismo potencial subyacente a la deficiencia de dopamina en el TDAH.

Es importante tener en cuenta que la relación entre DA, NA y ROS es bidireccional. Si bien las ROS puede influir en los niveles de estos neurotransmisores, estos neurotransmisores tienen propiedades antioxidantes y de eliminación de radicales libres, ya que el número de grupos hidroxilo en su anillo bencénico así como la presencia del grupo amino les confieren esta capacidad, debido a que estos son grandes donadores de electrones o de hidrogeno por lo que favorecen y ayudan a la conversión de los radicales en productos más estables (Yen & Hsieh, 1997). Por lo tanto, estos datos indicarían y respaldarían la idea de que la fisiopatología del TDAH involucra incrementos en el estrés oxidativo interfiriendo así con la neurotransmisión catecolaminérgica.

El cerebro es particularmente vulnerable al estrés oxidativo debido a su alto contenido de lípidos, además las neuronas presentan una demanda especialmente alta de consumo de energía (Uittenbogaard & Chiaramello, 2014). Por consiguiente, las neuronas utilizan a las mitocondrias para producir ATP y así alimentar las bombas de iones que se concentran en los terminales presinápticas, además deben restaurar los potenciales de membrana después de la despolarización y la liberación de neurotransmisores (Khacho et al., 2019). Por lo tanto, la mayor demanda de energía por parte de las neuronas y las sinapsis requiere el mantenimiento de una población mitocondrial adecuada y funcional durante la vida útil de las neuronas (Li et al., 2017; Uittenbogaard & Chiaramello, 2014); así en situaciones de estrés las neuronas exhiben una población mixta de mitocondrias sanas y defectuosas cuya funcionalidad general depende del equilibrio entre la biogénesis mitocondrial y la mitofagia (Uittenbogaard & Chiaramello, 2014). Por ello, la alteración en la coordinación entre ambos procesos es una característica de varios trastornos neurodegenerativos (Corona & Duchon, 2015a).

En el presente trabajo, nosotros encontramos que el tratamiento con ATX por 7 días en células SH-SY5Y diferenciadas a un fenotipo parecido a neuronas, regula el proceso de biogénesis mitocondrial con la concentración de 10 μM , tal como se vio demostrado con el aumento tanto de la expresión del mensajero de TFAM y NRF1 (**Figura 15**), así como de las proteínas involucradas en dicho proceso, PGC-1 α y TFAM (**Figura 13**), estos resultados concuerdan con estudios previos; donde en un modelo de ratón con atrofia muscular inducida por dexametasona, se comprobó que el tratamiento durante una

semana con ATX en dosis bajas mantuvo los niveles de expresión de PGC-1 α , previniendo así la atrofia del musculo esquelético (Jesinkey et al., 2014).

Por otra parte, diversos estudios han asociado la producción de ROS con la activación de la biogénesis mitocondrial (Moreno-Loshuertos et al., 2006; Suliman & Piantadosi, 2014); como el hallazgo que prueba que la generación mitocondrial de ROS por monóxido de carbono (CO) activa la biogénesis mitocondrial en el corazón, que se observó en tejido cardiaco de ratón y en donde la densidad de volumen de las mitocondrias aumentó en aproximadamente el 30%, además los niveles de RNAm cardiaco para PGC-1 α aumentaron de manera dependiente en relación con el aumento a la exposición de CO, así mismo aumento el RNAm de NRF1, NRF2 y TFAM. Además el mismo estudio demostró la activación de la biogénesis mitocondrial en las células H9c2 del corazón de rata por CO mediante un aumento de tres a cuatro veces en la expresión de las proteínas NRF1, NRF2, PGC-1 α y TFAM (Suliman et al., 2007); de la misma manera, otro estudio plantea que después de una lesión oxidante en células tubulares proximales renales (RPTC) afectadas por la exposición aguda a TBHP activa la biogénesis mitocondrial, debido a que los niveles de proteína PGC-1 α aumentaron 12 veces, 24 h después de la lesión, dichos niveles se mantuvieron elevados durante los tres días posteriores a la lesión y luego volvieron a los niveles de control cuatro días después del ataque oxidante, lo que puede promover la reparación y recuperación de los RPTC (Rasbach & Schnellmann, 2007). En este contexto, las ROS parecen principalmente servir como conductores de fenómenos horméticos en lugar de conductores de daño celular (Onyango et al., 2010). El concepto, denominado hormesis: *es cualquier proceso en una célula u organismo que presenta una respuesta bifásica a la exposición a cantidades crecientes de una sustancia o condición*. Un estrés mitocondrial leve y subletal provocado por una variedad de insultos, deja a la célula menos susceptible a posteriores perturbaciones, así esta respuesta se denomina **mitohormesis** (Cox et al., 2018). A su vez este fenómeno puede proteger contra un estrés posterior más grande; el estrés leve resulta en una respuesta citosólica y nuclear amplia y diversa, aunque variada, esta respuesta parece inducir un estado citoprotector, las ROS pueden funcionar como moléculas de señalización esenciales y potenciales que transducen señales desde el compartimento mitocondrial a otros compartimentos de la

