



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON METILFENIDATO Y
ATOMOXETINA EN EL CUERPO ESTRIADO DE RATAS JÓVENES**

TESIS

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

PRESENTA

DIANA BECIEZ FLORES

Ciudad Universitaria, CDMX

2024





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: Profesor: MARTINEZ BARAJAS J. ELEAZAR
VOCAL: Profesor: GUTIERREZ AGUILAR MANUEL
SECRETARIO: Profesor: CORONA CASTILLO JUAN CARLOS
1er. SUPLENTE: Profesor: VAZQUEZ MARTINEZ EDGAR RICARDO
2° SUPLENTE: Profesor: FRANCO Y BOURLAND REBECCA ELIZABETH

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

ASESOR DEL TEMA:

DR. JUAN CARLOS CORONA CASTILLO

SUSTENTANTE:

DIANA BECIEZ FLORES



ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
I. INTRODUCCIÓN	9
I.I TRASTORNO POR DÉFICIT DE ATENCIÓN E HIPERACTIVIDAD	9
I.II ETIOLOGÍA DEL TDAH	10
I.III REGIONES CEREBRALES COMPROMETIDAS EN EL TDAH	12
I.IV CIRCUITOS DOPAMINÉRGICOS Y NORADRENÉRGICOS Y SU RELACIÓN CON EL TDAH	13
I.V TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO PARA EL TDAH	14
I.VI CUERPO ESTRIADO Y SU RELACIÓN CON EL TDAH	15
I.VII ESTRUCTURA Y CONEXIONES	17
I.VIII ESTRÉS OXIDATIVO Y SU RELACIÓN CON EL TDAH	18
I.IX NEUROINFLAMACIÓN Y SU RELACIÓN CON EL TDAH	21
II. JUSTIFICACIÓN	24
III. HIPÓTESIS	24
IV. OBJETIVO GENERAL	24
V. OBJETIVOS PARTICULARES	24
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	25
VI.I ANIMALES Y TRATAMIENTO	25
VI.II TINCIÓN CON VIOLETA DE CRESILO	25
VI.III INMUNOHISTOQUÍMICA	27
VI.IV CUANTIFICACIÓN	27
VI.V ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
VII. RESULTADOS	30
VII.I EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON MPH Y ATX SOBRE EL DAÑO NEURONAL EN EL CUERPO ESTRIADO	30
VII.II CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LAS CÉLULAS INMUNORREACTIVAS A GFAP DEL CUERPO ESTRIADO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON MPH Y ATX	37



VIII. DISCUSIÓN	44
IX. CONCLUSIONES	50
X. PERSPECTIVAS	51
XI. REFERENCIAS	52



F1. Principales vías, tanto dopaminérgicas y noradrenérgicas y sus proyecciones en el cerebro.....	14
F2. Ganglios basales en sección frontal del cerebro.....	16
F3. Núcleos que conforman el cuerpo estriado.....	16
F4. Los ganglios basales y sus conexiones.	17
F5. El estrés oxidativo contribuye a la fisiopatología de diversas enfermedades neurodegenerativas.....	19
F6. Esquema donde se muestra el proceso neuroinflamatorio.....	22
F7. Representación gráfica de la selección de cortes para realizar la cuantificación.....	26
F8. Diagrama de flujo de la metodología experimental.....	29
F9. Imagen representativa de una rata control del cuerpo estriado teñido con VC.....	30
F10. Imágenes representativas de neuronas teñidas con VC del grupo control en el cuerpo estriado y la cuantificación de neuronas viables	31
F11. Imágenes representativas de neuronas teñidas con VC en ratas tratadas crónicamente durante 28 días con MPH y la cuantificación de neuronas viables	33
F12. Imágenes representativas de neuronas teñidas con VC en ratas tratadas crónicamente durante 28 días con ATX y la cuantificación de neuronas viables	34
F13. Comparación del número de neuronas viables teñidas con VC en los distintos grupos tratados (CN, MPH y ATX)	36
F14. Imagen representativa de la inmunohistoquímica (IHC) contra GFAP del cuerpo estriado dorsal de una rata control.....	37
F15. Imágenes representativas de astrocitos inmunoteñidas con GFAP del grupo control en el cuerpo estriado y la cuantificación de astrocitos GFAP+.....	38
F16. Imágenes representativas de astrocitos inmunoteñidas con GFAP en ratas tratadas crónicamente durante 28 días con MPH y la cuantificación de astrocitos GFAP+.....	39
F17. Imágenes representativas de astrocitos inmunoteñidas con GFAP en ratas tratadas crónicamente durante 28 días con ATX y la cuantificación de astrocitos GFAP+.....	41
F18. Comparación del número de astrocitos GFAP+ en los distintos grupos tratados (CN, MPH y ATX)	43



ABREVIATURAS

ATV Área tegmental ventral
ATX Atomoxetina
BDNF Factor neurotrófico del cerebro
CAT Catalasa
CPF Corteza prefrontal
DA Dopamina
DAT Transportador de dopamina
DP Día posnatal
GFAP Proteína acida fibrilar glial
GPx Glutación peroxidasa
GR Glutación reductasa
GSH Glutación
GSSG Glutación oxidado
H₂O₂ Peróxido de hidrógeno
IHC Inmunohistoquímica
i.p. Intraperitoneal
MPH Metilfenidato
MSN Neuronas espinosas medianas
NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NE Noradrenalina
NET Transportador de norepinefrina
NO Óxido nítrico
Nrf2 Factor nuclear eritroide 2
O₂⁻ Anión superóxido
OH⁻ Ion hidroxilo
PBS Amortiguador de fosfatos
RNS Especies reactivas de nitrógeno



ROS Especies reactivas de oxígeno

SNAP 25 Proteína asociada al sinaptosoma 25

SOD Superóxido dismutasa

TDAH Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad

TNF- α Factor de necrosis tumoral

VC Violeta de cresilo



RESUMEN

Antecedentes: El trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) es un trastorno neurobiológico de la infancia caracterizado por síntomas como falta de atención, hiperactividad e impulsividad. La etiología del trastorno se relaciona con factores sociales, ambientales y sobre todo genéticos. El tratamiento farmacológico de primera línea incluye al metilfenidato (MPH) que es un psicoestimulante y el tratamiento de segunda línea es la atomoxetina (ATX) que es un no psicoestimulante y ambos fármacos contribuyen a aminorar la sintomatología; sin embargo, se ha demostrado que ambos fármacos pueden producir estrés oxidativo, lo que a su vez produciría neuroinflamación y finalmente daño neuronal. Por lo tanto, el estrés oxidativo y la neuroinflamación podrían repercutir negativamente en el tratamiento del trastorno. **Objetivo:** Determinar si la administración crónica de MPH y ATX producen daño neuronal aumentando la neuroinflamación en el cuerpo estriado de ratas jóvenes. **Metodología:** Se utilizó la rata Wistar en etapa prepuberal, a la cual se le administró de forma crónica (28 días), dosis diarias de 10 mg/Kg de MPH o 3 mg/Kg de ATX, ambos por vía intraperitoneal, para posteriormente obtener cortes de cerebro en la región dorsal del cuerpo estriado y realizar la tinción con VC e IHC contra GFAP. **Resultados:** El tratamiento durante 28 días con MPH y ATX produjo una disminución estadísticamente significativa en el número de neuronas viables, en comparación con el grupo CN. Sin embargo, los tratamientos durante 28 días con MPH y ATX no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el número de astrocitos inmunorreactivos a GFAP en comparación con el grupo control, a pesar de mostrar un incremento en el fenotipo reactivo. **Conclusión:** La administración crónica de MPH y ATX en el cuerpo estriado de la rata produjeron una disminución significativa de la densidad neuronal, pero no produjeron un incremento estadísticamente significativo en el número de astrocitos reactivos (neuroinflamación) en el estriado.



1.1 TRASTORNO POR DÉFICIT DE ATENCIÓN E HIPERACTIVIDAD

El trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) es un trastorno del neurodesarrollo, clínicamente heterogéneo y altamente prevalente caracterizado por presentar un patrón continuo de falta de atención y/o hiperactividad/impulsividad, estas conductas suelen interferir en el funcionamiento académico, social y familiar; por ejemplo, se puede presentar un alto riesgo de fracaso académico, baja autoestima, malas relaciones con compañeros e incluso abuso de sustancias (Faraone, et al, 2005; American Psychiatric Association, 2013; Biederman, et al, 2005).

De acuerdo a la quinta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos mentales (DSM V), la valoración se suele realizar antes de los 12 años y se basa en la identificación de seis o más síntomas que pertenecen a la categoría de inatención o hiperactividad/impulsividad, es esencial que estos síntomas se mantengan por al menos seis meses y afecten las actividades sociales y académicas del individuo, adicionalmente se puede identificar 3 subtipos del TDAH, el subtipo predominantemente inatento, el subtipo predominantemente hiperactivo/impulsivo y el subtipo combinado (American Psychiatric Association, 2013). Una de las características del TDAH es la multicomorbilidad, este trastorno suele coexistir con otros trastornos psiquiátricos, la evidencia que se ha recopilado muestra que la depresión, ansiedad, trastornos del espectro autista, trastorno bipolar, trastornos de conducta, trastornos alimentarios y trastornos por abuso de sustancias tienen una alta incidencia en pacientes con TDAH, la cual va desde el 30 hasta el 50% (Gnanavel S, et al, 2019).

Las cifras de prevalencia son muy heterogéneas, suelen variar según los criterios diagnósticos, la edad de los pacientes, los países donde se realizaron los estudios, así como el tipo de análisis efectuado (Polanczyk G, et al, 2007; Posner, et al, 2020). Un metaanálisis estimó que la prevalencia mundial del TDAH es del 5,9 % (Willcutt E, 2012). En México, la Secretaría de Salud señaló que el 5% de los niños y adolescentes mexicanos tienen TDAH (Secretaría de Salud, 2017)



III ETIOLOGÍA DEL TDAH

La etiología del TDAH no se conoce completamente, sin embargo, se ha relacionado con factores genéticos, ambientales y sociales, siendo así el componente genético el más importante, ya que estudios familiares de gemelos y de adopción han concluido que los familiares directos de niños con TDAH tienen 9 veces mayor riesgo de desarrollar el trastorno (Chen W, et al, 2008) y se estima que su heredabilidad oscila entre el 77 y 88% (Faraone & Larsson, 2019), siguiendo esta premisa, se han buscado asociaciones entre diversos genes y el TDAH; y se ha encontrado que las variantes genéticas comunes contribuyen a la susceptibilidad del trastorno. Sin embargo, aún no se ha asociado ninguna variante de manera sólida al TDAH. En un estudio, en más de 50,000 individuos diagnosticados, se identificaron 12 *loci* de riesgo significativo en todo el genoma asociados con el trastorno. Varios de los loci identificados se encuentran en o cerca de genes implicados en el desarrollo neurológico como el gen de la caja de cabeza de horquilla (*FOXP2*), el gen del receptor que contiene el dominio VPS10 relacionado con sortilina 3 (*SORCS3*) y el gen de la fosfatasa 6 de doble especificidad (*DUSP6*) (Demontis D. et al., 2019). Respecto a estudios en los genes individuales, se ha propuesto que diversos genes involucrados en las vías catecolaminérgicas podrían estar implicados en el desarrollo del TDAH con base en consideraciones teóricas y debido a la eficacia que se ha visto experimentalmente al tratamiento con psicoestimulantes (Faraone SV & Biedermann J, 1998). Han sido muchos los estudios en los que se han identificado genes candidatos que confieren susceptibilidad al TDAH, el metaanálisis de Gizer y colaboradores, identificó una asociación significativa del TDAH con los genes de los receptores de dopamina (DA) 4 y 5, con el gen del transportador de DA (DAT), con los genes del receptor y transportador de serotonina 1B (HTR1B) y (5HTT), respectivamente, y con un gen que codifica una proteína reguladora de vesículas sinápticas llamada proteína asociada al sinaptosoma 25 (SNAP-25) (Gizer I, et al, 2009), estos hallazgos han sido significativos, aunque modestos, lo que sugeriría que la vulnerabilidad genética de padecer TDAH podría deberse al efecto mínimo de muchos genes (Faraone, et al, 2005).

Por otro lado, la adversidad biológica y psicosocial son factores ambientales que podrían aumentar la predisposición genética al trastorno y son considerados como factores riesgo que pueden ser parte de la fisiopatología del TDAH.



El entorno familiar sano es esencial durante la niñez para el correcto desarrollo emocional y conductual (Kiff C, et al, 2011), diferentes análisis han encontrado que podría haber una relación importante entre la expresión de algunos síntomas conductuales del TDAH y la calidad de la crianza durante la infancia, los hallazgos que se han encontrado muestran una alta heterogeneidad respecto a la influencia de los factores sociales en el TDAH, por esta razón se ha intentado esclarecer si existe una relación significativa entre ellos, un análisis de diversos estudios han mostrado que los niños sometidos a maltrato tenían 7 veces más probabilidades de ser diagnosticados con TDAH; los niños cuyos padres se separaron o se divorciaron tienen 3 veces más probabilidades de tener TDAH y otros factores asociados con menor impacto son la crianza monoparental y una mala calidad de interacción entre padres e hijo y pueden ser considerados factores de riesgo (Claussen A, et al, 2022). Además, los síntomas conductuales, que son expresados en niños con TDAH pueden ser el resultado del tipo de crianza otorgada por padres que ya tenían antecedentes del trastorno (Park JL, et al, 2017), por lo que se puede decir que los padres y niños tienen un riesgo compartido de TDAH que provoca que los síntomas sean parte de un patrón complejo de diferentes influencias (Faraone, et al, 2021).

Dentro de los factores biológicos que podrían intervenir en el desarrollo del TDAH se encuentran las complicaciones en el parto y durante el embarazo, tales como la hipoxia, toxemia, eclampsia, sufrimiento fetal y eventos traumáticos (Faraone SV & Biederman J, 1998), otro factor biológico que ha sido estudiado ampliamente es el tabaquismo materno, en un estudio las madres de niños con TDAH, informaron tabaquismo intenso (> 10 cigarrillos por día) y también notificaron estrés psicosocial severo (Motlagh MG, et al, 2010), así, la exposición del feto a la nicotina podría provocar hipoxia, bajo peso y desprendimiento prematuro de la placenta, además hay daño en el desarrollo del cerebro debido a su efecto sobre los receptores nicotínicos que modulan la actividad dopaminérgica, pudiendo ser la causa del deterioro conductual y cognitivo (Milberger S, et al, 1996; Kline J, et al, 1989; Denson R, et al, 1975). Por otro lado, también se ha demostrado que el consumo de alcohol en el embarazo incrementa la probabilidad en la descendencia de padecer TDAH (Pagnin D, et al, 2018).



I.III REGIONES CEREBRALES IMPLICADAS EN EL TDAH

Diversos estudios han sugerido que las regiones cerebrales implicadas en el TDAH son aquellas que regulan la función ejecutiva, la cognición, la atención, el comportamiento y la falta de motivación, por ello, los estudios de neuroimagen y neuropsicológicos se han centrado en regiones cerebrales que modulan estos procesos, tales como la corteza prefrontal y sus conexiones con otras regiones subcorticales, como el cuerpo estriado, el hipocampo y el cerebelo (Halperin J & Schultz P, 2006; Bush J, 2010), sin embargo, a pesar de que estas regiones cerebrales han demostrado su implicación en la fisiopatología del TDAH, la mayoría de los estudios publicados muestran una gran variabilidad atribuida a los tamaños de muestra, a los criterios de inclusión y a la propia variabilidad del trastorno.

La corteza prefrontal (CPF) es la región cerebral encargada de las funciones ejecutivas, la cognición y la memoria (Siddiqui S, et al, 2008), esta región tiene extensas conexiones de asociación con otras estructuras subcorticales para la integración de funciones cerebrales superiores (Roberts RJ, et al, 1997). Por ejemplo, el núcleo accumbens, el caudado y el putamen conforman el cuerpo estriado y son parte de las estructuras subcorticales, sus conexiones con la corteza prefrontal participan en el procesamiento de recompensas y el control motivacional (Haber SN & Knutson B, 2010), así como el control cognitivo y la función motora influenciada para guiar el comportamiento (Mendoza R & Schultz W, 2013), otras regiones cerebrales relacionadas son el hipocampo, que tiene un papel importante en el aprendizaje y la memoria (Anand K & Dhikav V, 2012) y el cerebelo que es una estructura encargada del equilibrio, la coordinación, el aprendizaje motor y los movimientos oculares.

En pacientes con TDAH, existe una amplia evidencia de alteraciones estructurales y funcionales en las regiones cerebrales ya mencionadas, los estudios de neuroimagen muestran que las anomalías más consistentes en el TDAH infantil es la disminución del volumen general del cerebro y en estructuras localizadas como la corteza prefrontal, el núcleo caudado, el cuerpo calloso y el cerebelo (Valera, et al, 2007; Frodl T. & Skokauskas N, 2012; Emond V, et al, 2008; Yu M, et al, 2023), respecto al hipocampo se han encontrado hallazgos contradictorios, ya que hay estudios que demuestran un agrandamiento del hipocampo en pacientes con TDAH, lo que sugiere que podría tratarse de una respuesta compensatoria a la gravedad de los síntomas del trastorno (Plessen K, et al, 2006), las



asociaciones de estas áreas cerebrales forman parte de la red frontoestriatal, la cual parece ser una de las principales redes que contribuyen a la fisiopatología del TDAH.

Los estudios funcionales realizados en niños con TDAH han mostrado una conectividad interrumpida en la red frontoestriatal y los estudios realizados en la red de modo predeterminado (DMN), la red frontoparietal, la red de control ejecutivo y la red de atención han mostrado que la conectividad funcional entre controles sanos y diagnosticados con TDAH es distinta (Wu Z, 2020; Gao Y, et al, 2019; Liu N, et al, 2022).

I.IV CIRCUITOS DOPAMINÉRGICOS Y NORADRENÉRGICOS Y SU RELACIÓN CON EL TDAH

La norepinefrina (NE) y la dopamina (DA) son catecolaminas que participan de manera individual o conjunta para regular las funciones de la CPF (Xing B, et al, 2016), la **Figura 1** muestra la distribución de las proyecciones catecolaminérgicas en el cerebro, para la DA hay 3 vías principales, la vía nigroestriatal (flechas punteadas) que parte de la sustancia nigra hacia el caudado y el putamen (cuerpo estriado), la vía mesolímbica y la vía mesocortical (flechas continuas), las cuales parten del área tegmental ventral (VTA) hacia la CPF, adicionalmente la vía mesolímbica se proyecta hacia núcleo accumbens, la amígdala y el hipocampo (Luo SX & Huang EJ, 2016). Por otro lado, las neuronas noradrenérgicas se proyectan desde el *locus coeruleus* (un pequeño núcleo del tronco encefálico, que es la fuente principal de NE en el cerebro) hacia la corteza prefrontal, el hipocampo, el cerebelo, la amígdala, el hipotálamo y bulbo raquídeo (Hussain, et al, 2022). **En la Figura 1**, también se puede observar que ambas vías catecolaminérgicas comparten proyecciones en ciertas regiones cerebrales, por lo que, de manera individual o conjunta, la NE y DA actúan en procesos cognitivos como la vigilancia, la atención, el aprendizaje, la memoria y la codificación de la recompensa, así como el comportamiento (Xing B, et al, 2016).