célula que resultan en cambios metabólicos y bioquímicos los cuales sorprendentemente, en lugar de ser dañinos, pueden reducir nuestra susceptibilidad a las enfermedades (Ristow & Zarse, 2010; Yun & Finkel, 2014).

Como se mencionó anteriormente PGC-1 α es el regulador maestro de la biogénesis mitocondrial; aunque nosotros no pudimos determinar la expresión génica de dicho coactivador (**Figura 15**), lo cual pudo deberse en parte a que los oligonucleótidos empleados para la realización de la qRT-PCR no fueron los indicados o específicos para dicho gen. Sin embargo, si se pudo determinar un aumento en la expresión de la proteína (**Figura13**) con la concentración de ATX 10 μ M, lo que sugiere que existe una inducción de la biogénesis mitocondrial, ya que también se indujo la activación de TFAM que está río abajo en la vía de señalización de PGC-1 α .

Además, se ha demostrado que NRF-1 presenta una regulación transcripcional y postraduccional y entre las principales vías de activación de NRF-1, se destacan el estrés energético y el estrés oxidativo (Bergeron et al., 2001; Piantadosi & Suliman, 2006). NRF-1 fue el primer factor nuclear en descubrirse, el cual actúa como regulador positivo de la transcripción de los genes que codifican para el complejo IV de la CTE, citocromo c oxidasa (COX), además de controlar la expresión de 10 subunidades de la COX al unirse al promotor TFAM para activar la transcripción del ADNmt (Suliman & Piantadosi, 2014). Dada la regulación positiva que se presenta mediante NRF-1, aunque no se haya determinado la expresión a nivel de proteína de este, sí presentó un aumento en la expresión en el mensajero con la concentración de ATX 10 μ M. Por otro lado, al utilizar el coctel de biogénesis mitocondrial, se observó un aumento en la expresión tanto de la proteína SDH-A como de COX-I, con la concentración de 10 μ M. Con lo cual, esta relación en la expresión de las proteínas da un indicio de la regulación de la biogénesis mitocondrial en dicha concentración.

El mantenimiento de la homeostasis mitocondrial requiere tanto la eliminación del daño como la generación de mitocondrias nuevas y funcionales. La evidencia emergente indica que la coordinación entre la biogénesis mitocondrial y la mitofagia es esencial para la homeostasis mitocondrial adecuada, por lo que varias moléculas han sido implicadas en el ajuste fino de la coordinación (Corona & Duchon, 2015a; Palikaras et al., 2015). La

mitofagia se regula al alza cuando las células presentan déficits energéticos o requieren nutrientes, o altas demandas bioenergéticas, así como durante el estrés oxidativo, lo que favorece la supervivencia de la célula, por otro lado, la desregulación de la autofagia o la insuficiencia de la misma puede provocar daño celular (Galluzzi et al., 2014; Levine & Kroemer, 2008; Suliman & Piantadosi, 2014). Estos datos se apoyan con los resultados encontrados en este estudio, así como los obtenidos anteriormente en el laboratorio en donde empleando WB y un marcador de autofagosomas fluorescente LC3B-GFP, se encontró que el tratamiento con ATX 10 μM en células SH-SY5Y diferenciadas disminuyó los niveles de autofagia e incremento significativamente la masa mitocondrial, lo que confirma la activación del proceso de biogénesis mitocondrial debido al tratamiento con ATX durante 7 días en células SH-SY5Y diferenciadas a un fenotipo parecido a neurona.

Por otro lado, la concentración más alta de ATX (50 μM) produjo una disminución significativa en la expresión de proteínas involucradas en la biogénesis mitocondrial (**Figura12 y Figura13**), así como de la expresión génica de mediadores involucrados en dicho proceso (**Figura15**) lo que indica que a concentraciones más altas de ATX el proceso de biogénesis mitocondrial se ve alterado. Todos estos datos correlacionan con lo observado previamente en el laboratorio; en donde, hubo un aumento significativo en la producción de ROS tanto citosólicas como mitocondriales, provocando alteraciones mitocondriales, las cuales se vieron reflejadas por una disminución en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi\text{m}$), así como una alteración en OXPHOS debida a la disminución en la expresión de los complejos II y IV de la CTE, una disminución de la masa mitocondrial, así como un aumento en los niveles de autofagia.

Los procesos que desencadena el tratamiento con las altas concentraciones de ATX, pueden darse de manera consecutiva, ya que la producción de ROS podría desencadenar alteraciones de la función mitocondrial, estas alteraciones conllevan a mitocondrias disfuncionales las cuales son fuente de más ROS, lo que induce más estrés oxidativo que provoca alteraciones en el proceso de control de calidad mitocondrial, por lo que se produce una biogénesis mitocondrial aberrante, lo que lleva a una alteración de la masa mitocondrial y un aumento del proceso de autofagia para tratar de eliminar las mitocondrias dañadas. Ahora bien, el tratamiento con ATX 10 μM nos demostró que

existe una barrera con respecto a las dosis y que tal efecto dual, puede presentarse o no dependiendo de la dosis utilizada, el cual se ve reflejado al favorecer o no la activación de la biogénesis mitocondrial.

IX. Conclusiones

En conclusión, nuestros hallazgos demuestran que el tratamiento con ATX presenta una respuesta bifásica en células SH-SY5Y diferenciadas, la cual esta mediada por la dosis y que dependiendo de esta puede desencadenar o no varios mecanismos; lo que indica que ATX produce efectos terapéuticos activos adicionales sobre la biogénesis mitocondrial, más allá de la inhibición en la recaptura de norepinefrina.

X. Perspectivas

Se requieren realizar más experimentos de la expresión génica de los mediadores de la biogénesis mitocondrial para poder concluir correctamente, cual es el papel de la concentración de 10 μ M de ATX sobre este proceso. Así mismo, hacen falta más estudios para caracterizar la dosis de ATX en la que más allá de ser perjudicial para la salud de los pacientes con TDAH llega a ser benéfica.

XI. Referencias

- Altunkaynak, B. Z., Onger, M. E., Turkmen, A. P., Yurt, K. K., Altun, G., Yuce, M., & Kaplan, S. (2016). Effects of Methylphenidate and Atomoxetine on Development of the Brain. In *Melatonin, Neuroprotective Agents and Antidepressant Therapy*, pp. 825–845.
- Avshalumov, M. V., & Rice, M. E. (2003). Activation of ATP-sensitive K⁺ (K(ATP)) channels by H₂O₂ underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(20), 11729–11734.
- Bergeron, R., Ren, J. M., Cadman, K. S., Moore, I. K., Perret, P., Pypaert, M., Shulman, G. I. (2001). Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *281*(6), E1340–E1346.
- Biederman, J. (2005). Attention-deficit/hyperactivity disorder: A selective overview. *Biological Psychiatry*, *57*(11), 1215–1220.
- Bindoli, A., Rigobello, M. P., & Deeble, D. J. (1992). Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radical Biology and Medicine*, *13*(4), 391–405.
- Bouchatta, O., Manouze, H., Bouali-benazzouz, R., Kerekes, N., Ba-M'hamed, S., Fossat, P., Bennis, M. (2018). Neonatal 6-OHDA lesion model in mouse induces Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder (ADHD)-like behaviour. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–13.
- Braun, J. M., Kahn, R. S., Froehlich, T., Auinger, P., & Lanphear, B. P. (2006). Exposures to environmental toxicants and attention deficit hyperactivity disorder in U.S. children. *Environmental Health Perspectives*, *114*(12), 1904–1909.
- Bulut, M., Selek, S., Bez, Y., Cemal Kaya, M., Gunes, M., Karababa, F., Asuman Savas, H. (2013). Lipid peroxidation markers in adult attention deficit hyperactivity disorder: New findings for oxidative stress. *Psychiatry Research*, *209*, 638–642.