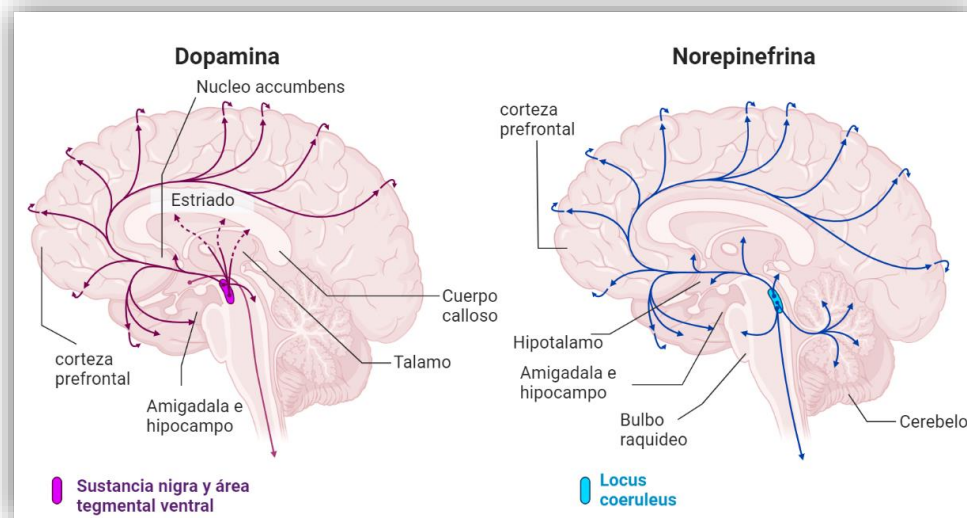


Figura 1. Principales vías dopaminérgicas y noradrenérgicas y sus proyecciones en el cerebro. Creado con BioRender.com

Dado que el TDAH está asociado con la disfunción de la CPF, el estriado, el hipocampo y el cerebelo, la acción de la DA y la NE resulta ser crítica para los procesos cognitivos y de comportamiento que son regulados en estas regiones cerebrales, por ello, el desequilibrio de las vías catecolaminérgicas se ha asociado con la fisiopatología del TDAH (Del Campo N, et al, 2011; Biederman J, 2004).

I.V TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DEL TDAH

Las guías clínicas actuales recomiendan un tratamiento multimodal y multidisciplinario para el TDAH, que se adecue a la edad, los síntomas y las necesidades individuales de cada paciente, siendo esencial la colaboración conjunta de los médicos, maestros y los miembros de la familia (García JM., 2014). Sin embargo, el tratamiento farmacológico para tratar el TDAH sigue siendo el más importante, e incluye varios medicamentos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés), los medicamentos psicoestimulantes son los más utilizados y producen una mejora en los síntomas del trastorno en aproximadamente el 80% de niños que los utilizan, son considerados como la farmacoterapia de primera línea e incluyen al metilfenidato (MPH) y las anfetaminas (AMPH), ambos permiten una mayor disponibilidad de la DA y la NE, optimizando la función ejecutiva y atencional en los pacientes con TDAH (Arnsten & Pliska, 2011). El MPH actúa a través del



bloqueo de los transportadores de DA (DAT) y NE (NET), incrementando de 3 a 4 veces la biodisponibilidad en la hendidura sináptica (Hoodkins et al 2012), permitiendo una mejora en la neurotransmisión y causando un aumento en la atención y la disminución de la hiperactividad-impulsividad (Volkow N, et al, 2012; Heal JD & Pierce MD, 2006). El uso del MPH está asociado a una variedad de efectos secundarios adversos como la disminución del apetito, trastornos del sueño, irritabilidad, disminución de la estatura, entre otros (Hodgkins P, et al, 2012; Kis, et al, 2020).

Una característica importante de los psicoestimulantes es su acción sobre el núcleo accumbens, una estructura subcortical que integra información de regiones límbicas y corticales para mediar las excitaciones motivacionales en resultados conductuales relacionados con el abuso de drogas (Mogenson, et al, 1980; Swanson C, et al, 2006). Por esta razón, en pacientes con trastornos relacionados con el abuso de sustancias el tratamiento de primera línea suele ser con fármacos no psicoestimulantes, tales como la atomoxetina (ATX), guanfacina y clonidina, los cuales se ha demostrado son eficaces en el TDAH (Lopez F, et al, 2017; Faraone SV, 2009) . La ATX es un inhibidor selectivo del transportador de NE e inhibe su recaptura, por lo que mejora la memoria, la atención y los síntomas centrales del TDAH (Callahan PM, et al, 2019), los efectos secundarios de la ATX son irritabilidad, fatiga, mareos, dolor de cabeza, afecciones gastrointestinales y alteraciones del sueño. Sin embargo, suelen disminuir al poco tiempo de inicio del tratamiento y usualmente son bien toleradas por niños y adolescentes (Fu Z, et al, 2022).

No obstante, los no psicoestimulantes son considerados como tratamiento de segunda línea ya que, en comparación con los psicoestimulantes, su efecto es menor y se produce varias semanas después del inicio del tratamiento; además, estos medicamentos generalmente son utilizados si el paciente es intolerante al tratamiento con psicoestimulantes o cuando presentan trastornos de tics, trastornos de comportamiento disruptivo, síndrome de Tourette y trastornos relacionados con el abuso de sustancias (Mechler K, et al, 2022).

I.VI CUERPO ESTRIADO Y SU RELACIÓN CON EL TDAH

Los ganglios basales son estructuras fundamentales para el control motor y el aprendizaje motivado por recompensas, son núcleos subcorticales profundos en los hemisferios cerebrales situados en el proséncéfalo (o encéfalo anterior), debajo de los ventrículos laterales, en la



Figura 2 se observa que los ganglios basales están conformados por el núcleo caudado, el putamen, el núcleo accumbens, el tubérculo olfativo, el globo pálido, la sustancia nigra y parte del subtálamo (Young CB, et al, 2022).

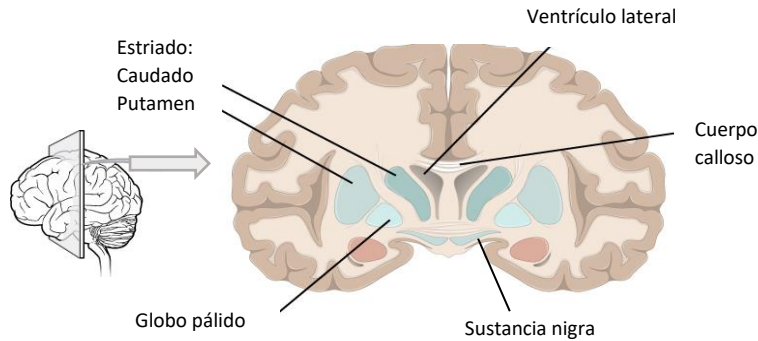


Figura 2. Sección coronal del cerebro que muestra la corteza cerebral y los principales ganglios basales. <https://www.coursehero.com/study-guides/austincc-ap1/the-central-nervous-system/>

Dentro de estos núcleos, destacan el “cuerpo estriado”, se trata del conjunto de estructuras subcorticales más grande, ya que engloba la mayor parte de los ganglios basales, a excepción de la sustancia nigra y el núcleo subtalámico (**Figura 3**). Hoy en día el estriado, incluye al núcleo caudado, el putamen y el núcleo accumbens, que conecta las dos estructuras anteriores. Por su parte, el concepto “cuerpo estriado” se utiliza sobre todo para designar la combinación del estriado y el globo pálido (Young CB, et al, 2022; Lanciego JL, et al, 2012)

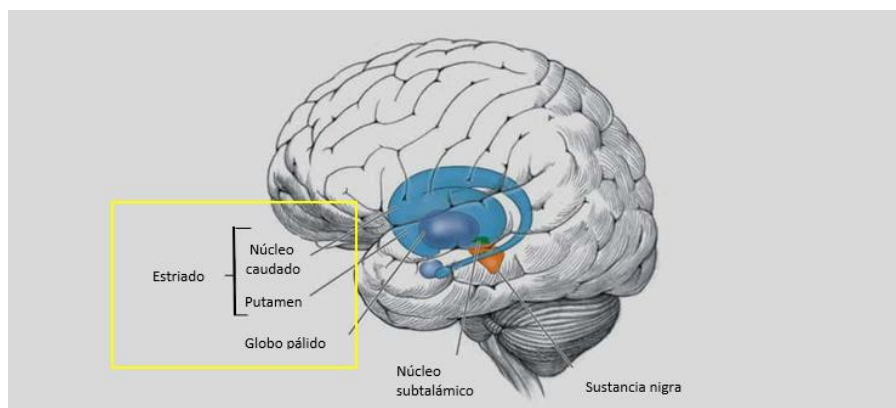


Figura 3. Principales ganglios basales que conforman el cuerpo estriado. (imagen tomada y modificada de <https://innovativehomecare.com/6-signs-of-huntingtons-disease/>)



I.VII ESTRUCTURA Y CONEXIONES

El cuerpo estriado está formado por dos secciones principales: el estriado dorsal y el ventral. El primero incluye el putamen, el globo pálido y los núcleos caudado y lenticular, y se involucra en el control de movimientos conscientes, mientras que el estriado ventral lo forman el núcleo accumbens y el bulbo olfatorio, y está relacionado con las funciones límbicas (Young CB, et al, 2022). La mayor parte de las neuronas que forman el cuerpo estriado son las neuronas espinosas medianas (MSN), que deben su nombre a la forma de sus dendritas y constituyen el 95% de la población total de las neuronas del cuerpo estriado en humanos (Kreitzer AC, et al, 2009), son GABAérgicas y, por lo tanto, se clasifican como neuronas inhibitorias. También hay neuronas de Deiter, que tienen dendritas largas y con escasas ramificaciones, e interneuronas, especialmente colinérgicas y catecolaminérgicas (Tepper JM & Bolam JP, 2004; Mao M, et al, 2019).

En la **Figura 4** se puede observar que las fibras aferentes de toda la corteza cerebral se proyectan sobre el caudado y putamen (líneas amarillas), en éste, se encuentran las MSN que dirigen sus axones a los núcleos de salida a través de la vía directa (1-4) e indirecta (5-6), para así, devolver la información a la corteza cerebral completando un circuito en el que la actividad motora de la corteza cerebral es modulada por los ganglios basales para guiar los movimientos dirigidos a un objetivo específico (Lingford H & Kalk N; 2012)

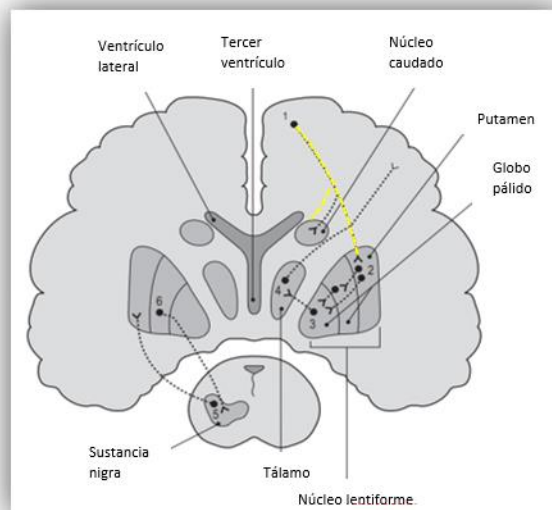


Figura 4. Los ganglios basales y sus conexiones. La vía 1-4 esquematiza el cómo el movimiento voluntario es controlado por la vía indirecta y la vía 5-6 constituye la vía directa. (Imagen tomada y modificada de Lingford H & Kalk N; 2012)



El cuerpo estriado está implicado en la regulación de los movimientos dirigidos a objetivos, así como en el aprendizaje procedimental, en el refuerzo y en la planificación (Haber S, 2011; Baez M & Schultz W, 2013), la alteración de este comportamiento es parte de las características conductuales del TDAH ya que los niños prefieren recompensas pequeñas e inmediatas, lo que los conduce a tomar decisiones premeditadas (Sonuga-Barke, et al, 2008).

Diferentes metaanálisis han evaluado las anormalidades estructurales y funcionales de los núcleos del estriado en el TDAH, por ejemplo, los estudios de resonancia magnética estructural han encontrados volúmenes reducidos en el núcleo accumbens, el caudado y el putamen (Hoogmann, et al, 2017); además, se ha encontrado una disminución de la materia gris en el globo pálido que, de hecho, se correlaciona con la gravedad de la enfermedad (Agoalikum E, et al, 2023); los estudios de imágenes PET destacan un incremento de unión de DA a DAT en pacientes con TDAH lo cual no permite una concentración adecuada de DA extracelular pudiendo contribuir a la fisiopatología del TDAH (Spencer T, et al, 2007), por otro lado, se ha encontrado una desregulación de la conectividad funcional en el cuerpo estriado ventral en los pacientes con TDAH (Musella C. & Weyandt L, 2022), así como la disfunción en la conectividad interregional entre el estriado y estructuras corticales (Posner J, et al, 2014).

Por lo tanto, las anomalías de ganglios basales pueden estar asociados con el desequilibrio dopaminérgico y noradrenérgico observado en el TDAH (Frodl 2010), ya que se ha encontrado que los niños que presentan síntomas de TDAH tienen déficits en la señalización de DA (Van Hulst M, et al, 2016).

I.VIII ESTRÉS OXIDATIVO Y SU RELACIÓN CON EL TDAH

El estrés oxidativo es el desequilibrio entre especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y las defensas antioxidantes, dicho estrés oxidativo puede generarse por disfunción mitocondrial, factores genéticos y ambientales (Kowalczyk P, et al, 2021; Guo C, et al, 2013). Las ROS son moléculas altamente reactivas e inestables, producidas en gran parte, por acción del metabolismo oxidativo mitocondrial, estas especies incluyen al anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ion hidroxilo (OH^-) y el óxido nítrico (NO) (Jelinek M, et al, 2021; Buonocore G, et al, 2010; Murphy M, 2009; Zorov BD, et al, 2014).



En particular, el cerebro requiere un alto consumo de energía, lo que lo hace muy susceptible al daño oxidativo, ya que posee una alta concentración de lípidos que pueden sufrir peroxidación, las proteínas y el ADN también pueden ser dañados por las ROS (Liu J, 1996), la mitocondria es la fuente de energía de las células y es capaz de regular una variedad de procesos como la homeostasis iónica, la apoptosis, la señalización celular y el estado redox (Corona JC & Duchon MR, 2014), por lo cual, cuando son dañadas pueden generar un exceso de ROS, y en consecuencia las alteraciones bioenergéticas provocan la muerte de la célula, contribuyendo potencialmente a enfermedades neurodegenerativas (Smaga I, et al, 2015). Por lo tanto, la acumulación de ROS resulta perjudicial si excede a las defensas antioxidantes que son las encargadas de contrarrestarlas, provocando toxicidad celular y daño tisular (Corona JC, 2020).

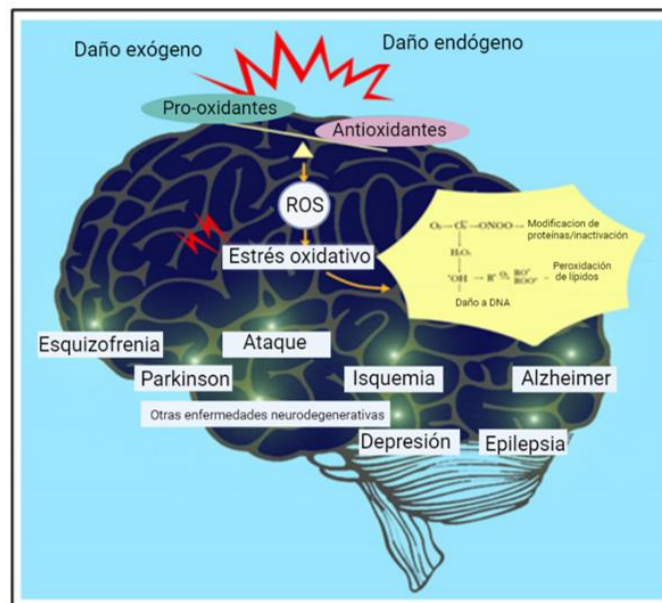


Figura 5. El estrés oxidativo contribuye a la fisiopatología de diversas enfermedades neurodegenerativas.

(imagen tomada y modificada de Lee KH, et al, 2020)

Así, para mantener el estado oxidativo de la célula se debe lograr un equilibrio entre la eliminación y la generación de las ROS y hay dos mecanismos de defensa, el primero es el sistema de enzimas antioxidantes que incluye a la superóxido dismutasa (SOD) que convierte el $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , que a su vez genera oxígeno y agua por acción de la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) que actúa también sobre la reducción del H_2O_2 , y la glutatión reductasa (GR) que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) al glutatión reducido (GSH) (Lee K, et



al, 2020; Shim SY & Kim HS, 2013). Otros antioxidantes importantes que pueden obtenerse de la dieta son el ácido ascórbico, la vitamina E y los β -carotenos (Adwas A., et al 2019). El segundo mecanismo para mantener la homeostasis redox es el incremento de las defensas antioxidantes a través de la activación del factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), este es un factor de transcripción que se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE) localizado en regiones promotoras de diferentes genes de antioxidantes y enzimas como como la hemooxigenasa 1 (HO-1), NAD(P)H deshidrogenasa quinona 1, SOD1, glutatión peroxidasa 1 (GPx1) y CAT (Salim S, 2017; Jelinek M, et al, 2021)

A pesar de que la fisiopatología del TDAH es aún desconocida, se ha encontrado suficiente evidencia de su asociación con el estrés oxidativo; sin embargo, la neuroinflamación es otro proceso que ha sido relacionado como parte de los factores desencadenantes del TDAH, como se describirá más adelante (Vázquez GD, et al, 2023; Corona JC, 2020; Alvarez, L, et al, 2020; Dunn, et al, 2019).

El TDAH, así como otras enfermedades psiquiátricas, está asociado con el estrés oxidativo y el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes (**Figura 5**), una gran variedad de estudios clínicos miden los niveles de NO, malondialdehído, oxidación de proteínas, 8-oxo-7,8-dihidroguanina etc., como marcadores de estrés oxidativo en plasma de niños diagnosticados con TDAH, concluyendo que en pacientes afectados hay más estrés oxidativo que en los controles (Joseph N, et al, 2015), estas afirmaciones concuerdan con los visto en modelos animales en donde ha habido incremento de estrés oxidativo en regiones cerebrales relacionadas con la sintomatología del TDAH (Leffa DT, et al, 2017), además, el estrés nitrosativo también muestra una contribución al TDAH, ya que en muestras de personas con TDAH hay niveles de NO elevados (Selek S, et al, 2008; Ceylan M, et al, 2012; Avcil S, et al, 2019), aunado a esto, las defensas antioxidantes también se han visto afectadas, en una variedad de estudios se han determinado que pacientes con TDAH tienen un estado antioxidante total (TAS) disminuido (Chovanova Z, et al, 2006; Kul M, et al, 2015; Sezen H, et al, 2016) , así como un menor nivel de enzimas antioxidantes como la SOD, GPx y CAT (Ceylan M, et al, 2010; Ruchi K, et al, 2011; Russo AJ, 2010). Por lo tanto, estas observaciones sugieren que el estrés oxidativo tiene una contribución a la fisiopatología del TDAH y que el uso de antioxidantes podría tener potencial como tratamiento coadyuvante contra el estrés



oxidativo propio del TDAH (Corona JC, 2020). El tratamiento farmacológico comúnmente utilizado para el TDAH es eficaz para la disminución de los síntomas principales del TDAH, sin embargo, se ha demostrado que su uso crónico en ratas jóvenes incrementa puede provocar estrés oxidativo (Gomes KM, et al, 2009; Comim CM, et al, 2014) y daño a proteínas y ADN (Martins MR, et al, 2006; Andreazza AC, et al, 2007), así como alteración de las enzimas antioxidantes (Gomes KM, et al, 2008; Dutt M, et al, 2020).