- Bulut, M., Selek, S., Gergerlioglu, H. S., Savas, H. A., Yilmaz, H. R., Yuce, M., & Ekici, G. (2007). Malondialdehyde levels in adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 32(6), 435–438.
- Bymaster, F., Katner, J. S., Nelson, D. L., Hemrick-Luecke, S. K., Threlkeld, P. G., Heiligenstein, J. H., Perry, K. W. (2002). Atomoxetine Increases Extracellular Levels of Norepinephrine and Dopamine in Prefrontal Cortex of Rat A Potential Mechanism for Efficacy in Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. *Neuropsychopharmacology*, 27(5), 699–711.
- Castellanos, F. X., Sonuga-Barke, E. J. S., Milham, M. P., & Tannock, R. (2006). Characterizing cognition in ADHD: beyond executive dysfunction. *Trends in Cognitive Sciences*, 10(3), 117–123.
- Ceylan, M. F., Sener, S., Bayraktar, A. C., & Kavutcu, M. (2012). Changes in oxidative stress and cellular immunity serum markers in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 66(3), 220–226.
- Ceylan, M., Sener, S., Cavunt Bayraktar, A., & Kavutcu, M. (2010). Oxidative imbalance in child and adolescent patients with attention-deficit/ hyperactivity disorder. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 34(8), 1491–1494.
- Chen, A., Xiong, L.-J., Tong, Y., & Mao, M. (2013). Neuroprotective effect of brain-derived neurotrophic factor mediated by autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Molecular Medicine Reports*, 8(4), 1011–1016.
- Chomczynski, & Sacchi. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159.
- Chomczynski, & Sacchi. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1(2), 581–585.
- Comim, C. M., Gomes, K. M., Réus, G. Z., Petronilho, F., Ferreira, G. K., Streck, E. L., Quevedo, J. (2014). Methylphenidate treatment causes oxidative stress and alters energetic metabolism in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder.

- Acta Neuropsychiatrica*, 26(2), 96–103.
- Corona, J. C. (2018). Natural Compounds for the Management of Parkinson's Disease and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *BioMed Research International*, 2018, 1–12.
- Corona, J. C., & Duchen, M. R. (2015a). Impaired mitochondrial homeostasis and neurodegeneration: towards new therapeutic targets? *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 47(1–2), 89–99.
- Corona, J. C., & Duchen, M. R. (2015b). PPAR γ and PGC-1 α as therapeutic targets in Parkinson's. *Neurochemical Research*, 40(2), 308–316.
- Corona, J. C., & Duchen, M. R. (2016). PPAR γ as a therapeutic target to rescue mitochondrial function in neurological disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 153–163.
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5), 299–305.
- Cox, C. S., McKay, S. E., Holmbeck, M. A., Christian, B. E., Scortea, A. C., Tsay, A. J., Shadel, G. S. (2018). Mitohormesis in Mice via Sustained Basal Activation of Mitochondrial and Antioxidant Signaling. *Cell Metabolism*, 28(5), 776-786.
- Díaz-Alonso, C., Garrote-Santana, H., Amor-Vigil, A. maría, Suárez-González, Y., & González-Mugica, R. (2013). Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT- PCR. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 29(3), 298–303.
- Dimitrion, P., Zuo, L., Zhou, T., Ziegler, A. C., & Liu, Z. (2017). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–11.
- Dorn, G. W., Vega, R. B., Kelly, D. P., & Kelly, D. P. (2015). Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart. *Genes & Development*, 29(19), 1981–1991.

- Faraone, S. V., & Mick, E. (2010). Molecular Genetics of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Psychiatric Clinics of NA*, 33, 159–180.
- Fox, S. (2011). *Fisiología Humana*. (Mc Graw Hill, Ed.) (Doceava).
- Fumagalli, F., Cattaneo, A., Caffino, L., Ibba, M., Racagni, G., Carboni, E., Riva, M. A. (2010). Sub-chronic exposure to atomoxetine up-regulates BDNF expression and signalling in the brain of adolescent spontaneously hypertensive rats: Comparison with methylphenidate. *Pharmacological Research*, 62(6), 523–529.
- Galluzzi, L., Pietrocola, F., Levine, B., & Kroemer, G. (2014). Metabolic control of autophagy. *Cell*, 159(6), 1263–1276.
- Garnock-Jones, K. P., & Keating, G. M. (2009). Atomoxetine. *Pediatric Drugs*, 11(3), 203–226.
- Goldstein, D. S., Kopin, I. J., & Sharabi, Y. (2014). Catecholamine autotoxicity. Implications for pharmacology and therapeutics of Parkinson disease and related disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 144(3), 268–282.
- Hayat, M. A. (1995). *Immunogold-silver staining: principles, methods, and applications*. (CRC Press, Ed.).
- Hock, M. B., & Kralli, A. (2009). Transcriptional Control of Mitochondrial Biogenesis and Function. *Annual Review of Physiology*, 71, 177–203.
- Jesinkey, S. R., Korrapati, M. C., Rasbach, K. A., Beeson, C. C., & Schnellmann, R. G. (2014). Atomoxetine prevents dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 351(3), 663–673.
- Joseph, N., Zhang-James, Y., Perl, A., & Faraone, S. V. (2015). Oxidative Stress and ADHD: A Meta-Analysis. *Journal of Attention Disorders*, 19(11), 915–924.
- Kamradt, J. M., Momany, A. M., & Nikolas, M. A. (2018). Sluggish Cognitive Tempo Symptoms Contribute to Heterogeneity in Adult Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Journal of Psychopathology and Behavioral Assessment*, 40(2), 206–223.

- Karababa, İ. F., Savas, S. N., Selek, S., Cicek, E., Cicek, E. I., Asoglu, M., Ulas, T. (2017). Homocysteine Levels and Oxidative Stress Parameters in Patients With Adult ADHD. *Journal of Attention Disorders*, 21(6), 487–493.
- Kelly, S. A., Havrillal, C. M., Brady, T. C., Abramo, K. H., & Levin, E. D. (1998). Oxidative stress Oxidative stress. *Environmental Health Perspectives*, 106(7), 375–384.
- Khacho, M., Harris, R., & Slack, R. S. (2019). Mitochondria as central regulators of neural stem cell fate and cognitive function. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(1), 34–48.
- Kobayashi, T., Washiyama, K., & Ikeda, K. (2010). Inhibition of G-Protein-Activated Inwardly Rectifying K⁺ Channels by the Selective Norepinephrine Reuptake Inhibitors Atomoxetine and Reboxetine. *Neuropsychopharmacology*, 35(7), 1560–1569.
- Koda, K., Ago, Y., Cong, Y., Kita, Y., Takuma, K., & Matsuda, T. (2010). Effects of acute and chronic administration of atomoxetine and methylphenidate on extracellular levels of noradrenaline, dopamine and serotonin in the prefrontal cortex and striatum of mice. *Journal of Neurochemistry*, 114(1), 259–270.
- Korecka, J. A., van Kesteren, R. E., Blaas, E., Spitzer, S. O., Kamstra, J. H., Smit, A. B., Bossers, K. (2013). Phenotypic Characterization of Retinoic Acid Differentiated SH-SY5Y Cells by Transcriptional Profiling. *PLoS ONE*, 8(5), 1–17.
- Kovalevich, J., & Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1078, 9–21.
- Lempp, T., Toennes, S. W., Wunder, C., Russe, O. Q., Möser, C. V, Kynast, K. L., Niederberger, E. (2013). Altered gene expression in the prefrontal cortex of young rats induced by the ADHD drug atomoxetine. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 40, 221–228.
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27–42.
- Li, P. A., Hou, X., & Hao, S. (2017). Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration.

Journal of Neuroscience Research, 95(10), 2025–2029.