I.IX NEUROINFLAMACIÓN Y SU RELACIÓN CON EL TDAH

Actualmente, hay un creciente interés que apunta a la neuroinflamación como un factor implicado en la fisiopatología del TDAH (Vázquez GD, et al, 2023; Alvarez AL, et al, 2020; Instanes JT, et al, 2017, Corona JC, 2020; Dunn GA, et al, 2019). Así, las células gliales o glía son células especializadas que se encuentran en el sistema nervioso, están conformadas por la microglía, astrocitos y oligodendrocitos (Moalem G & Tracey DJ, 2006), la glía no participa durante la sinapsis, pero si contribuye a su modulación, además mantienen el medio iónico de las células y se encargan de la recuperación después de un daño neural, o bien, dan inicio al proceso de neuroinflamación (Purves D, et al, 2001). La inflamación del sistema nervioso central, comúnmente conocida como neuroinflamación, puede caracterizarse por la activación de la microglía (que desempeña un papel en condiciones patológicas y fisiológicas), los astrocitos, los oligodendrocitos y células endoteliales, también se presenta un incremento en los niveles de proteasas, glutamato, ROS, NO, quimiocinas (IP-10, RANTES y MCP-1) las cuales tienen como función principal actuar como quimioatrayentes de células inmunitarias, (Koslowzka A, et al, 2019), citoquinas tóxicas (IL-1 β , TNF- α e IL-6), prostaglandinas e infiltración de células T y B, neutrófilos, monocitos/macrófagos y células dendríticas (Kohman & Rhodes, 2013; Ni Chasaide & Lynch, 2020; Shabab T, et al, 2017; Yong H, et al, 2019).

Un estado inflamatorio crónico puede ser perjudicial ya que incrementa el riesgo de la aparición de trastornos del neurodesarrollo a través de la activación glial, la cual se da en respuesta a diferentes factores como la exposición a factores ambientales, culminando en el daño neuronal (Dunn GA, et al, 2019; Mithilesh K, et al, 2012), por lo tanto, la neuroinflamación se ha asociado con varios trastornos neuropsiquiátricos, como el autismo, la depresión, la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), entre otras, sugiriendo un papel importante en



su fisiopatología (Moller T, 2010; Weydt P & Moller T, 2005; Mata SM, et al, 2019; Cernackova A, et al, 2020).

Los astrocitos son la principal población de células gliales del SNC y desempeñan importantes funciones fisiológicas en el cerebro. La comunicación entre astrocitos y neuronas a través de la liberación de varios factores neurotróficos es un acontecimiento primordial en el mantenimiento del SNC (Dong y Benveniste, 2001). Los astrocitos tienen funciones proinflamatorias y antiinflamatorias dependiendo del daño, como se observa en la **Figura 6** el estado activo de los astrocitos (astrocitos reactivos) y su acumulación (astrocitosis o astrogliosis) son un sello distintivo de la neurodegeneración y la neuroinflamación de diversas enfermedades neurodegenerativas (Eng, et al, 1994). Aunque los astrocitos activados segregan diferentes factores neurotróficos para la supervivencia neuronal, se cree que una activación rápida y grave aumenta/inicia una respuesta inflamatoria, que conduce a la muerte neuronal y a lesiones cerebrales (Tani M, et al, 1996). Tras una activación grave los astrocitos secretan varias sustancias neurotóxicas y expresan un nivel incrementado de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), considerada una proteína marcadora de la astrogliosis (Eng LF, et al, 1994).

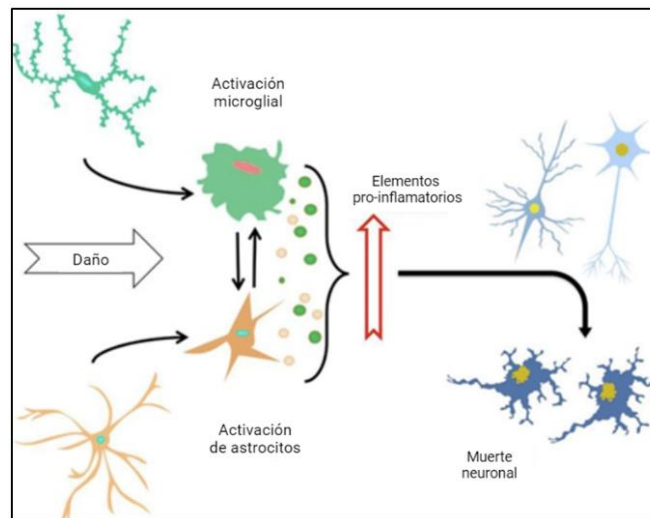


Figura 6. Esquema donde se muestra el proceso neuroinflamatorio. La activación de la microglía y los astrocitos provoca el incremento de elementos proinflamatorios que, de manera crónica, pueden producir neurodegeneración.

(Imagen tomada y modificada de Morales I, et al, 2014).



Se ha demostrado que la neuroinflamación contribuye a la fisiopatología del TDAH, diversos metaanálisis y análisis individuales han concluido que en pacientes con TDAH hay niveles más altos de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-10, IL-16 e IL-13 en comparación con los controles, también se ha encontrado correlación entre la sintomatología del TDAH y polimorfismos en los genes de IL-6, TNF-alfa, e IL-1Ra, (Anand D, et al, 2017; Darwish A, et al, 2019; Donfrancesco R, et al, 2021), otros polimorfismos vistos en el ADN de niños con TDAH se encuentran en el factor neurotrófico del cerebro (BNDF) que es importante para la supervivencia de las neuronas , los polimorfismos en este gen puede representar un riesgo del desarrollo del trastorno (Drtilkova I, et al, 2008), también en el suero de niños se ha visto una disminución del marcador de función glial, que es la proteína B fijadora de calcio (S100B), lo que sugiere una función glial deficiente (Oades R, et al, 2010) además se ha visto en diversos estudios que en modelos animales de inflamación durante el neurodesarrollo se presentan síntomas conductuales similares a los observados en el TDAH como deficiencias en el aprendizaje y la memoria (Dunn GA, et al, 2019), lo cual puede deberse a cambios funcionales en el sistema dopaminérgico durante el desarrollo. Sin embargo, muchos de los estudios que relacionan a la neuroinflamación con el TDAH muestran resultados heterogéneos, inconsistentes y utilizan tamaños de muestra pequeños, por lo que hace falta más investigación en esta área.

Como se mencionó anteriormente, en una lesión aguda los factores proinflamatorios y las ROS liberadas ayudan a limitar el daño y contribuyen a la reparación del tejido, pero cuando el daño persiste la glía entra en un estado sobre-activado en el que los niveles de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) causan toxicidad a las neuronas circundantes (Krause y Müller, 2010), por ello, la neuroinflamación y el estrés oxidativo son dos procesos que se contribuyen el uno al otro, sumado a esto, el tratamiento utilizado para el TDAH podría estar contribuyendo a este “circulo vicioso”, por ejemplo, se ha demostrado que el MPH puede inducir una respuesta inflamatoria en el cerebro y a su vez un proceso neurodegenerativo, ya que se ha encontrado que dosis altas de MPH causan un incremento de TNF- α e IL1 β en el hipocampo y la corteza cerebral de ratas, así como activación microglial en diversas áreas del cerebro (Motaghinejad M, et al, 2017; Carias E, et al, 2019).



II. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que el tratamiento con metilfenidato y atomoxetina podría tener efectos negativos asociados a su uso crónico, tales como incrementos en la inflamación y estrés oxidativo lo que aumentaría aún más los síntomas y como resultado, desencadenaría un “círculo vicioso”. Además, se ha demostrado que la neuroinflamación y el estrés oxidativo contribuyen a la fisiopatología del TDAH. No obstante, la relación del tratamiento crónico con metilfenidato y atomoxetina sobre el daño neuronal en el cuerpo estriado, una región crucial en la fisiopatología del TDAH, y sobre la generación de neuroinflamación en ratas adolescentes no se conoce con precisión.

III. HIPÓTESIS

El tratamiento crónico con metilfenidato y atomoxetina en ratas adolescentes producirá daño neuronal aumentando la neuroinflamación en el cuerpo estriado.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el tratamiento crónico con metilfenidato y atomoxetina en el cuerpo estriado de ratas adolescentes ocasiona daño neuronal y neuroinflamación.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto del tratamiento con metilfenidato y atomoxetina sobre el daño neuronal en el cuerpo estriado de ratas adolescentes.
2. Estudiar la relación del tratamiento con metilfenidato y atomoxetina sobre la neuroinflamación en el cuerpo estriado de ratas adolescentes.



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.I ANIMALES Y TRATAMIENTO

Se utilizaron ratas Wistar (N= 30) para el presente proyecto, las crías de ratas fueron separadas de la madre el día posnatal 23 y se mantuvieron en cajas de plástico a temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) y ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h con acceso libre a comida y agua. Los protocolos de cuidado de animales y procedimientos experimentales fueron aprobados por los Comités Institucionales de Ética, Cuidado y Uso de Animales del Hospital Infantil de México Federico Gómez, (HIM2021-022 SSA 1728). Los datos se reportaron de acuerdo con las pautas de ARRIVE. Además, se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento. Las ratas fueron divididas en tres grupos (n=5 por grupo): 1) grupo control (CN) administrado con solución salina al 0.9%; 2) grupo administrado con metilfenidato (MPH - Ritalin) el cual recibió 10 mg/kg por vía intraperitoneal una vez diariamente durante de 28 días (Gerasimov, et al, 2000; Martins, et al, 2006; Torres T, et al, 2009); 3) grupo administrado con atomoxetina (ATX - Strattera) el cual recibió 3 mg/kg por vía intraperitoneal una vez diariamente durante de 28 días (Swanson CJ, et al, 2006). La administración se inició en el día postnatal (DP) considerado como el inicio de la etapa prepuberal del animal (Sengupta P, 2013), el tratamiento tuvo una duración de 28 días (Comim M, et al, 2014; Martins M, et al, 2006; Motaghinejad M, et al, 2015; Fagundes A, et al, 2010) con el fin de simular un tratamiento crónico que persiste durante la niñez y se detiene al iniciar la adolescencia. En la **Figura 7**, se muestra el resumen de la metodología.

VI.II TINCIÓN CON VIOLETA DE CRESILO

Al término de los 28 días de tratamiento (DP52) las ratas se sacrificaron por decapitación usando una guillotina. Se extrajeron rápidamente los cerebros, se fijaron inmediatamente con paraformaldehído al 4 % en PBS durante una semana, se sumergieron en sacarosa al 10, 20 y 30 % durante 5 días, se incluyeron en Tissue-Tek (SAKURA) a -70°C y se cortaron en secciones coronales de 20 μm de espesor a través del cuerpo estriado usando un criostato (LEICA CM3050 S acondicionado a -27°C), se eligieron 4 cortes del cuerpo estriado de la zona rostral, medial y caudal en portaobjetos tratados con polilisina con el fin de tener cortes representativos de todo el cuerpo estriado. La región rostral, medial y caudal se seleccionaron



tomando como referencia un atlas de cerebro de ratón (Paxinos G & Franklin B, 2001), a partir de una morfología inicial del cuerpo estriado identificada empleando el atlas, se recolectaron 4 cortes coronales de 20 µm para la región rostral, después de aproximadamente 100 µm, se recolectaron 4 cortes para la región medial y después de aproximadamente 100 µm se recolectaron los últimos 4 cortes para la región caudal.

Para la tinción con violeta de cresilo (VC), la cual se llevó a cabo para examinar alteraciones en la morfología celular -daño neuronal- en el cuerpo estriado después del tratamiento con MPH y ATX. Las secciones de tejido se sumergieron durante 10 min en soluciones subsecuentes de etanol al 100% (20 min), 96%, 80% y 50% (10 min) , posteriormente se realizó un enjuague de 5 min en agua bidestilada, lo siguiente fue sumergirlos en una solución de VC (SIGMA-ALDRICH, C504-10G, Lot# MKCF4501) , que se preparó disolviendo 0.1 g de VC en 75 ml de agua destilada con unas gotas de ácido acético, para obtener una solución al 0.1% que fue protegida de la luz, después enjuagar en agua destilada para quitar el exceso de colorante y se dejaron durante 20 min en xilol puro (HYCEL, Lot 323310), inmediatamente después se colocaron los cubreobjetos con resina (Entellan) para su posterior observación en el microscopio. En total se tiñeron 4 cortes de la región rostral, 4 cortes de la región medial y 4 cortes de la región caudal, dando un total de 12 cortes teñidos para cada rata, posteriormente se seleccionaron 3 cortes al azar de cada portaobjetos para la toma de micrografías como se puede ver en la **Figura 8**, y de cada uno de los cortes se tomaron 8 micrografías a un aumento de 40 X, utilizando un microscopio invertido de campo claro (Leica DMI1) del cuerpo estriado, 4 para el hemisferio derecho y 4 para el hemisferio izquierdo, para así finalmente obtener un total de 72 imágenes para cada una de las ratas.

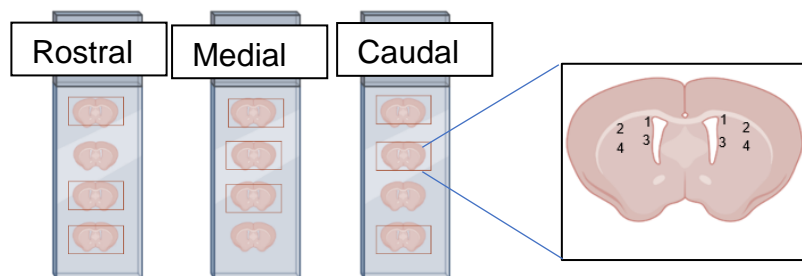


Figura 7. Representación gráfica de la selección de cortes para realizar la cuantificación.



VI.III INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica (IHC) se realizó con el fin de investigar si el daño neuronal generaba gliosis reactiva como consecuencia del tratamiento con MPH y ATX. Así, las secciones del estriado fueron procesadas en flotación (n=5 ratas por grupo). Los cortes fueron tratados para eliminar la sacarosa y se realizó un enjuague en buffer de fosfatos con tritón (PBS-T) que fue preparado en PBS 1x adicionado con 0.25% de tritón X-100 (BIORAD) , posteriormente los tejidos se pasaron a una solución de H₂O₂ (PAROLI) al 0.3% en metanol (HYCEL) durante 6 minutos, el tejido se enjuagó en PBST 2 veces para eliminar el H₂O₂ por 3 min cada lavado, se realizó una pre-incubación en una solución de bloqueo a fin de reducir el marcaje inespecífico en BSA al 1% preparado en PBST durante 30 min, posteriormente el tejido fue incubado con un anticuerpo primario contra GFAP (dilución 1:300) durante toda la noche a 4 °C. Al siguiente día los cortes fueron lavados en PBST por 1 min y se incubaron durante 1h en un anticuerpo secundario (IgGk BP-HRP -1:600, Santa cruz Biotechnology), después de realizar un lavado en PBST, las secciones fueron incubadas en una solución de 3, 3'-tetracloruro de diaminobencidina (DAB) (BD Pharmigen), finalmente se realiza un último lavado en PBS y se montan en portaobjetos, después de una noche de secado se les coloca medio de montaje (Neo-mount), para su posterior observación en un microscopio.

Para determinar cuantitativamente la inmunorreactividad de GFAP, se tomaron 3 cortes rostrales, mediales y caudales, como se esquematiza en la figura 8, se capturaron 4 micrografías por hemisferio a un aumento de 40X en un área de 0.109 mm², dando un total de 8 micrografías por corte, se utilizó un microscopio invertido de campo claro (Leica DMI1) de campo claro. Se eligieron 9 secciones a lo largo del estriado dorsal, para cada sección se tomaron 8 fotografías, 4 en el hemisferio izquierdo y 4 en el hemisferio derecho, utilizando un aumento de 40x dando un total para cada rata de 72 campos totales para cada una de las ratas.

VI.IV CUANTIFICACIÓN

La cuantificación fue realizada con el software Fiji-Image J (1.53k, Wayne Rasband and NIH, USA), en la tinción de Nissl se cuantificó el número de neuronas viables teñidas con VC en un área de 10.8 μm^2 respetando los siguientes criterios: se identificaron como neuronas viables a las células más grandes que presentaron un citoplasma visible alrededor del núcleo, un solo



nucléolo y de 1 a 4 gránulos de cromatina, para la IHC se cuantificó el número de astrocitos (IHC de los astrocitos inmunorreactivos a GFAP) en un área de $10.8 \mu m^2$, para ambos conteos se utilizó la función *multi-point*, el conteo fue realizado por el experimentador y por un contador ciego, finalmente se obtuvo el promedio de ambas cuantificaciones, así como el promedio total y la desviación estándar.

VI.V ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism (Versión Prism6.01, Inc., La Jolla, CA). Los datos se expresaron como la media \pm error estándar (SEM) de al menos 5 experimentos independientes. Las diferencias entre grupos se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) con prueba post hoc de Bonferroni. Se consideró diferencia significativa con respecto al control cuando $p < 0,05$.

El procedimiento experimental utilizado en la presente tesis se resume en la Fig. 8



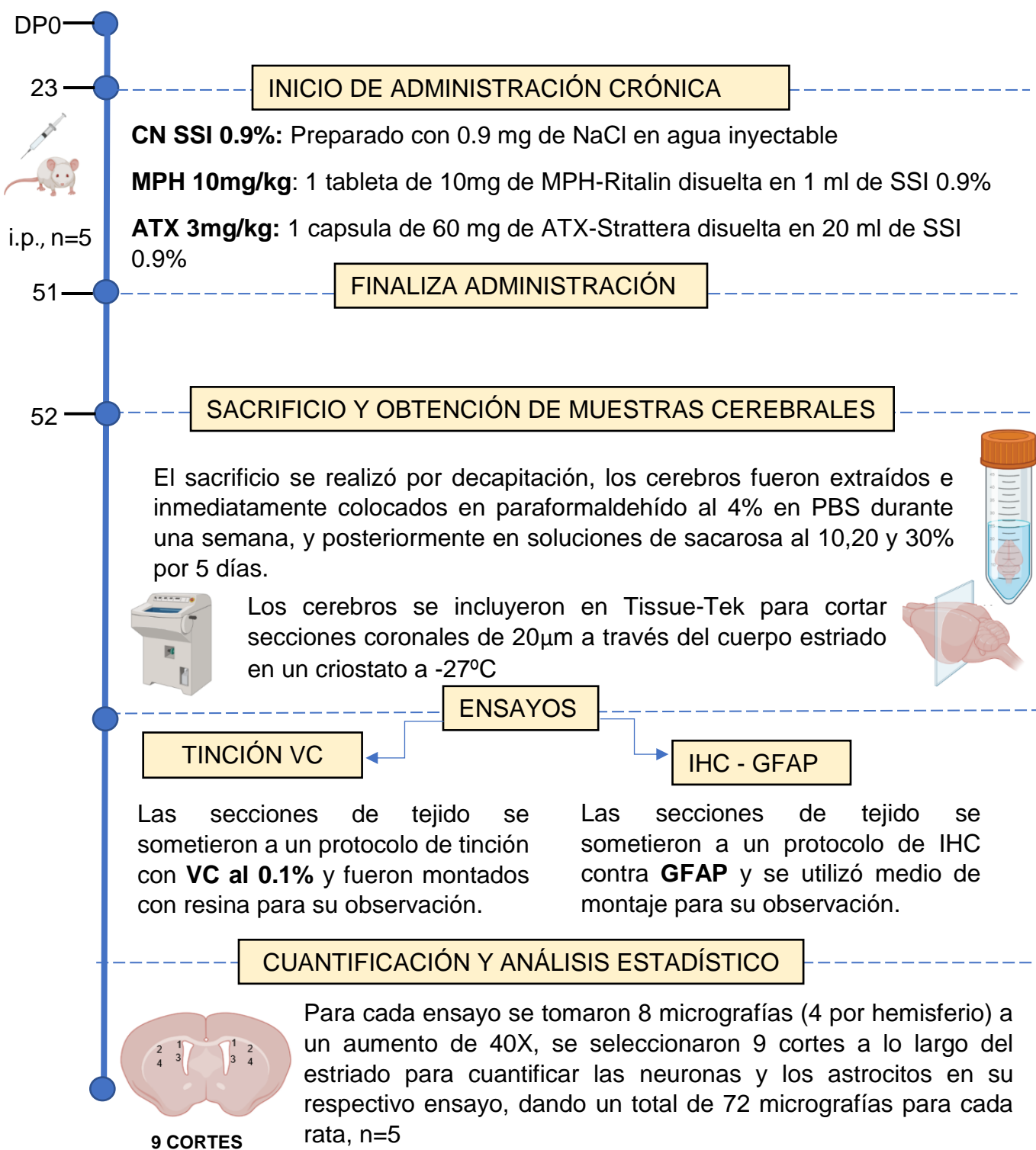


Figura 8. Diagrama de flujo de la metodología experimental



VII. RESULTADOS

VII.I EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON MPH Y ATX SOBRE EL DAÑO NEURONAL EN EL CUERPO ESTRIADO

Para determinar si el tratamiento crónico con MPH o ATX causaron alteraciones en la morfología celular (daño neuronal), realizamos el análisis con VC en cada uno de los grupos experimentales. En la **Figura 9** se muestra una imagen representativa de un corte coronal de todo el cuerpo estriado de una rata control (CN), teñido con VC, los recuadros representan las 4 áreas distribuidas en el cuerpo estriado dorsal seleccionadas para la toma de micrografías y para su cuantificación a 40x, tanto en el hemisferio derecho (HD) e izquierdo (HI).