- Lopresti, A. L. (2015). Oxidative and nitrosative stress in ADHD: possible causes and the potential of antioxidant-targeted therapies. *ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders*, 7(4), 237-247.
- Ludolph, A. G., Udvardi, P. T., Schaz, U., Henes, C., Adolph, O., Weigt, H. U., Föhr, K. J. (2010). Atomoxetine acts as an NMDA receptor blocker in clinically relevant concentrations. *British Journal of Pharmacology*, 160(2), 283–291.
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175.
- Makris, N., Buka, S. L., Biederman, J., Papadimitriou, G. M., Hodge, S. M., Valera, E. M., Seidman, L. J. (2008). Attention and Executive Systems Abnormalities in Adults with Childhood ADHD: A DT-MRI Study of Connections. *Cerebral Cortex*, 18(5), 1210–1220.
- Martins, M. R., Reinke, A., Petronilho, F. C., Gomes, K. M., Dal-Pizzol, F., & Quevedo, J. (2006). Methylphenidate treatment induces oxidative stress in young rat brain. *Brain Research*, 1078(1), 189–197.
- Mick, E., Biederman, J., Faraone, S. V., Sayer, J., & Kleinman, S. (2002). Case-Control Study of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder and Maternal Smoking, Alcohol Use, and Drug Use during Pregnancy. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 41(4), 378–385.
- Miyazaki, I., & Asanuma, M. (2008). Dopaminergic Neuron-Specific Oxidative Stress Caused by Dopamine Itself. *Acta Medica Okayama*, 62(3), 141–150.
- Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Movilla, N., Pérez-Martos, A., de Cordoba, S. R., Enríquez, J. A. (2006). Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nature Genetics*, 38(11), 1261–1268.
- Napolitano, A., Manini, P., & d'Ischia, M. (2011). Oxidation Chemistry of Catecholamines and Neuronal Degeneration: An Update. *Current Medicinal Chemistry*, 18(12), 1832–

1845.

- Nirwane, A., & Majumdar, A. (2018). Understanding mitochondrial biogenesis through energy sensing pathways and its translation in cardio-metabolic health. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 124(3), 194–206.
- Onyango, I. G., Lu, J., Rodova, M., Lezi, E., Crafter, A. B., & Swerdlow, R. H. (2010). Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1802(1), 228–234.
- Oztop, D., Altun, H., Baskol, G., & Ozsoy, S. (2012). Oxidative stress in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Clinical Biochemistry*, 45(10–11), 745–748.
- Palikaras, K., Lionaki, E., & Tavernarakis, N. (2015). Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis. *Cell Death & Differentiation*, 22(9), 1399–1401.
- Piantadosi, C. A., & Suliman, H. B. (2006). Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(1), 324–333.
- Picca, A., & Lezza, A. M. S. (2015). Regulation of mitochondrial biogenesis through TFAM–mitochondrial DNA interactions: Useful insights from aging and calorie restriction studies. *Mitochondrion*, 25, 67–75.
- Pineda, D. A., Palacio, L. G., Puerta, I. C., Merchán, V., Arango, C. P., Galvis, A. Y., Arcos-Burgos, M. (2007). Environmental influences that affect attention deficit/hyperactivity disorder. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 16(5), 337–346.
- Purper-Ouakil, D., Ramoz, N., Lepagnol-Bestel, A.-M., Gorwood, P., & Simonneau, M. (2011). Neurobiology of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. *Pediatric Research*, 69(5), 69–76.
- Rasbach, K. A., & Schnellmann, R. G. (2007). Signaling of mitochondrial biogenesis following oxidant injury. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(4), 2355–2362.

- Ristow, M., & Zarse, K. (2010). How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Experimental Gerontology, 45*(6), 410–418.
- Rubia, K., Halari, R., Smith, A. B., Mohammad, M., Scott, S., & Brammer, M. J. (2009). Shared and disorder-specific prefrontal abnormalities in boys with pure attention-deficit/hyperactivity disorder compared to boys with pure CD during interference inhibition and attention allocation. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines, 50*(6), 669–678.
- Schiavo, G., Matteoli, M., & Montecucco, C. (2000). Neurotoxins Affecting Neuroexocytosis. *Physiological Reviews, 80*(2), 717–766.
- Selek, S., Savas, H. A., Gergerlioglu, H. S., Bulut, M., & Yilmaz, H. R. (2008). Oxidative imbalance in adult attention deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychology, 79*(2), 256–259.
- Sezen, H., Kandemir, H., Savik, E., Basmacı Kandemir, S., Kilicaslan, F., Bilinc, H., & Aksoy, N. (2016). Increased oxidative stress in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Redox Report, 21*(6), 248–253.
- Shaw, P., Eckstrand, K., Sharp, W., Blumenthal, J., Lerch, J. P., Greenstein, D., Rapoport, J. L. (2007). Attention-deficit/hyperactivity disorder is characterized by a delay in cortical maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 104*(49), 19649–19654.
- Shiple, M. M., Mangold, C. A., & Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Journal of Visualized Experiments, (108)*, 53193.
- Sontag, T. A., Tucha, O., Walitza, S., & Lange, K. W. (2010). Animal models of attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): A critical review. *ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders, 2*(1), 1–20.
- Sourander, A., Sucksdorff, M., Chudal, R., Surcel, H.-M., Hinkka-Yli-Salomäki, S., Gyllenberg, D., Brown, A. S. (2019). Prenatal Cotinine Levels and ADHD Among Offspring. *Pediatrics, 143*(3), e20183144.