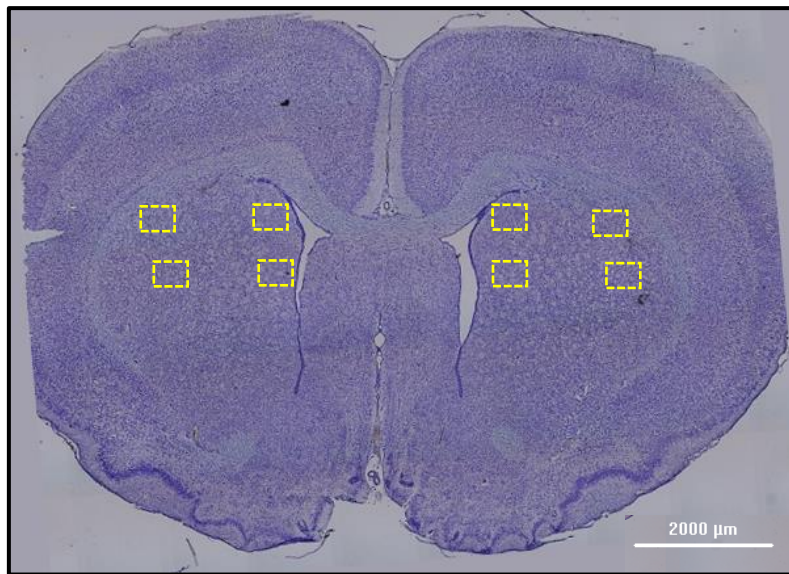


Figura 9. Imagen representativa de un corte coronal del cuerpo estriado de una rata control teñido con VC. Los 4 recuadros amarillos representan las áreas del cuerpo estriado dorsal seleccionadas para la toma de micrografías a 40x, y para la cuantificación en ambos hemisferios.

La evaluación histológica mediante la tinción con VC del grupo CN nos indicó que hay cuerpos celulares claramente visibles (células más grandes), las cuales presentan un citoplasma visible alrededor del núcleo, un solo nucléolo y de 1-4 gránulos de cromatina, señaladas con flechas rojas en la **Figura 10 A**. En ambos hemisferios se visualiza una cantidad similar de neuronas, al realizar la cuantificación en la **Figura 10 B** se puede observar la cuantificación de células en ambos hemisferios de las ratas del grupo CN que fueron inyectadas con solución salina. En la última barra (P) se representa el promedio del número de neuronas entre el HI y HD.



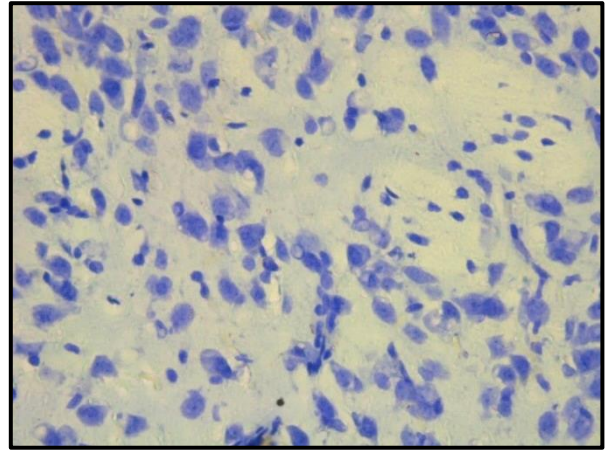
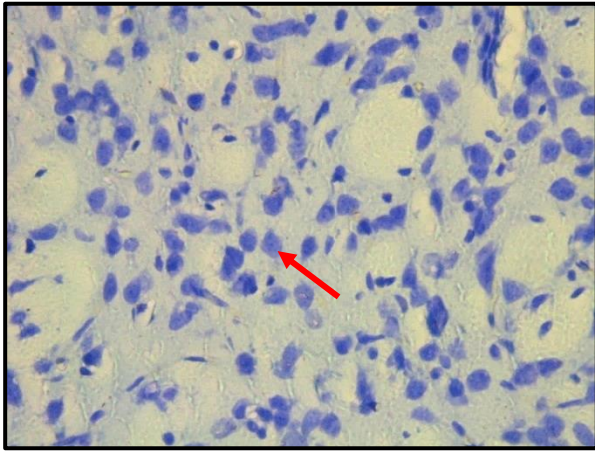
GRUPO CONTROL

HD

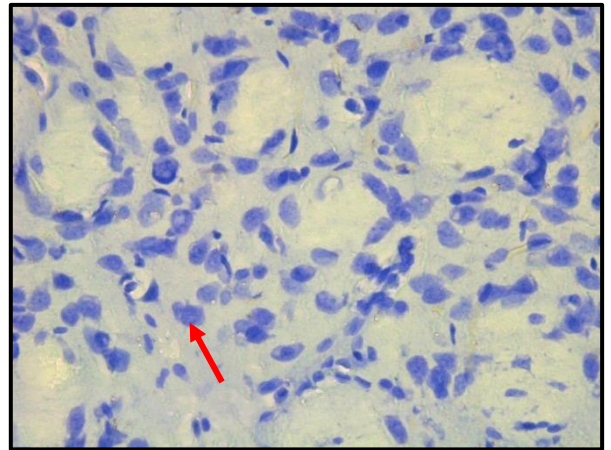
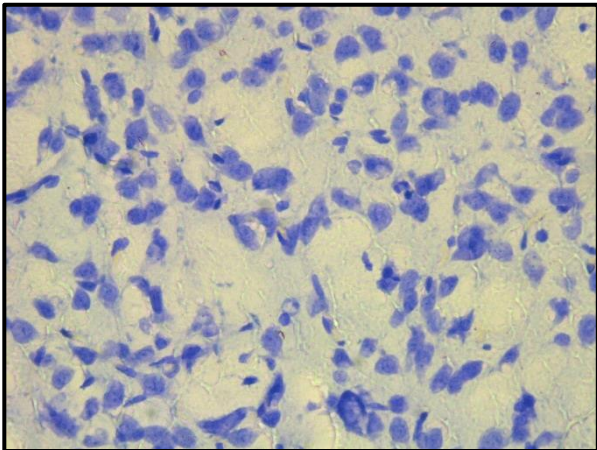
HI

A

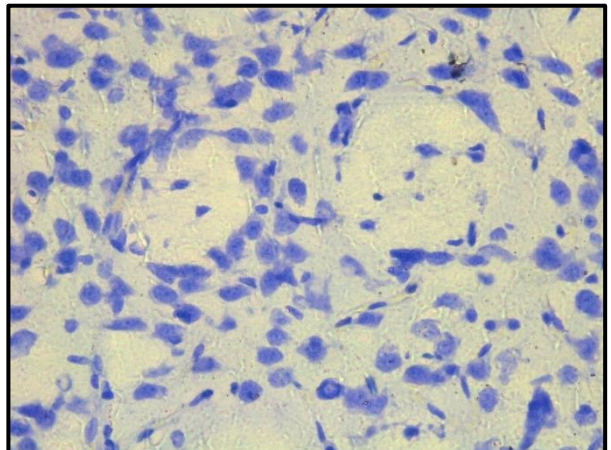
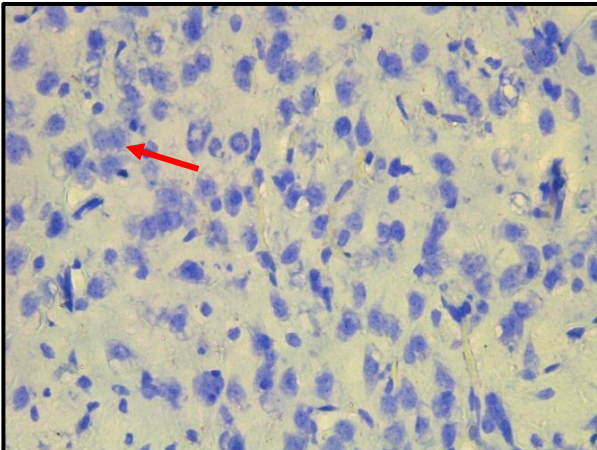
ROSTRAL



MEDIAL



CAUDAL



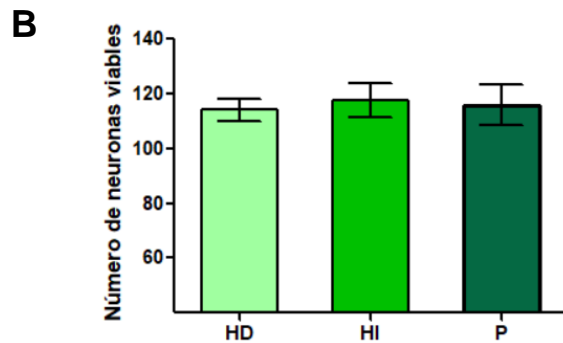
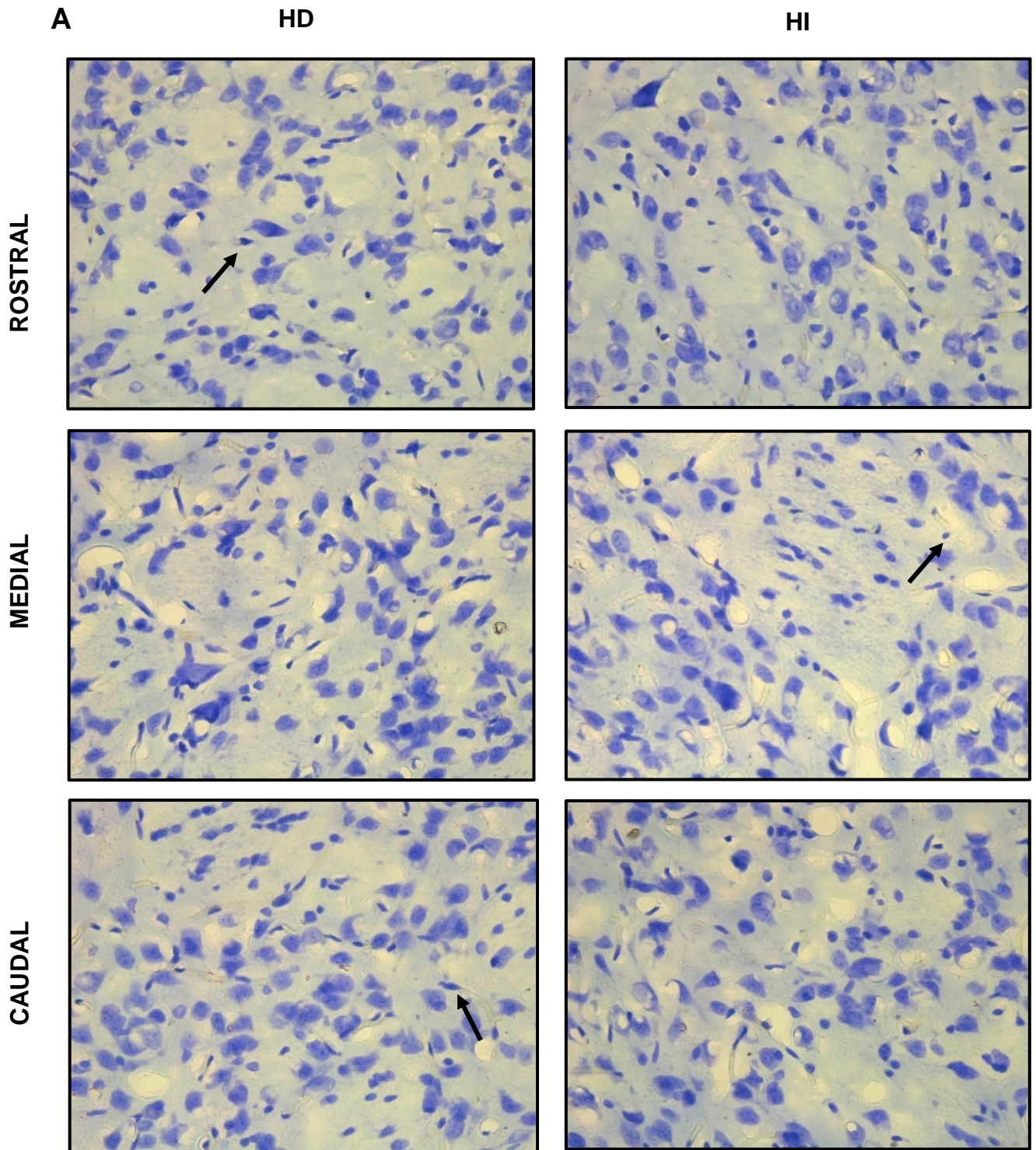


Figura 10. (A) Imágenes representativas del grupo control (CN) en el cuerpo estriado teñido con VC a un aumento de 40x correspondientes al hemisferio derecho (HD) y hemisferio izquierdo (HI). Con las flechas rojas podemos observar cuerpos celulares claramente visibles. (B) Cuantificación del número de neuronas viables del grupo CN teñidas con VC en el hemisferio derecho (barra HD) y en el hemisferio izquierdo (barra HI), así como el promedio del conteo celular de ambos hemisferios (barra P). Las gráficas indican el número de neuronas viables en un área de $10.8 \mu\text{m}^2$. Los datos fueron el promedio \pm EE. ($n=5$).

La evaluación histológica mediante la tinción con VC del grupo tratado con MPH (10 mg/kg) durante 28 días intraperitonealmente, nos indicó que se observa una disminución de las neuronas viables en el cuerpo estriado dorsal en ambos hemisferios (**Figura 11 A**), además hay la aparición de neuronas picnóticas teñidas de un color violeta más intenso, no se aprecia bien el núcleo ni el nucléolo y las células se observaron encogidas. En la **Figura 11 B** se puede observar la cuantificación de células en ambos hemisferios de las ratas del grupo tratado con MPH, en ambos hemisferios se observa una disminución del número neuronas viables, en la última barra (P) se representa el promedio del número de neuronas entre los HI y HD.



GRUPO TRATADO CON MPH



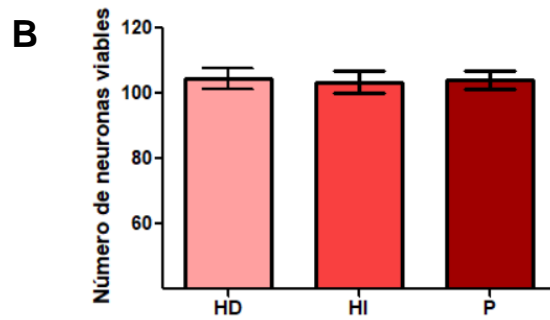
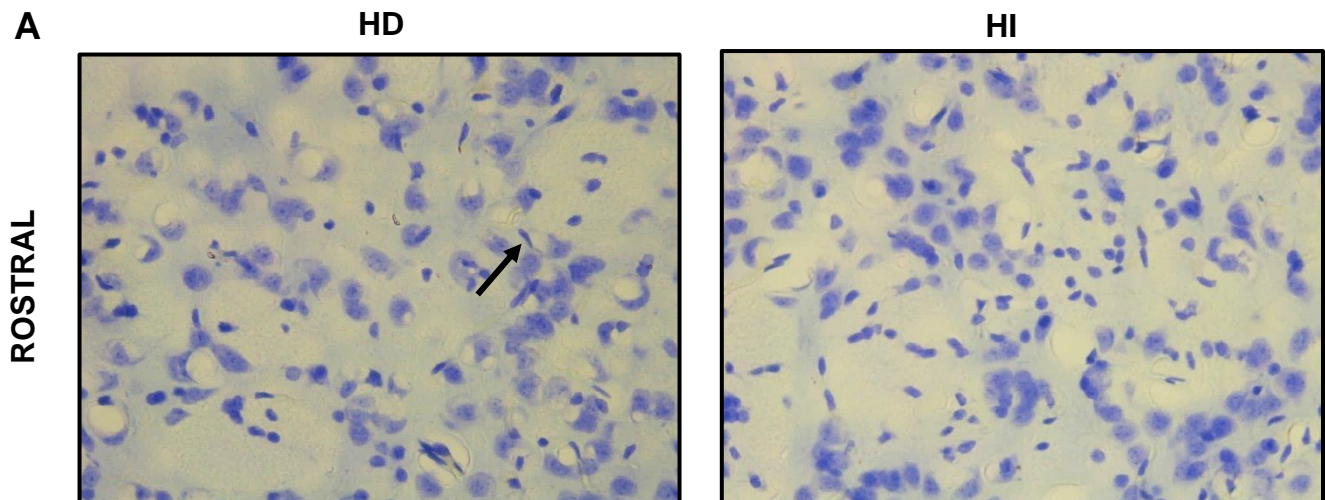


Figura 11. (A) Imágenes representativas de las ratas tratadas crónicamente durante 28 días con metilfenidato (MPH) en donde se observa el cuerpo estriado teñido con VC a un aumento de 40x correspondientes al hemisferio derecho (HD) y hemisferio izquierdo (HI). Con las flechas negras podemos observar indicios de daño celular debido al tratamiento con MPH. (B) Cuantificación del número de neuronas viables del grupo tratado con MPH teñidas con VC en el hemisferio derecho (barra HD) y en el hemisferio izquierdo (barra HI), así como el promedio del conteo celular de ambos hemisferios (barra P). Las gráficas indican el número de neuronas viables en un área de $10.8 \mu\text{m}^2$. Los datos fueron el promedio \pm EE. (n=5).

Al realizar la evaluación histológica mediante la tinción con VC del grupo tratado con ATX (3 mg/kg) durante 28 días intraperitonealmente, nos indicó que se observa una disminución de las neuronas viables en el cuerpo estriado dorsal en ambos hemisferios (**Figura 12 A**). En la **Figura 12 B** se puede observar la cuantificación de células en ambos hemisferios de las ratas del grupo tratado con ATX, en ambos hemisferios se observa una disminución del número neuronas, en la última barra (P) se representa el promedio del número de neuronas entre los HI y HD.

GRUPO TRATADO CON ATX



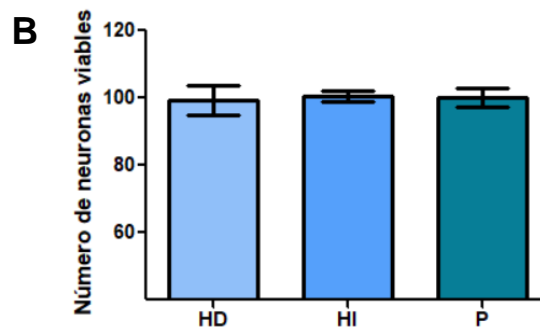
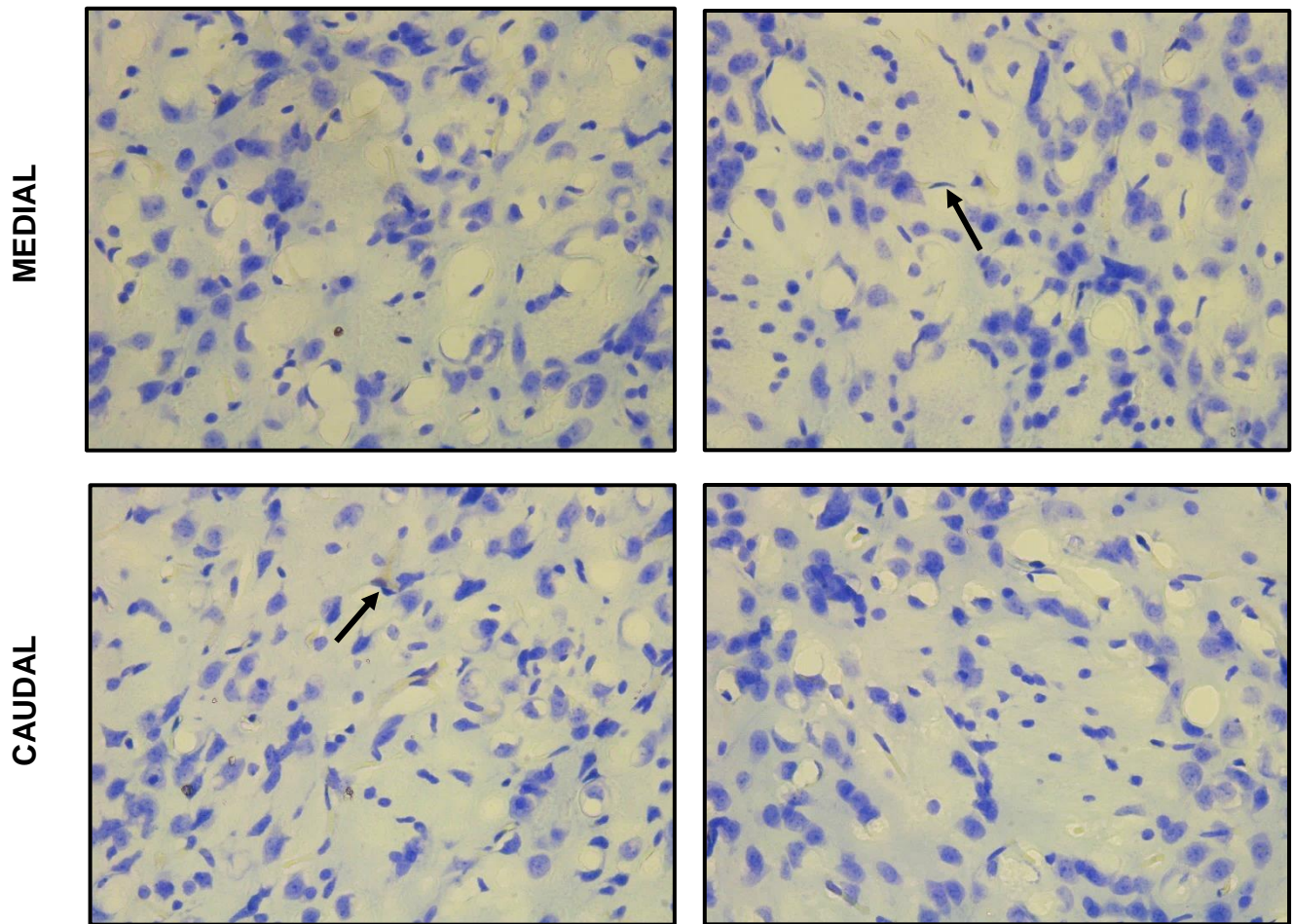


Figura 12. (A) Imágenes representativas de las ratas tratadas crónicamente durante 28 días con atomoxetina (ATX) en donde se observa el cuerpo estriado dorsal teñido con VC a un aumento de 40x correspondientes al hemisferio derecho (HD) y hemisferio izquierdo (HI). Con las flechas negras podemos observar indicios de daño celular debido al tratamiento con ATX. (B) Cuantificación del número de neuronas viables del grupo tratado con ATX y teñidas con VC en el hemisferio derecho (barra HD) y en el hemisferio izquierdo (barra HI), así como el promedio del conteo celular de ambos hemisferios (barra P). Las gráficas indican el número de neuronas viables en un área de $10.8 \mu\text{m}^2$. Los datos fueron el promedio \pm EE. ($n=5$).



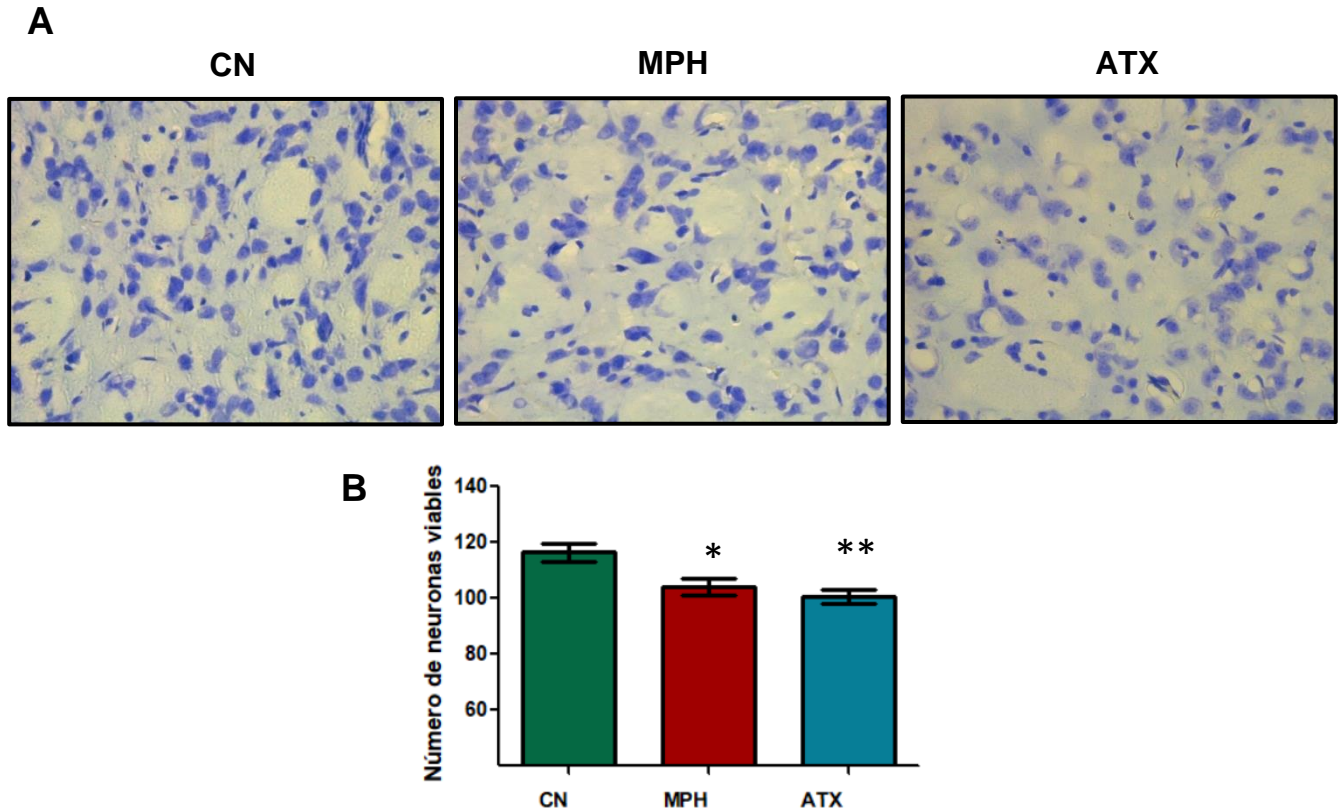


Figura 13. (A) Imágenes representativas de cada grupo tratado (CN, MPH y ATX). (B) Cuantificación del número de neuronas viables teñidas con VC de los distintos grupos, en donde se observa una disminución estadísticamente significativa en los grupos tratados durante 28 días con ATX y MPH en comparación con el grupo CN. Las gráficas indican el número de neuronas viables en un área de $10.8 \mu\text{m}^2$. Los datos fueron el promedio \pm EE. * $p < 0.05$ comparado contra el CN ($n=5$).

Posteriormente se procedió a realizar la comparación entre los grupos tratados, en donde se muestran las micrografías para cada tratamiento (**Figura 13 A**), así como la estadística de la cuantificación del número de neuronas viables (**Figura 13 B**). Al obtener los promedios para cada grupo tratado, se demostró que en los grupos tratados durante 28 días con MPH y ATX hubo una disminución estadísticamente significativa en el número de neuronas viables, comparado con el grupo CN.



VII.II CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LAS CÉLULAS INMUNORREACTIVAS A GFAP DEL CUERPO ESTRIADO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON MPH Y ATX



Figura 14. Imagen representativa de la inmunohistoquímica (IHC) contra GFAP en un corte coronal del cuerpo estriado dorsal de una rata control. Los 4 recuadros negros representan las áreas del cuerpo estriado en la zona dorsal seleccionadas para la toma de micrografías a 40x, en ambos hemisferios.

Para determinar si el tratamiento crónico con MPH o ATX causó cambios morfológicos en células (astrocitos) inmunorreactivas a la proteína GFAP del cuerpo estriado, realizamos un análisis con IHC empleando un anticuerpo dirigido contra la proteína GFAP en cada uno de los grupos experimentales. En la **Figura 14** se muestra una imagen representativa de la IHC realizada contra GFAP del cuerpo estriado dorsal de una rata CN, los recuadros representan las 4 áreas distribuidas en el cuerpo estriado seleccionadas para la toma de micrografías a 40x, tanto en el HD y el HI.

El análisis morfológico mostró que los astrocitos de los animales del grupo CN en el estriado dorsal fueron claramente inmunorreactivos a GFAP con procesos delgados y dispersos, así como cuerpos celulares pequeños y poca presencia de estos (**Figura 15 A**). Al realizar la cuantificación en la **Figura 15 B** se observó que en ambos hemisferios se cuantificó una cantidad similar de astrocitos, en la última barra (P) se representa el promedio del número de astrocitos entre los HI y HD.



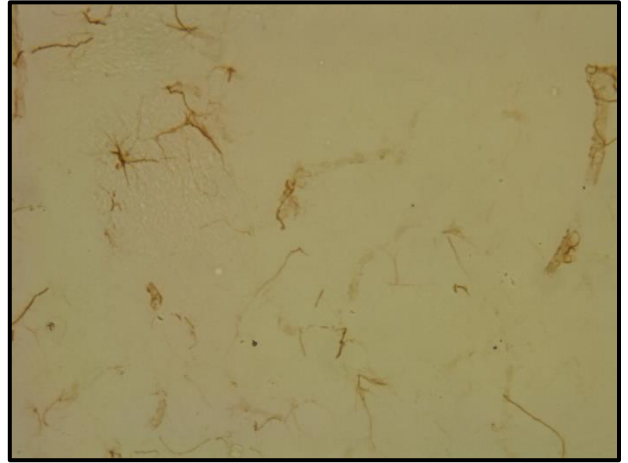
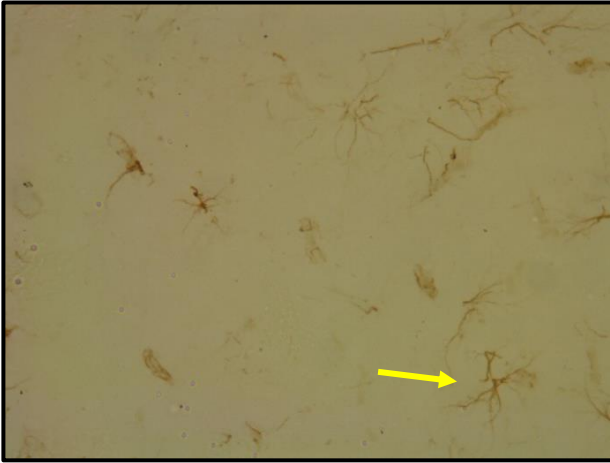
GRUPO CONTROL

A

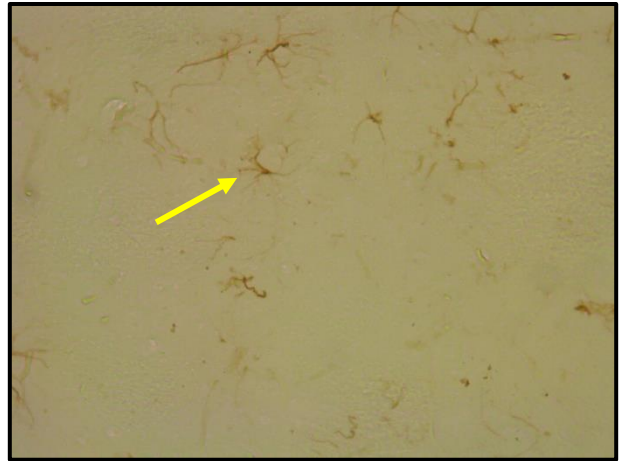
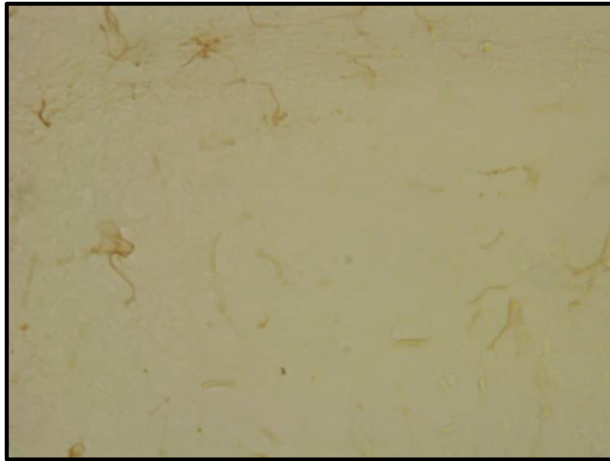
HD

HI

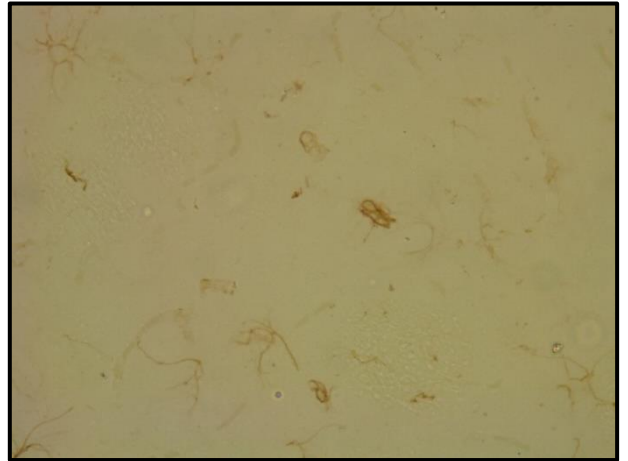
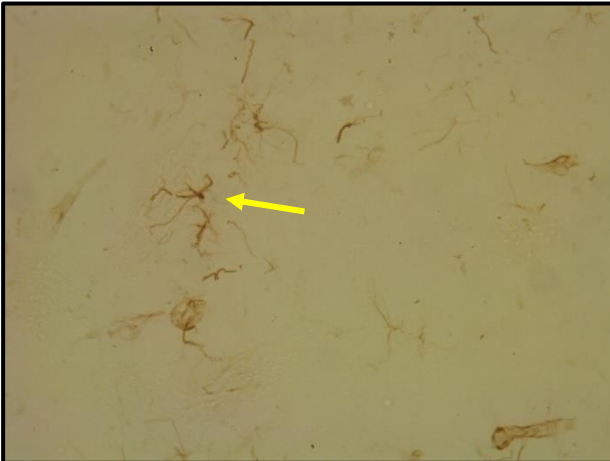
ROSTRAL



MEDIAL



CAUDAL



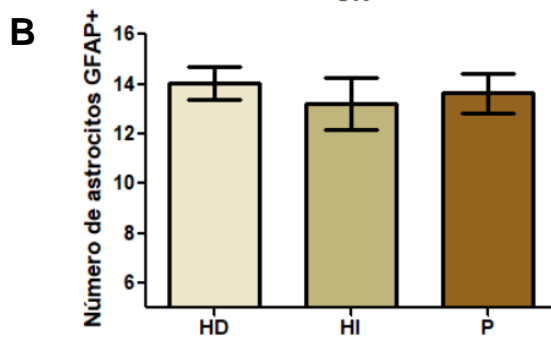
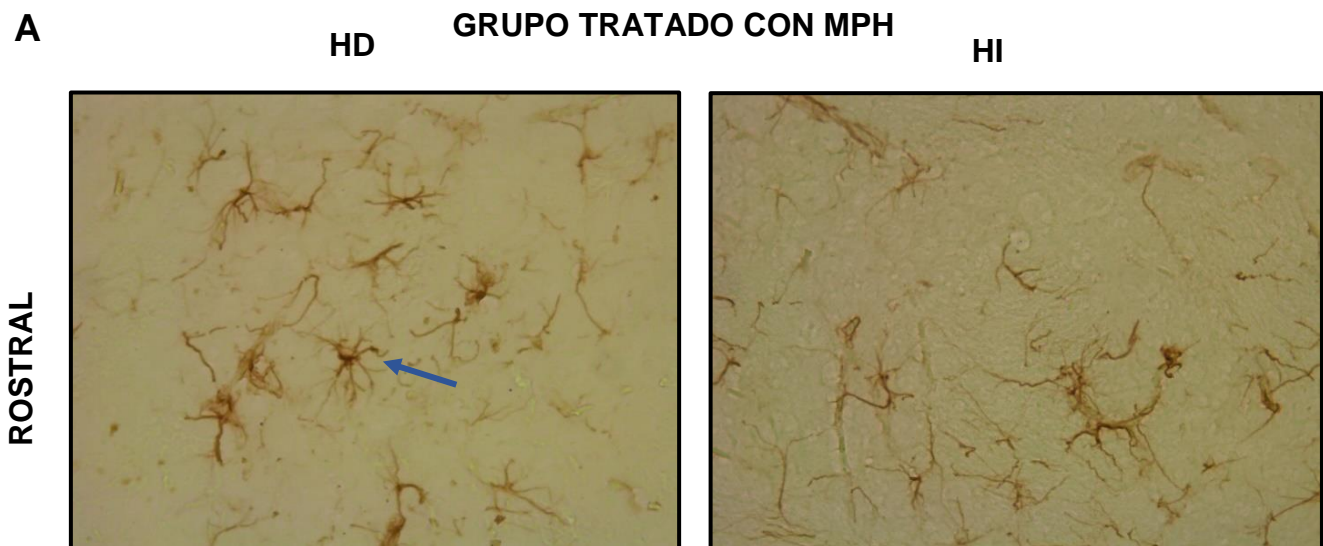


Figura 15. (A) Imágenes representativas de la IHC contra GFAP en el cuerpo estriado a un aumento de 40x correspondientes al HD y del HI, con las flechas amarillas se puede observar claramente los astrocitos inmunorreactivos a GFAP (B) cuantificación del número de astrocitos GFAP+ se realizó en el cuerpo estriado dorsal en el hemisferio derecho (barra HD) e izquierdo (barra HI), así como el promedio del número de astrocitos de ambos hemisferios (barra P). En las gráficas se expresó el número de astrocitos GFAP+ en un área de $10.8 \mu\text{m}^2$. Los datos fueron el promedio \pm EE. ($n=5$).

El análisis de las alteraciones morfológicas de los astrocitos debido al tratamiento crónico con MPH (10 mg/kg) durante 28 días por vía intraperitoneal en el estriado dorsal de la rata mostraron células inmunorreactivas a GFAP, la cuales mostraron un fenotipo reactivo en donde se pueden observar procesos más gruesos, cuerpos celulares agrandados y más abundantes (**Figura 16 A**). Los datos cuantitativos de astrocitos inmunorreactivos a GFAP se muestran en la (**Figura 16 B**). En ambos hemisferios se cuantificó una cantidad similar y en la última barra (P) se representa el promedio del número de astrocitos GFAP+ de los HI y HD.