- Spahis, S., Vanasse, M., Bélanger, S. A., Ghadirian, P., Grenier, E., & Levy, E. (2008). Lipid profile, fatty acid composition and pro- and anti-oxidant status in pediatric patients with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 79(1–2), 47–53.
- Suliman, Hagir B, & Piantadosi, C. A. (2014). Mitochondrial biogenesis: regulation by endogenous gases during inflammation and organ stress. *Current Pharmaceutical Design*, 20(35), 5653–5662.
- Suliman, Hagit B, Carraway, M. S., Tatro, L. G., & Piantadosi, C. A. (2007). A new activating role for CO in cardiac mitochondrial biogenesis. *Journal of Cell Science*, 120(2), 299–308.
- Swanson, J. M., Kinsbourne, M., Nigg, J., Lanphear, B., Stefanatos, G. A., Volkow, N., Wadhwa, P. D. (2007). Etiologic Subtypes of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Brain Imaging, Molecular Genetic and Environmental Factors and the Dopamine Hypothesis. *Neuropsychology Review*, 17(1), 39–59.
- Tabuchi, A., Sakaya, H., Kisukeda, T., Fushiki, H., & Tsuda, M. (2002). Involvement of an upstream stimulatory factor as well as cAMP-responsive element-binding protein in the activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoter I. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(39), 35920–35931.
- Taira, C. A., Carranza, A., Bertera, F., & Höcht, C. (n.d.). Catecolaminas síntesis metabolismo. Receptores adrenérgicos y dopaminérgicos. In *Cardiología*, 94–98.
- Tapia, P. C. (2006). Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: “Mitohormesis” for health and vitality. *Medical Hypotheses*, 66(4), 832–843.
- Tejeda-Romero, C., Kobashi-Margáin, R. A., Alvarez-Arellano, L., Corona, J. C., & González-García, N. (2018). Differences in substance use, psychiatric disorders and social factors between Mexican adolescents and young adults. *The American*

Journal on Addictions, 27(8), 625–631.

Tellez, J. (2000). La Noradrenalina. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, XXIX, 59–73.

Tzavara, E. T., Bymaster, F. P., Overshiner, C. D., Davis, R. J., Perry, K. W., Wolff, M., Nomikos, G. G. (2006). Procholinergic and memory enhancing properties of the selective norepinephrine uptake inhibitor atomoxetine. *Molecular Psychiatry*, 11(2), 187–195.

Uittenbogaard, M., & Chiaramello, A. (2014). Mitochondrial biogenesis: a therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 20(35), 5574–5593.

Velasco Martín, A., & Álvarez González, F. J. (1988). *Compendio de psiconeurofarmacología*. (Díaz de Santos, Ed.).

Verlaet, A. A. J., Breynaert, A., Ceulemans, B., De Bruyne, T., Fransen, E., Pieters, L., Hermans, N. (2019). Oxidative stress and immune aberrancies in attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): a case–control comparison. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 28(5), 719–729.

Voeller, K. K. S. (2004). Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Journal of Child Neurology*, 19(10), 798-814.

Xie, H., Hu, L., & Li, G. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, 123(8), 1086–1092.

Yen, G. C., & Hsieh, C. L. (1997). Antioxidant effects of dopamine and related compounds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(10), 1646–1649.

Yin, F., & Cadenas, E. (2015). Mitochondria: the cellular hub of the dynamic coordinated network. *Antioxidants & Redox Signaling*, 22(12), 961–964.

Yun, J., & Finkel, T. (2014). Mitohormesis. *Cell Metabolism*, 19(5), 757–766.