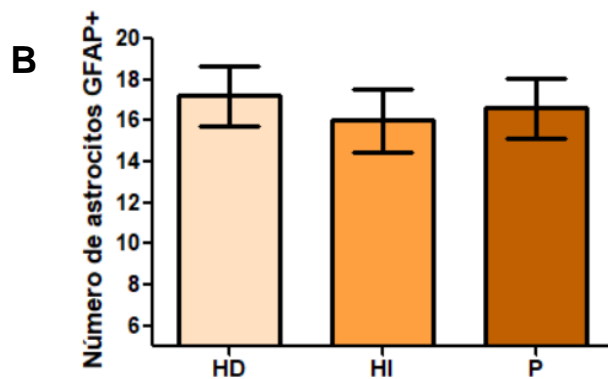
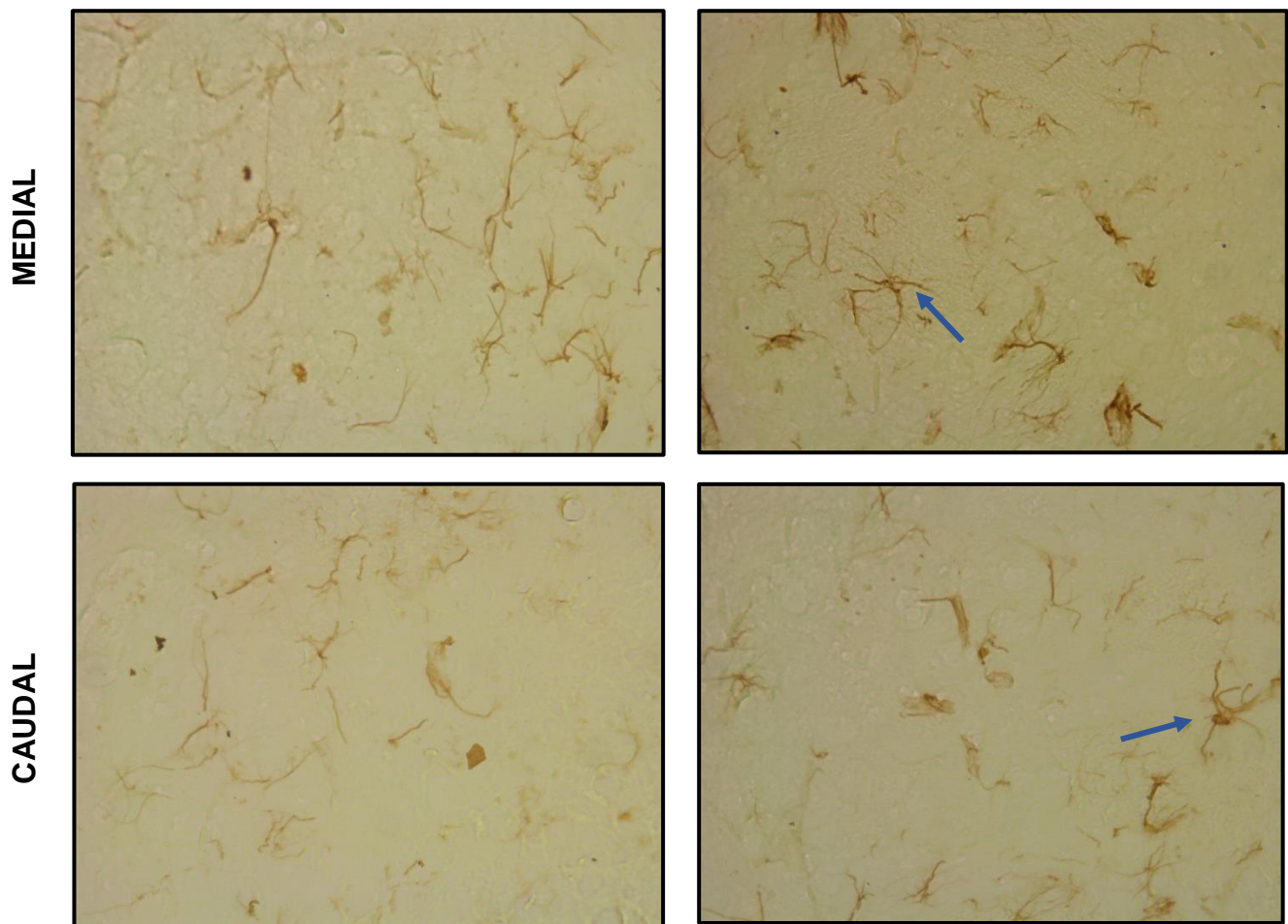
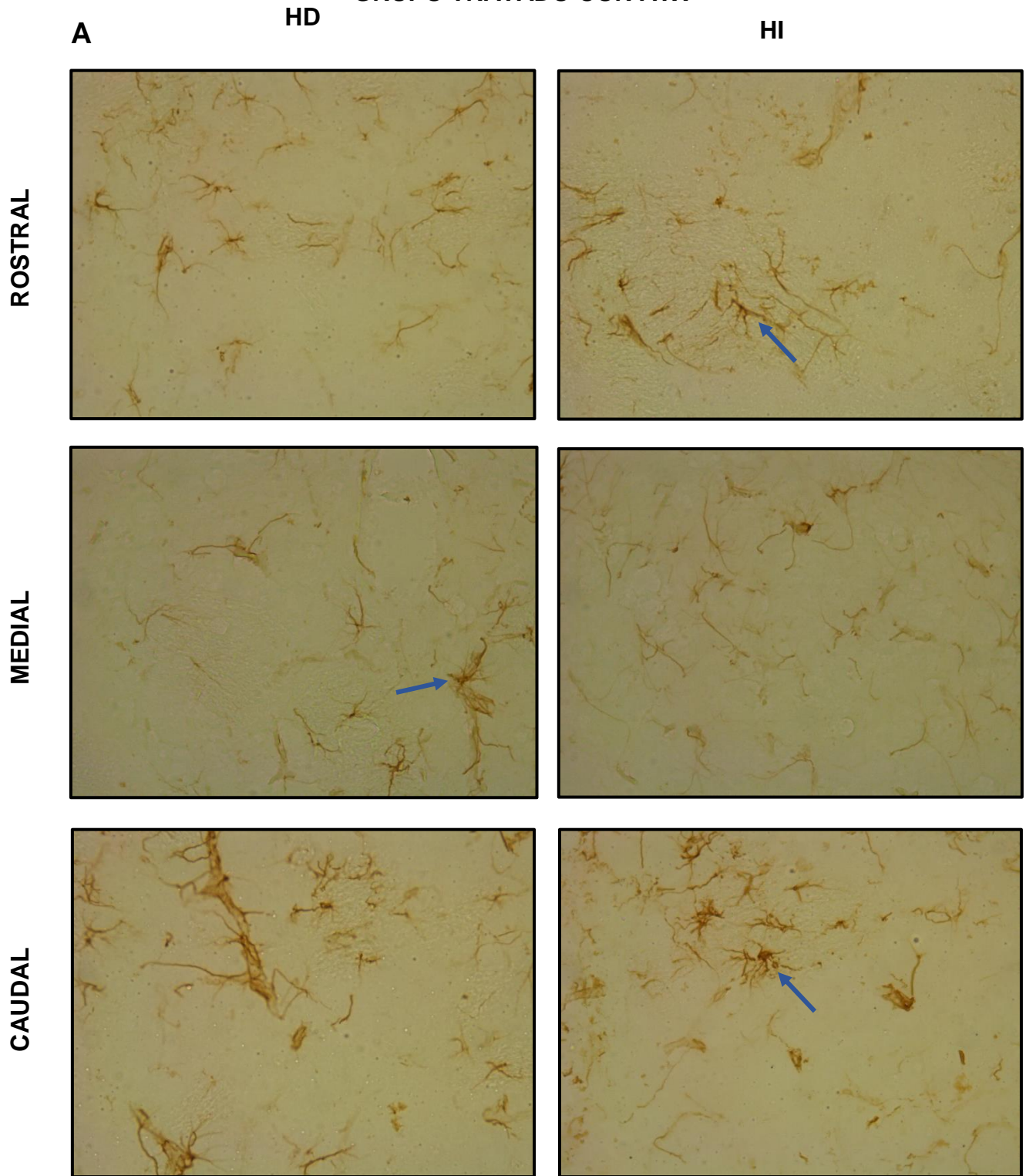


Figura 16. (A) Efecto del tratamiento crónico con MPH e IHC en el cuerpo estriado. Imágenes representativas de la IHC contra GFAP en el cuerpo estriado a un aumento de 40x correspondientes al HD y del HI. Con las flechas azules podemos observar claramente los astrocitos inmunorreactivos a GFAP con una mayor activación de astrocitos (B) La cuantificación del número de astrocitos GFAP+ se realizó en las regiones antes mencionadas de ambos hemisferios del cuerpo estriado., así como el promedio del número de astrocitos de ambos hemisferios (barra P). En las gráficas se expresó el número de astrocitos GFAP+ en un área de $10.8 \mu\text{m}^2$. Los datos fueron el promedio \pm EE. (n=5).



GRUPO TRATADO CON ATX



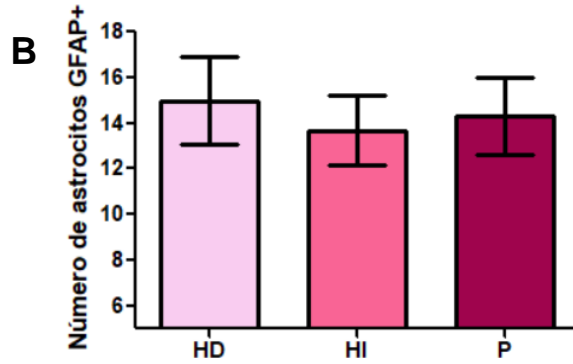


Figura 17. (A) Efecto del tratamiento crónico con ATX e IHC en el cuerpo estriado. Imágenes representativas de la IHC contra GFAP en el cuerpo estriado a un aumento de 40x correspondientes al HD y del HI. Con las flechas azules podemos observar claramente los astrocitos inmunorreactivos a GFAP con una mayor activación de astrocitos (B). La cuantificación del número de astrocitos GFAP+ se realizó en las regiones antes mencionadas de ambos hemisferios del cuerpo estriado., así como el promedio del número de astrocitos de ambos hemisferios (barra P). En las gráficas se expresó el número de astrocitos GFAP+ en un área de $10.8 \mu\text{m}^2$. Los datos fueron el promedio \pm EE. (n=5).

El análisis de las alteraciones morfológicas de astrocitos debido al tratamiento crónico con ATX (3 mg/kg) durante 28 días intraperitonealmente, mostraron células inmunorreactivas a GFAP, la cuales revelaron un fenotipo reactivo en donde se pueden observar procesos más gruesos y cuerpos celulares agrandados (**Figura 17 A**). Los datos cuantitativos de astrocitos inmunorreactivos a GFAP se muestran en la (**Figura 17 B**). En ambos hemisferios se cuantificó una cantidad similar y en la última barra (P) se representa el promedio del número de astrocitos entre los HI y HD.



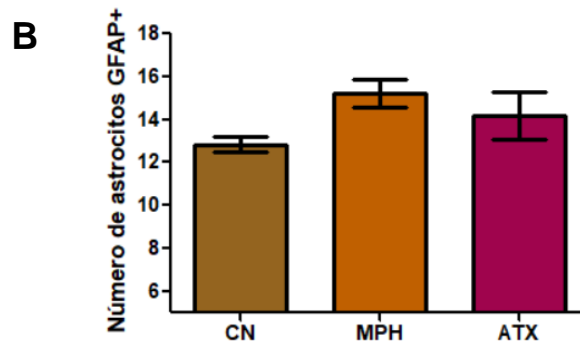
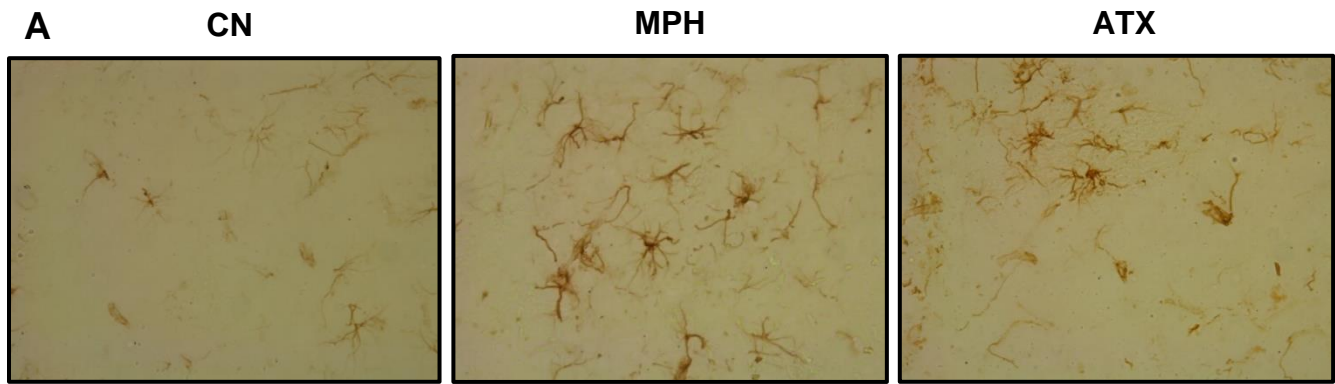


Figura 18. (A) Imágenes representativas de cortes coronales del cuerpo estriado dorsal de cada grupo (CN, MPH y ATX). B) Cuantificación del número de astrocitos inmunorreactivos a GFAP de los distintos grupos, en donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados crónicamente con ATX y MPH en comparación con el grupo CN. En las gráficas se muestra el número de astrocitos GFAP+ en un área de $10.8 \mu\text{m}^2$. Los datos fueron el promedio \pm EE. ($n=5$).

Los datos cuantitativos de los astrocitos inmunorreactivos a GFAP demostraron que en el estriado los astrocitos inmunorreactivos a GFAP en los diferentes grupos tratados durante 28 días con ATX y MPH en comparación con el grupo CN no presentaron diferencias estadísticamente significativas (**Figura 18**). A pesar de mostrar una tendencia a incrementar el número de astrocitos inmunorreactivos a GFAP con los tratamientos crónicos del MPH y la ATX.



VIII. DISCUSIÓN

Los medicamentos utilizados en el tratamiento del TDAH se prescriben durante largos periodos de tiempo (Wang, et al, 2016), a pesar de ello, se ha concluido que el uso crónico (1 año o más) de MPH es seguro respecto a los posibles efectos neuropsiquiátricos que pueda provocar, sin embargo, se ha recomendado un cuidadoso control por parte de los especialistas en personas que también experimentan tics o adolescentes con riesgo de abuso de sustancias por la naturaleza psicoestimulante del medicamento (Krinziger H, et al, 2019), tampoco se han encontrado afectaciones significativas en el desarrollo y el crecimiento después de un seguimiento de 2 años en el uso de MPH (Man K, et al, 2023). En el caso de la ATX también se ha demostrado que su uso a largo plazo (2 años) presenta eventos adversos clínicamente menores, siendo tolerable y eficaz (Kratochvil CJ, et al, 2006), no obstante, se ha especulado que estos fármacos pueden tener efectos adicionales en el cerebro.

El mecanismo de acción del MPH es a través del bloqueo DAT y NET en menor medida (Volkow ND, et al, 1999), incrementando así sus niveles posinápticos (Kuczenski R & Segal DS, 1997). El mecanismo de acción de la ATX es debido al bloqueo de NET lo que incrementa sus niveles extracelulares (Bymaster, et al, 2002). En este sentido, la DA y NE extracelulares pueden tener efectos neurotóxicos debido a su rápida autooxidación, dando lugar a productos tóxicos como semiquinonas, quinonas y ROS que tienen efectos neurotóxicos (Umek N, et al, 2018; Baez S, et al, 1994; Shachar D, et al, 1995) debido a que estas moléculas son altamente reactivas y pueden reaccionar con componentes celulares alterando su funcionalidad (Meiser J, et al, 2013). Por ejemplo, las o-quinonas se pueden conjugar con el grupo sulfhidrilo de la cisteína y alterar la función de las proteínas, también puede formar aductos con diversas proteínas, los productos de oxidación de la DA están directamente asociados con disfunción mitocondrial, degradación de proteínas, y estrés oxidativo (Zhang S, et al, 2019), este último podría estar participando como un factor que contribuye a la fisiopatología del TDAH (Lopresti AL, 2015; Joseph N, et al, 2015; Corona JC, 2020) y posiblemente, debido a su mecanismo de acción, los medicamentos (MPH y ATX) pueden incrementar el estrés oxidativo dando lugar al daño neuronal y la alteración de otros procesos como la neuroinflamación.



El cuerpo estriado es una región crucial en la fisiopatología del TDAH, previamente se demostró que en pacientes con TDAH hay anomalías estructurales y funcionales de los núcleos del estriado (Hoogmann, et al, 2017), así como disminución de la materia gris en el globo pálido, lo que se correlaciona con la gravedad del TDAH (Agoalikum E, et al, 2023). Además, como se comentó previamente, se ha observado una desregulación de la conectividad funcional en el cuerpo estriado ventral en pacientes con TDAH (Musella C. & Weyandt L, 2022) y una disfunción en la conectividad interregional entre el estriado y estructuras corticales (Posner J, et al, 2014). Por consiguiente, anomalías de los ganglios basales pueden estar asociados con el desequilibrio catecolaminérgico en el TDAH (Frodl, 2010), el cual, puede verse favorecido por el estrés oxidativo generado por el tratamiento con MPH y ATX, por ello, en el presente trabajo demostramos el daño neuronal y la neuroinflamación en el cuerpo estriado dorsal de la rata debido al tratamiento crónico con MPH y ATX.

Para determinar el daño neuronal se empleó la tinción con VC, la cual, se utiliza ampliamente para estudiar la morfología neuronal debido a su bajo costo, rapidez y su alta correlación en el conteo de neuronas respecto a otros métodos de cuantificación (Zhu Y, et al, 2015), esta tinción emplea un colorante básico como el VC, que se une a los ácidos nucleicos (Scott y Willett, 1966), los cuales se encuentran en el núcleo, retículo endoplásmico rugoso y los ribosomas presentes en el citoplasma, de manera que estos componentes celulares se tiñen de color violeta. La tinción con VC no es específica ya que tiñe a todas las células del tejido nervioso incluyendo a las células gliales (Hamidi M, et al, 2004). Por ello, se realizó una identificación únicamente de las neuronas como se demuestra en la **Figura 10 A**. Se contabilizó como neuronas viables a las células más grandes con citoplasma visible alrededor del núcleo, un solo nucléolo y gránulos de cromatina (inclusiones de ARN), se diferenciaron de otras células de la glía ya que en general estas son más pequeñas, no presentan nucléolo, se tiñen de un color más intenso y pueden ser irregulares (García CM, et al, 2016).

Así, el tratamiento crónico con MPH (10 mg/kg) en la rata por vía i.p. durante 28 días produjo una pérdida de neuronas en el estriado dorsal, la cual fue estadísticamente significativa en comparación con el grupo control (**Figura 13**), los datos acerca del daño neuronal provocado por el MPH han sido discutidos en diversos estudios; por ejemplo, la dosis de 5 mg/kg de MPH



administrada 2 veces al día crónicamente en ratas jóvenes disminuyó en un 21% las fibras dopaminérgicas en el cuerpo estriado (Gray JD, et al, 2007), de igual manera, se demostró que el uso crónico con una dosis de 10 mg/kg de MPH en ratones jóvenes disminuyó en un 20% el número de neuronas en la sustancia nigra, indicando que hubo una pérdida neuronal en ganglios basales, lo que podría ser atribuida a la oxidación de dopamina (Sadasivan S, et al, 2012), de hecho, se ha propuesto que la muerte neuronal observada puede deberse en respuesta al daño a diferentes componentes celulares, por ejemplo, se ha demostrado que el tratamiento crónico con MPH en ratas jóvenes provoca la peroxidación de lípidos y carbonilación de proteínas en el cuerpo estriado, corteza prefrontal e hipocampo (Martins MR, et al, 2006), así como una disminución en la actividad de algunas enzimas antioxidantes como GPx (Motaghinejad, M, et al, 2017) y alteraciones en la función mitocondrial, tales como la disminución de la actividad del complejo I, II, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, debido principalmente al estrés oxidativo, el cual puede llevar a la neurodegeneración (Fagundes AO, et al, 2010). En el caso de la ATX, se observó que el tratamiento crónico con una dosis de 3 mg/kg en la rata durante 28 días, también produjo una pérdida de neuronas en el estriado dorsal, la cual fue estadísticamente significativa en comparación con el grupo CN (**Figura 18**). Un estudio previo *in vitro*, encontró que dosis altas de ATX (10, 20 y 50 μ m) en células similares a neuronas provocaron la muerte celular después de generar estrés oxidativo (incremento de ROS citoplasmáticas y mitocondriales) y alteraciones mitocondriales (disminución del potencial y masa mitocondrial) (Corona JC, et al, 2019). Además, empleando la tinción con VC en el cerebro de rata, también se ha reportado la neurodegeneración en hipocampo y cerebelo con ATX y MPH (Altunkaynak BZ, et al, 2016). Los datos anteriores, concuerdan con nuestros datos, indicando que el daño neuronal estriatal observado debido al tratamiento crónico con MPH y ATX en la rata joven parece estar asociado con el daño a diferentes componentes celulares.

Además del estrés oxidativo, la neuroinflamación es otro de los procesos que se activan en respuesta al daño (Shabab T, et al, 2017), por ello, fue de nuestro interés observar si este proceso tenía alguna correlación con nuestras observaciones anteriores. Diversos estudios han sugerido que la neuroinflamación ha surgido como un posible factor de la fisiopatología de TDAH (Vázquez GD et al 2023; Álvarez AL, et al, 2020; Instanes JT, et al, 2017, Corona JC,



2020; Dunn GA, et al, 2019) y que posiblemente los medicamentos utilizados para el tratamiento del TDAH podrían estar participando en la neuroinflamación o incrementándola.

Por lo tanto, nosotros investigamos los efectos del tratamiento crónico con MPH y ATX en la rata sobre la neuroinflamación en el estriado, debido a que es un proceso íntimamente relacionado con el estrés oxidativo y la neurodegeneración por la pérdida focal de neuronas y la aparición de gliosis reactiva (Przedborski S, et al, 2003). Cuando hay daño neuronal, se desencadena la neuroinflamación, que inicia una respuesta tisular por parte de las células inmunitarias del SNC (principalmente microglía y astrocitos) los cuales van a mediar la respuesta inflamatoria a través de la secreción de diversas citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF α), quimiocinas (CCL2, CCL5, CXCL1), mensajeros secundarios (NO y prostaglandinas) y ROS (Di Sabato, et al, 2016; Simpson DSA & Oliver PL, 2020). Un indicador de la neuroinflamación es la activación de los astrocitos, los cuales experimentan cambios morfológicos, moleculares y funcionales en respuesta a una lesión, a un daño, en enfermedades o infecciones del SNC y como consecuencia la proliferación de los astrocitos se ve incrementada. Un marcador clásico de astrocitos es la proteína ácida fibrilar glial o GFAP, la cual es una proteína de los filamentos intermedios de los astrocitos. Un incremento en la expresión de esta es un indicador de la proliferación astrocítica (Escartin C, et al, 2021; Wilhelmsson U, et al, 2006), por lo tanto, la regulación al alza de GFAP es una característica de astrocitos reactivos y un indicador de neuroinflamación.

El tratamiento crónico con MPH (10 mg/kg) y ATX (3 mg/kg) en la rata durante 28 días, incremento el número de astrocitos reactivos en el estriado dorsal. Sin embargo, tal incremento en promedio no fue estadísticamente significativo en comparación con el grupo control (**Figura 18**). Estos resultados estarían indicando que el tratamiento crónico con MPH y ATX a pesar de estar generando daño neuronal estaría provocando solo un leve incremento en la neuroinflamación en el cuerpo estriado de la rata adolescente. Se ha reportado que el tratamiento con una dosis de 10 mg/kg de MPH administrada en ratas Wistar de 8 semanas de forma aguda incrementó la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β y TNF α en hipocampo de rata, además de que mostraron un incremento en los parámetros oxidativos (peroxidación lipídica y contenido de GSSG, así como una disminución de enzimas antioxidantes como SOD, GR y GPx (Motaghinejad, et al, 2017), también se ha demostrado



que el tratamiento con MPH induce la activación de los astrocitos en co-cultivos de neuronas, sin embargo, esta activación se ha visto que es reversible (Suzuki T, et al, 2007; Narita M, et al, 2009). Otro estudio realizado con un tratamiento por 90 días en ratones jóvenes con dosis de 1 y 10 mg/kg de MPH, que abarca el rango terapéutico, encontró que la dosis de 10 mg/kg incremento los niveles de ARNm de genes proinflamatorias (*il-6* y *tnf- α*) y redujo en un 20% las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra (Sadasivan F, et al, 2012), incluso, la dosis oral de 60 mg/kg administrada por 3 meses en ratas jóvenes desencadenó la activación microglial en ganglios basales, tálamo, hipocampo y corteza, lo cual sugiere que el MPH desencadena procesos inflamatorios y posiblemente neurodegenerativos (Carias E, et al, 2018).

Los estudios sobre el tratamiento con ATX sobre la neuroinflamación son limitados. Sin embargo se ha demostrado que la NE provoca que el fenotipo de la microglía cambie y libere citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β y TNF α , lo que sugiere que provoca neuroinflamación (Cao S, et al, 2019), ya que se ha demostrado que la NE actúa sobre diferentes tipos de células (microglía) a través de receptores adrenérgicos pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G, y estos receptores tienen diferentes perfiles de expresión en diferentes células (Mori K, et al, 2002), la cantidad de receptores adrenérgicos expresada por la microglía es mayor que la de cualquier otra célula del cerebro (Merican D & Heneka MT, 2019). Por otro lado, hay estudios que han demostrado que el tratamiento agudo con ATX tiene efectos antiinflamatorios, debido a la reducción en la expresión de IL1 β , TNF α e iNOS así como los marcadores de activación microglial después del tratamiento sistémico con lipopolisacárido (LPS) en la corteza cerebral de la rata (O'Sullivan, et al, 2009). Por tal motivo se necesita ampliar la investigación sobre los efectos crónicos del tratamiento crónico con la ATX en el cerebro, con relación al proceso de neuroinflamación.

Debido a que se ha demostrado que el MPH y la ATX tienen efectos neuroinflamatorios, tales como la activación microglial y la liberación de factores proinflamatorios, en nuestros resultados el efecto del MPH y la ATX sobre la activación de astrocitos no fue significativo a pesar de haber tenido una tendencia al incremento de astrocitos reactivos; esto puede atribuirse a que la población de astrocitos en las diferentes regiones cerebrales varía de manera considerable (Ero C, et al, 2018) y, en el cuerpo estriado, GFAP se considera un



marcador pobre de astrocitos, ya que se ha encontrado que en ratones hay una baja expresión de GFAP a diferencia de la expresión observada en otras regiones cerebrales como el hipocampo (Chai, et al, 2017), por tal motivo, la utilización de otros marcadores como S100 β o μ -crystallin podrían mostrar un mejor efecto, debido a que estas proteínas si se expresan en la mayoría de los astrocitos estriatales (Khakh BS, 2019).

Finalmente, los procesos que desencadenarían el tratamiento crónico tanto del MPH y la ATX en la rata pueden darse de manera consecutiva, ya que el tratamiento con dichos fármacos puede generar un exceso de catecolaminas libres (dopamina y norepinefrina), lo cual podría generar la autooxidación y el subsecuente daño oxidativo producido por las ROS. El estrés oxidativo a su vez puede producir daño neuronal y tener efectos en el proceso de neuroinflamación. Sin embargo, aun hacen falta más estudios con distintas dosis tanto de MPH y la ATX sobre el proceso de muerte neuronal, sobre estrés oxidativo y sobre la neuroinflamación en el estriado o en otras regiones cerebrales implicadas en el TDAH. Tales estudios exhaustivos nos podrán ayudar a verificar los efectos de diferentes dosis de dichos fármacos y poder confirmar dichos hallazgos, para así explorar más a fondo los distintos mecanismos subyacentes.



IX. CONCLUSIONES

En conclusión, nuestros hallazgos demostraron que el tratamiento crónico con metilfenidato y atomoxetina en la rata adolescente produjo daño en el cuerpo estriado, y que dicho tratamiento tanto con metilfenidato o con atomoxetina no indujo un incremento significativo en el número de astrocitos reactivos en el estriado, a pesar de haber observado una tendencia a incrementar. Finalmente, el tratamiento crónico con los medicamentos utilizados actualmente para el tratamiento del TDAH (metilfenidato y atomoxetina), estarían produciendo efectos dañinos en el cerebro de la rata, más allá de la inhibición de los transportadores de dopamina y norepinefrina respectivamente.



X.PERSPECTIVAS

Es necesario plantear otras estrategias experimentales para poder profundizar y conocer más detalladamente los efectos del tratamiento crónico tanto con MPH y ATX, también sería interesante realizar el análisis de otras regiones cerebrales implicadas en el TDAH, incluso el uso de distintas dosis tanto de MPH y de ATX. Además, los resultados obtenidos nos sugieren que el daño neuronal observado en el cuerpo estriado de la rata puede deberse a la alteración de distintos procesos esenciales como lo son el estrés oxidativo, la función mitocondrial o la autofagia, los cuales serían de gran utilidad investigar para poder conocer los posibles mecanismos subyacentes de los distintos tratamientos farmacológicos utilizados comúnmente para el TDAH.



XI. REFERENCIAS.

- Adwas AA, Elsayed ASI, Azab AE, et al. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *J Appl Biotechnol Bioeng*. 2019;6(1):43–47.
- Agoalikum E, Klugah-Brown B, Wu H, Hu P, Jing J, Biswal B. Structural differences among children, adolescents, and adults with attention-deficit/hyperactivity disorder and abnormal Granger causality of the right pallidum and whole-brain. *Front Hum Neurosci*. 2023 Feb 14;17:1076873.
- Altunkaynak, B.Z. *et al.* (2016). Effects of Methylphenidate and Atomoxetine on Development of the Brain. In: López-Muñoz, F., Srinivasan, V., de Berardis, D., Álamo, C., Kato, T. (eds) *Melatonin, Neuroprotective Agents and Antidepressant Therapy*. Springer, New Delhi
- Alvarez-Arellano L, González-García N, Salazar-García M, Corona JC. Antioxidants as a Potential Target against Inflammation and Oxidative Stress in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Feb 21;9(2):176.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). (2002). *DSM-IV-TR: Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (5ª edición)*
- Anand D, Colpo GD, Zeni G, Zeni CP, Teixeira AL. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder And Inflammation: What Does Current Knowledge Tell Us? A Systematic Review. *Front Psychiatry*. 2017 Nov 9;8:228./fpsyt.2017.00228.
- Anand KS, Dhikav V. Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol*. 2012 Oct;15(4):239-46.
- Andreatza, A.C.; Frey, B.N.; Valvassori, S.S.; Zanotto, C.; Gomes, K.M.; Comim, C.M.; Cassini, C.; Stertz, L.; Ribeiro, L.C.; Quevedo, J.; et al. DNA damage in rats after treatment with methylphenidate. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2007, 31, 1282–1288.
- Arnsten AF, Pliszka SR. Catecholamine influences on prefrontal cortical function: relevance to treatment of attention deficit/hyperactivity disorder and related disorders. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011 Aug;99(2):211-6.
- Avcil, S.; Uysal, P.; Yenisey, C.; Abas, B.I. Elevated Melatonin Levels in Children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Relationship to Oxidative and Nitrosative Stress. *J. Atten. Dis.* 2019.
- Baez, S., Linderson, Y., & Segura-Aguilar, J. (1994). Superoxide dismutase and catalase prevent the formation of reactive oxygen species during reduction of cyclized dopa ortho-quinone by DT-diaphorase. *Chemico-Biological Interactions*, 93(2), 103–116.
- Báez-Mendoza R, Schultz W. The role of the striatum in social behavior. *Front Neurosci*. 2013 Dec 10;7:233.
- Biederman J, Faraone SV, Monuteaux MC, Bober M, Cadogan E. Gender effects on attention-deficit/hyperactivity disorder in adults, revisited. *Biol Psychiatry*. 2004 Apr 1;55(7):692-700
- Biederman J. Impact of comorbidity in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry*. 2004;65
- Bush G. Attention-deficit/hyperactivity disorder and attention networks. *Neuropsychopharmacology*. 2010 Jan;35(1):278-300.



- Bymaster, F. (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.
- Callahan, P. M., Plagenhoef, M. R., Blake, D. T., & Terry, A. V., Jr. (2019). Atomoxetine improves memory and other components of executive function in young-adult rats and aged rhesus monkeys. *Neuropharmacology*, 155, 65–75.
- Cao S, Fisher DW, Yu T, Dong H. The link between chronic pain and Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2019 Nov 6;16(1):204.
- Carias E, Hamilton J, Robison LS, Delis F, Eiden R, Quattrin T, et al. Chronic oral methylphenidate treatment increases microglial activation in rats. *J Neural Transm (Vienna)*. 1209, 2018;125(12):1867–75.
- Carias, E., Fricke, D., Vijayashanthar, A., Smith, L., Somanesan, R., Martin, C., Kalinowski, L., Popoola, D., Hadjiargyrou, M., Komatsu, D. E., & Thanos, P. K. (2019). Weekday-only chronic oral methylphenidate self-administration in male rats: Reversibility of the behavioral and physiological effects. *Behavioural Brain Research*, 356, 189–196.
- Cernackova A, Durackova Z, Trebaticka J, Mravec B. Neuroinflammation and depressive disorder: The role of the hypothalamus. *J Clin Neurosci*. 2020 May;75:5-10.
- Ceylan M, Sener S, Bayraktar AC, Kavutcu M. Oxidative imbalance in child and adolescent patients with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010 Dec 1;34(8):1491-4.
- Chai H, Diaz-Castro B, Shigetomi E, Monte E, Oceau JC, Yu X, Cohn W, Rajendran PS, Vondriska TM, Whitelegge JP, Coppola G, Khakh BS. Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. *Neuron*. 2017 Aug 2;95(3):531-549.e9. doi: 10.1016/j.neuron.2017.06.029. Epub 2017 Jul 14. PMID: 28712653; PMCID: PMC5811312.
- Chen W, Zhou K, Sham P, Franke B, Kuntsi J, Campbell D..., Asherson P. DSM-IV combined type ADHD shows familial association with sibling trait scores: a sampling strategy for QTL linkage. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2008 Dec 5;147B(8):1450-60.
- Chovanova, Z.; Muchova, J.; Sivonova, M.; Dvorakova, M.; Zitnanova, I.; Waczulikova, I.; Trebaticka, J.; Skodacek, I.; Durackova, Z. Effect of polyphenolic extract, Pycnogenol, on the level of 8-oxoguanine in children suffering from attention deficit/hyperactivity disorder. *Free Radic. Res*. 2006, 40, 1003–1010
- Claussen AH, Holbrook JR, Hutchins HJ, Robinson LR, Bloomfield J, Meng L, Bitsko RH, O'Masta B, Cerles A, Maher B, Rush M, Kaminski JW. All in the Family? A Systematic Review and Meta-analysis of Parenting and Family Environment as Risk Factors for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) in Children. *Prev Sci*. 2022 Apr 19:1–23. .
- Comim, C.M.; Gomes, K.M.; Reus, G.Z.; Petronilho, F.; Ferreira, G.K.; Streck, E.L.; Dal-Pizzol, F.; Quevedo, J. Methylphenidate treatment causes oxidative stress and alters energetic metabolism in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder. *Acta Neuropsychiatr*. 2014, 26, 96–103.



- Corona JC, Carreón-Trujillo S, González-Pérez R, Gómez-Bautista D, Vázquez-González D, Salazar-García M. Atomoxetine produces oxidative stress and alters mitochondrial function in human neuron-like cells. *Sci Rep.* 2019 Sep 10;9(1):13011.
- Corona JC. Role of Oxidative Stress and Neuroinflammation in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Antioxidants (Basel).* 2020 Oct 23;9(11):1039.
- Corona, JC, Duchen, MR Impaired mitochondrial homeostasis and neurodegeneration: towards new therapeutic targets?. *J Bioenerg Biomembr* 47 , 89–99
- Darwish AH, Elgohary TM, Nosair NA. Serum Interleukin-6 Level in Children With Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). *J Child Neurol.* 2019 Feb;34(2):61-67.
- Del Campo N, Chamberlain SR, Sahakian BJ, Robbins TW. The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry.* 2011 Jun 15;69(12):e145-57.
- Demontis D, Walters RK, Martin J, Mattheisen M..., Neale BM. Discovery of the first genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder. *Nat Genet.* 2019 Jan;51(1):63-75.
- Dong, Y., & Benveniste, E. N. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia*, 36(2), 180–190. doi:10.1002/glia.1107
- Drtilkova I, Sery O, Theiner P, Uhrova A, Zackova M, Balastikova B, Znojil V. Clinical and molecular-genetic markers of ADHD in children. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008 Jun;29(3):320-7.
- Dunn GA, Nigg JT, Sullivan EL. Neuroinflammation as a risk factor for attention deficit hyperactivity disorder. *Pharmacol Biochem Behav.* 2019 Jul;182:22-34
- Dutt, M.; Dharavath, R.N.; Kaur, T.; Chopra, K.; Sharma, S. Differential effects of alprazolam against methylphenidate-induced neurobehavioral alterations. *Physiol. Behav.* 2020, 222, 112935.
- Eng, L. F., & Ghirnikar, R. S. (1994). GFAP and Astrogliosis. *Brain Pathology*, 4(3), 229–237.
- Erö, C., Gewaltig, M.-O., Keller, D., & Markram, H. (2018). A cell atlas for the mouse brain. *Frontiers in Neuroinformatics*, 12.
- Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, ... Sofroniew MV, Verkhratsky A. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci.* 2021 Mar;24(3):312-325.
- F. Sadasivan S, Pond BB, Pani AK, Qu C, Jiao Y, Smeyne RJ. Methylphenidate exposure induces dopamine neuron loss and activation of microglia in the basal ganglia of mice. *PLoS One.* 2012;7(3):e33693
- Fagundes AO, Scaini G, Santos PM, Sachet MU, Bernhardt NM, Rezin GT, Valvassori SS, Schuck PF, Quevedo J, Streck EL. Inhibition of mitochondrial respiratory chain in the brain of adult rats after acute and chronic administration of methylphenidate. *Neurochem Res.* 2010 Mar;35(3):405-11.
- Faraone SV, Banaschewski T, Coghill D, ... Wang Y. The World Federation of ADHD International Consensus Statement: 208 Evidence-based conclusions about the disorder. *Neurosci Biobehav Rev.* 2021 Sep;128:789-818.
- Faraone SV, Biederman J. Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry.* 1998 Nov 15;44(10):951-8.



- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, Sklar P. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2005 Jun 1;57(11):1313-23
- Faraone SV. Using Meta-analysis to Compare the Efficacy of Medications for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Youths. *P T*. 2009 Dec;34(12):678-94
- Faraone, SV, Larsson, H. Genética del trastorno por déficit de atención con hiperactividad. *Mol Psychiatry* **24**, 562–575 (2019).
- Frodl T, Skokauskas N. Meta-analysis of structural MRI studies in children and adults with attention deficit hyperactivity disorder indicates treatment effects. *Acta Psychiatr Scand*. 2012 Feb;125(2):114-26.
- Frodl T, Stauber J, Schaaff N, Koutsouleris N, Scheuerecker J, Ewers M, Omerovic M, Opgen-Rhein M, Hampel H, Reiser M, Möller HJ, Meisenzahl E. Amygdala reduction in patients with ADHD compared with major depression and healthy volunteers. *Acta Psychiatr Scand*. 2010 Feb;121(2):111-8.
- Fu Z, Yuan J, Pei X, Zhang K, Xu C, Hu N, Xie R, Zhao Y, Wang Y, Yang L, Cao Q. Shared and Unique Effects of Long-Term Administration of Methylphenidate and Atomoxetine on Degree Centrality in Medication-Naïve Children With Attention-Deficit/Hyperactive Disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2022 Sep 28;25(9):709-719.
- García-Cabezas MÁ, John YJ, Barbas H, Zikopoulos B. Distinction of Neurons, Glia and Endothelial Cells in the Cerebral Cortex: An Algorithm Based on Cytological Features. *Front Neuroanat*. 2016 Nov 1;10:107.
- Gerasimov MR, Franceschi M, Volkow ND, Gifford A, Gatley SJ, Marsteller D, Molina PE, Dewey SL. Comparison between intraperitoneal and oral methylphenidate administration: A microdialysis and locomotor activity study. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 Oct;295(1):51-7.
- Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet*. 2009 Jul;126(1):51-90.
- Gnanavel S, Sharma P, Kaushal P, Hussain S. Attention deficit hyperactivity disorder and comorbidity: A review of literature. *World J Clin Cases*. 2019 Sep 6;7(17):2420-2426.
- Gomes, K. M., Petronilho, F. C., Mantovani, M., Garbelotto, T., Boeck, C. R., Dal-Pizzol, F., & Quevedo, J. (2007). Antioxidant Enzyme Activities Following Acute or Chronic Methylphenidate Treatment in Young Rats. *Neurochemical Research*, 33(6), 1024–1027.
- Gomes, K.M.; Inacio, C.G.; Valvassori, S.S.; Reus, G.Z.; Boeck, C.R.; Dal-Pizzol, F.; Quevedo, J. Superoxide production after acute and chronic treatment with methylphenidate in young and adult rats. *Neurosci. Lett*. 2009, 465, 95–98
- Gray, J. D., Punsoni, M., Tabori, N. E., Melton, J. T., Fanslow, V., Ward, M. J., Zupan, B., Menzer, D., Rice, J., Drake, C. T., Romeo, R. D., Brake, W. G., Torres-Reveron, A., & Milner, T. A. (2007). Methylphenidate administration to juvenile rats alters brain areas involved in cognition, motivated behaviors, appetite, and stress. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(27), 7196–7207.
- Guo C, Sun L, Chen X, Zhang D. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*. 2013 Jul 25;8(21):2003-14



- Gür, F., Cengiz, M., & Gür, B. (2020). Alternations in nuclear factor kappa beta activity (NF- κ B) in the rat brain due to long-term use of atomoxetine for treating ADHD: In vivo and in silico studies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Haber SN, Knutson B. The reward circuit: linking primate anatomy and human imaging. *Neuropsychopharmacology*. 2010 Jan;35(1):4-26.
- Haber SN. Neuroanatomy of Reward: A View from the Ventral Striatum. In: Gottfried JA, editor. *Neurobiology of Sensation and Reward*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011. Chapter 11.
- Halperin JM, Schulz KP. Revisiting the role of the prefrontal cortex in the pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychol Bull*. 2006 Jul;132(4):560-81.
- Hamidi M, Drevets WC, Price JL. Glial reduction in amygdala in major depressive disorder is due to oligodendrocytes. *Biol Psychiatry* 2004;55:563–9
- Hodgkins P, Shaw M, Coghil D, Hechtman L. Amphetamine and methylphenidate medications for attention-deficit/hyperactivity disorder: complementary treatment options. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2012 Sep;21(9):477-92.
- Hussain LS, Reddy V, Maani CV. Physiology, Noradrenergic Synapse. 2022 May 8.
- Jelinek M, Jurajda M, Duris K. Oxidative Stress in the Brain: Basic Concepts and Treatment Strategies in Stroke. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Nov 25;10(12):1886.
- 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.
- Khakh, B. S. (2019). Astrocyte–Neuron Interactions in the Striatum: Insights on Identity, Form, and Function. *Trends in Neurosciences*. doi:10.1016/j.tins.2019.06.003
- Kiff CJ, Lengua LJ, Zalewski M. Nature and nurturing: parenting in the context of child temperament. *Clin Child Fam Psychol Rev*. 2011 Sep;14(3):251-301.
- Kis, B., Lücke, C., Abdel-Hamid, M., Heßmann, P., Graf, E., Berger, M., Matthies, S., Borel, P., Sobanski, E., Alm, B., Rösler, M., Retz, W., Jacob, C., Colla, M., Huss, M., Jans, T., van Elst, L. T., Müller, H. H. O., & Philippen, A. (2020). Safety profile of methylphenidate under long-term treatment in adult ADHD patients - results of the COMPAS Study. *Pharmacopsychiatry*, 53(6), 263–271.
- Kohman, R. A., & Rhodes, J. S. (2013). Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, 27, 22–32.
- Kowalczyk P, Sulejczak D, Kleczkowska P, Bukowska-Ośko I, Kucia M, Popiel M, Wietrak E, Kramkowski K, Wrzosek K, Kaczyńska K. Mitochondrial Oxidative Stress-A Causative Factor and Therapeutic Target in Many Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 13;22(24):13384
- Kratochvil C.J., Wilens, T. E., Greenhill, L. L., Gao, H., Baker, K. D., Feldman, P. D., & Gelowitz, D. L. (2006). Effects of Long-Term Atomoxetine Treatment for Young Children With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 45(8), 919–927.
- Kreitzer, AC (2009). Fisiología y farmacología de las neuronas estriatales. *año Rev. Neurosci*. 32, 127–147.
- Krinzinger H, Hall CL, Groom MJ, Ansari MT, ... Liddle EB; ADDUCE Consortium. Neurological and psychiatric adverse effects of long-term methylphenidate treatment in ADHD: A map of the current evidence. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019 Dec;107:945-968.



- Kuczenski R, Segal DS. Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine. *J Neurochem.* 1997 May;68(5):2032-7. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.68052032.x. Erratum in: *J Neurochem* 1997 Sep;69(3):1332.
- Kul, M.; Unal, F.; Kandemir, H.; Sarkarati, B.; Kilinc, K.; Kandemir, S.B. Evaluation of Oxidative Metabolism in Child and Adolescent Patients with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Psychiatry Investig.* 2015, 12, 361–366
- Lanciego JL, Luquin N, Obeso JA. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Dec 1;2(12):a009621.
- Lee KH, Cha M, Lee BH. Neuroprotective Effect of Antioxidants in the Brain. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 28;21(19):7152.
- Leffa DT, Bellaver B, de Oliveira C, de Macedo IC, de Freitas JS, Grevet EH, Caumo W, Rohde LA, Quincozes-Santos A, Torres ILS. Increased Oxidative Parameters and Decreased Cytokine Levels in an Animal Model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Neurochem Res.* 2017 Nov;42(11):3084-3092.
- Lingford-Hughes, A., & Kalk, N. (2012). Clinical neuroanatomy. *Core Psychiatry*, 13–34.
- Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A, Ames BN. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB J.* 1996 Nov;10(13):1532-8.
- Liu N, Jia G, Qiu S, Li H, Liu Y, Wang Y, Niu H, Liu L, Qian Q. Different executive function impairments in medication-naïve children with attention-deficit/hyperactivity disorder comorbid with oppositional defiant disorder and conduct disorder. *Asian J Psychiatr.* 2023 Mar;81:103446.
- Luo SX, Huang EJ. Dopaminergic Neurons and Brain Reward Pathways: From Neurogenesis to Circuit Assembly. *Am J Pathol.* 2016 Mar;186(3):478-88.
- Man, K. K. C., Häge, A., Banaschewski, T., Inglis, S. K., Buitelaar, J., Carucci, S., Danckaerts, M., Dittmann, R. W., Falissard, B., Garas, P., Hollis, C., Konrad, K., Kovshoff, H., Liddle, E., McCarthy, S., Neubert, A., Nagy, P., Rosenthal, E., Sonuga-Barke, E. J. S., ... Uebel-von Sandersleben, H. (2023). Long-term safety of methylphenidate in children and adolescents with ADHD: 2-year outcomes of the Attention Deficit Hyperactivity Disorder Drugs Use Chronic Effects (ADDUCE) study. *The Lancet Psychiatry*, 10(5), 323–333.
- Martins, M.R.; Reinke, A.; Petronilho, F.C.; Gomes, K.M.; Dal-Pizzol, F.; Quevedo, J. Methylphenidate treatment induces oxidative stress in young rat brain. *Brain Res.* 2006, 1078, 189–197.
- Mechler K, Banaschewski T, Hohmann S, Häge A. Evidence-based pharmacological treatment options for ADHD in children and adolescents. *Pharmacol Ther.* 2022 Feb;230:107940.
- Meiser J, Weindl D, Hiller K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal.* 2013 May 17;11(1):34.
- Mercan D, Heneka MT. Norepinephrine as a modulator of microglial dynamics. *Nat Neurosci.* 2019; 22(11): 1745- 1746



- Milberger S, Biederman J, Faraone SV, Chen L, Jones J. Is maternal smoking during pregnancy a risk factor for attention deficit hyperactivity disorder in children? *Am J Psychiatry*. 1996 Sep;153(9):1138-42.
- Moalem G, Tracey DJ. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev*. 2006; 51 :240–264.
- Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol*. 1980;14(2-3):69-97.
- Möller T. Neuroinflamación en la enfermedad de Huntington. *J Neural Transm*. 2010; 117 :1001–1008.
- Mori K, Ozaki E, Zhang B, et al. Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express alpha1, alpha2, beta1 and beta2 adrenergic receptors. *Neuropharmacology*. 2002; 43(6): 1026- 1034.
- Motaghinejad M, Motevalian M, Shabab B, Fatima S. Effects of acute doses of methylphenidate on inflammation and oxidative stress in isolated hippocampus and cerebral cortex of adult rats. *J Neural Transm (Vienna)*. 2017 Jan;124(1):121-131.
- Motaghinejad M, Motevalian M, Shabab B. Possible involvements of glutamate and adrenergic receptors on acute toxicity of methylphenidate in isolated hippocampus and cerebral cortex of adult rats. *Fundam Clin Pharmacol*. 2017 Apr;31(2):208-225
- Motaghinejad, M., Motevalian, M., & Fatima, S. (2017). Mediator role of NMDA, AMPA/kainate, GABA A and Alpha 2 receptors in topiramate neuroprotective effects against methylphenidate induced neurotoxicity in rat. *Life Sciences*, 179, 37–53.
- Motlagh MG, Katsovich L, Thompson N, Lin H, Kim YS, Scahill L, Lombroso PJ, King RA, Peterson BS, Leckman JF. Severe psychosocial stress and heavy cigarette smoking during pregnancy: an examination of the pre- and perinatal risk factors associated with ADHD and Tourette syndrome. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2010 Oct;19(10):755-64.
- Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009 Jan 1;417(1):1-13
- Musella KE, Weyandt LL. Attention-deficit hyperactivity disorder and youth's emotion dysregulation: A systematic review of fMRI studies. *Appl Neuropsychol Child*. 2022 Sep 5:1-14.
- Narita M, Asato M, Shindo K, Kuzumaki N, Suzuki T. [Differences in neuronal toxicity and its molecular mechanisms between methamphetamine and methylphenidate]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 2009 Jun;29(3):115-20. Japanese..
- Ní Chasaide C, Lynch MA. The role of the immune system in driving neuroinflammation. *Brain Neurosci Adv*. 2020 Jan 29;4:2398212819901082.
- Oades RD, Myint AM, Dauvermann MR, Schimmelmann BG, Schwarz MJ. Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) and glial integrity: an exploration of associations of cytokines and kynurenine metabolites with symptoms and attention. *Behav Brain Funct*. 2010 Jun 9;6:32.
- O'Sullivan JB, Ryan KM, Curtin NM, Harkin A, Connor TJ. Noradrenaline reuptake inhibitors limit neuroinflammation in rat cortex following a systemic inflammatory challenge: implications for depression and neurodegeneration. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009 Jun;12(5):687-99.



- Pagnin D, Zamboni Grecco ML, Furtado EF. Prenatal alcohol use as a risk for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2019 Sep;269(6):681-687.
- Park JL, Hudec KL, Johnston C. Parental ADHD symptoms and parenting behaviors: A meta-analytic review. *Clin Psychol Rev*. 2017 Aug;56:25-39.
Pharmacological Reports, Volume 67, Issue 3, 2015, Pages 569-580
- Paxinos, George, and Keith B.J. Franklin. *The mouse brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Access Online via Elsevier, 2001
- Plessen KJ, Bansal R, Zhu H, Whiteman R, Amat J, Quackenbush GA, Martin L, Durkin K, Blair C, Royal J, Hugdahl K, Peterson BS. Hippocampus and amygdala morphology in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2006 Jul;63(7):795-807.
- Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry*. 2007
- Posner, J., Marsh, R., Maia, T. V., Peterson, B. S., Gruber, A., & Simpson, H. B. (2014). Reduced functional connectivity within the limbic cortico-striato-thalamo-cortical loop in unmedicated adults with obsessive-compulsive disorder: Limbic CSTC Loop Connectivity in OCD. *Human Brain Mapping*, 35(6), 2852–2860.
- Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V. Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest*. 2003 Jan;111(1):3-10. doi: 10.1172/JCI17522.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors. *Neuroscience*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001. *Neuroglial Cells*
- Réus GZ, Fries GR, Stertz L, Badawy M, Passos IC, Barichello T, Kapczinski F, Quevedo J. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience*. 2015 Aug 6;300:141-54.
- Ruchi, K.; Anil Kumar, S.; Sunil, G.; Bashir, A.; and Prabhat, S. Antioxidant activity in children with ADHD—A comparison in untreated and treated subjects with normal children. *Med. J. Malays*. 2011, 10, 31–35.
- Russo, A.J. Decreased Serum Cu/Zn SOD Associated with High Copper in Children with
- Salim S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017 Jan;360(1):201-205.
- Salud, S. de. (s. f.). 035. Cinco por ciento de la población infantil y adolescente presenta TDA. *gob.mx*. <https://www.gob.mx/salud/prensa/035-cinco-por-ciento-de-la-poblacion-infantil-y-adolescente-presenta-tda>
- Scott JE, Willett IH. Binding of cationic dyes to nucleic acids and their biological polyanions. *Nature*. 1966 Mar 5;209(5027):985-7.
- Selek S, Savas HA, Gergerlioglu HS, Bulut M, Yilmaz HR. Oxidative imbalance in adult attention deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychol*. 2008 Oct;79(2):256-9.
- Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*. 2013 Jun;4(6):624-30.
- Sezen, H.; Kandemir, H.; Savik, E.; Basmaci Kandemir, S.; Kilicaslan, F.; Bilinc, H.; Aksoy, N. Increased oxidative stress in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Redox Rep*. 2016, 21, 248–253
- Shabab T, Khanabdali R, Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Mohan G. Neuroinflammation pathways: a general review. *Int J Neurosci*. 2017 Jul;127(7):624-633.



- Shim SY, Kim HS. Oxidative stress and the antioxidant enzyme system in the developing brain. *Korean J Pediatr.* 2013 Mar;56(3):107-11.
- Siddiqui SV, Chatterjee U, Kumar D, Siddiqui A, Goyal N. Neuropsychology of prefrontal cortex. *Indian J Psychiatry.* 2008 Jul;50(3):202-8.
- Simpson DSA, Oliver PL. ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. *Antioxidants (Basel).* 2020 Aug 13;9(8):743
- Sonuga-Barke EJ, Sergeant JA, Nigg J, Willcutt E. Executive dysfunction and delay aversion in attention deficit hyperactivity disorder: nosologic and diagnostic implications. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* 2008 Apr;17(2):367-84, ix.
- Suzuki T, Shindo K, Miyatake M, Kurokawa K, Higashiyama K, Suzuki M, Narita M. Lack of development of behavioral sensitization to methylphenidate in mice: correlation with reversible astrocytic activation. *Eur J Pharmacol.* 2007 Nov 21;574(1):39-48.
- Swanson CJ, Perry KW, Koch-Krueger S, Katner J, Svensson KA, Bymaster FP. Effect of the attention deficit/hyperactivity disorder drug atomoxetine on extracellular concentrations of norepinephrine and dopamine in several brain regions of the rat. *Neuropharmacology.* 2006 May;50(6):755-60.
- Tani M, Glabinski AR, Tuohy VK, Stoler MH, Estes ML, Ransohoff RM. In situ hybridization analysis of glial fibrillary acidic protein mRNA reveals evidence of biphasic astrocyte activation during acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 1996 Mar;148(3):889-96.
- Tepper, JM y Bolam, JP (2004). Diversidad funcional y especificidad de las interneuronas neostriatales. *actual Opinión Neurobiol.* 14, 685–692. Mao M, Nair A, Augustine GJ. A Novel Type of Neuron Within the Dorsal Striatum. *Front Neural Circuits.* 2019 May 21;13:32. .
- Umek N, Geršak B, Vintar N, Šoštarič M, Mavri J. Dopamine Autoxidation Is Controlled by Acidic pH. *Front Mol Neurosci.* 2018 Dec 18;11:467.
- Valera EM, Faraone SV, Murray KE, Seidman LJ. Meta-analysis of structural imaging findings in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry.* 2007 Jun 15;61(12):1361-9.
- Van Hulst BM, de Zeeuw P, Bos DJ, Rijks Y, Neggers SF, Durston S. Children with ADHD symptoms show decreased activity in ventral striatum during the anticipation of reward, irrespective of ADHD diagnosis. *J Child Psychol Psychiatry.* 2017 Feb;58(2):206-214.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Fischman M, Foltin R, Abumrad NN, Gatley SJ, Logan J, Wong C, Gifford A, Ding YS, Hitzemann R, Pappas N. Methylphenidate and cocaine have a similar in vivo potency to block dopamine transporters in the human brain. *Life Sci.* 1999;65(1):PL7-12.
- Volkow, N. D., Wang, G.-J., Fowler, J. S., & Ding, Y.-S. (2005). Imaging the Effects of Methylphenidate on Brain Dopamine: New Model on Its Therapeutic Actions for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biological Psychiatry*, 57(11), 1410–1415
- Volkow, N. D., Wang, G.-J., Tomasi, D., Kollins, S. H., Wigal, T. L., Newcorn, J. H., Telang, F. W., Fowler, J. S., Logan, J., Wong, C. T., & Swanson, J. M. (2012). Methylphenidate-elicited dopamine increases in ventral striatum are associated with long-term symptom improvement in adults with attention deficit hyperactivity disorder.



The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 32(3), 841–849.

- Wang, L.-J., Yang, K.-C., Lee, S.-Y., Yang, C.-J., Huang, T.-S., Lee, T.-L. y Shyu, Y.-C. (2016). Initiation and Persistence of Pharmacotherapy for Youths with Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Taiwan. *PLOS ONE*, 11(8), e0161061.
- Weydt P, Möller T. Neuroinflammation en la patogénesis de la esclerosis lateral amiotrófica. *Neuroinforme*. 2005; 16 :527–531
- Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V, Terada M, Ellisman MH, Pekny M. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 14;103(46):17513-8.
- Willcutt EG. The prevalence of DSM-IV attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. *Neurotherapeutics*. 2012 Jul;9(3):490-9.
- Xing B, Li YC, Gao WJ. Norepinephrine versus dopamine and their interaction in modulating synaptic function in the prefrontal cortex. *Brain Res*. 2016 Jun 15;1641(Pt B):217-33.
- Yong, H.Y.F., Rawji, K.S., Ghorbani, S. et al. The benefits of neuroinflammation for the repair of the injured central nervous system. *Cell Mol Immunol* 16, 540–546 (2019).
- Young CB, Reddy V, Sonne J. Neuroanatomy, Basal Ganglia. 2022 Jul 25. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 30725826.
- Zhang S, Wang R, Wang G. Impact of Dopamine Oxidation on Dopaminergic Neurodegeneration. *ACS Chem Neurosci*. 2019 Feb 20;10(2):945-953.
- Zhu Y, Liu F, Zou X, Torbey M. Comparison of unbiased estimation of neuronal number in the rat hippocampus with different staining methods. *J Neurosci Methods*. 2015 Oct 30;254:73-9.
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014 Jul;94(3):909-50

