



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA



**ESTUDIO DEL TRATAMIENTO CON ATOMOXETINA (ATX) SOBRE  
EL POTENCIAL DE MEMBRANA Y MASA MITOCONDRIAL EN  
CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS**

*Tesis*

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

**PRESENTA**

**Sonia Elizabeth Carreón Trujillo**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2018**



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:** Dr. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

**VOCAL:** Dr. EUCLIDES AVILA CHÁVEZ

**SECRETARIO:** Dr. JUAN CARLOS CORONA CASTILLO

**1er. SUPLENTE:** Dra. CLAUDIA TERESA TOVAR PALACIO

**2° SUPLENTE:** Dra. FRANCISCA MORAYNA GUTIERREZ LUNA

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN  
EN NEUROCIENCIAS DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**Dr. Juan Carlos Corona Castillo**

**SUSTENTANTE :**

---

**Sonia Elizabeth Carreón Trujillo**

*N'allez pas là où le chemin peut mener,  
allez là où il n'y a pas de chemin  
et laissez une trace.*

*No vayas por donde está el camino,  
ve por donde no hay camino  
y deja tu rastro.*

Ralph Waldo Emerson.

## ÍNDICE

---

LISTA DE ABREVIATURAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
RESUMEN	V
I. INTRODUCCIÓN	
Trastorno por déficit de atención e hiperactividad	1
Factores genéticos	1
Factores ambientales	1
Áreas cerebrales afectadas por el TDAH	2
Sistema catecolaminérgico	3
Tratamiento terapéutico para el TDAH	4
Atomoxetina	6
Mecanismos adicionales a la inhibición de recaptura de la noradrenalina con tratamiento de atomoxetina	8
Mitocondria	10
Estrés oxidativo	13
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	19
VI. METODOLOGÍA	20
Esquema experimental	20
Cultivo de células SH-SY5Y	21
Diferenciación celular	21

Viabilidad celular	22
Tratamiento con ATX	22
Microscopía confocal	23
Cuantificación de potencial de membrana y masa mitocondrial	23
Análisis estadístico	24
<b>VII. RESULTADOS</b>	
Diferenciación celular	25
Ensayo de viabilidad celular	26
Efecto del tratamiento con ATX sobre el potencial de membrana Mitocondrial en células SH-SY5Y	27
Efecto del tratamiento con ATX sobre la masa mitocondrial en células SH-SY5Y	27
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	33
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	39
<b>X. PERSPECTIVAS</b>	39
<b>XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	41

## ABREVIATURAS

---

$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
ATP	Trifosfato de adenosina (ATP)
ATX	Atomoxetina
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CAT	Catalasa
GABA A	Ácido $\gamma$ -aminobutírico A
GIRK	Canales de potasio rectificadores de entrada asociados a proteína G
GSK3 $\beta$	Glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$
NMDA	N-metil-D-aspartato
PBS	Buffer fosfato salino (por sus siglas en inglés Phosphate buffered saline)
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNAP-25	Proteína sinaptosomal asociada a 25 KDa
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido dismutasa
TDAH	Trastorno de déficit de atención e hiperactividad
TMRM	Tetrametilrodamina metil éster
Uqcrc2	Complejo 2 nuclear proteínico ubiquinol-citocromo C reductasa

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1	Representación esquemática de los circuitos funcionales involucrados en la fisiopatología del TDAH	2
Figura 2	Diagrama de la síntesis de las catecolaminas	4
Figura 3	Esquema del mecanismo de acción del metilfenidato	5
Figura 4	Esquema del mecanismo de acción de la ATX	7
Figura 5	La mitocondria y sus principales mecanismos	11
Figura 6	Esquema del cambio del potencial de membrana mitocondrial	13
Figura 7	Diagrama experimental del tratamiento con ATX	20
Figura 8	Diferenciación de células SH-SY5Y	25
Figura 9	Diferenciación de células SH-SY5Y con tinción de cristal violeta	26
Figura 10	Elevadas concentraciones de ATX producen muerte en células SH-SY5Y diferenciadas	26
Figura 11	Células SH-SY5Y diferenciadas (control)	28
Figura 12	Células SH-SY5Y diferenciadas y tratadas con 1 $\mu$ M de ATX	29
Figura 13	Células SH-SY5Y diferenciadas y tratadas con 5 $\mu$ M de ATX	29
Figura 14	Células SH-SY5Y diferenciadas y tratadas con 10 $\mu$ M de ATX	30
Figura 15	Células SH-SY5Y diferenciadas y tratadas con 20 $\mu$ M de ATX	30
Figura 16	Células SH-SY5Y diferenciadas y tratadas con 50 $\mu$ M de ATX	31
Figura 17	Efecto de la ATX sobre el potencial de membrana mitocondrial en células SH-SY5Y	31
Figura 18	Efecto de la ATX sobre la masa mitocondrial en células SH-SY5Y	32



## RESUMEN

---

**Antecedentes:** El Trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) es un trastorno de alta prevalencia en niños y adultos, al ser neuropsiquiátrico, multifactorial y clínicamente heterogéneo, puede afectar en varios ámbitos a nivel personal y de sociedad. Para su tratamiento se utiliza tanto terapia farmacológica como la no farmacológica, dentro de los principales fármacos usados están los psicoestimulantes como metilfenidato y anfetaminas y el no psicoestimulante atomoxetina (ATX). Sin embargo, los mecanismos tanto del trastorno como de su tratamiento aún no están completamente definidos. Del metilfenidato se sabe que es un inhibidor de la recaptura de la dopamina y noradrenalina y se han encontrado efectos alternos como el estrés oxidativo, respecto a la ATX, es un inhibidor de la noradrenalina y los efectos alternos que hasta el momento se han observado es el bloqueo del receptor NMDA, la inducción de la expresión de BDNF en la corteza prefrontal, el incremento de la expresión de las subunidades del receptor GABA A y aumento de la ubiquinol-citocromo C reductasa complejo nuclear II. Estos mecanismos en conjunto participan en varias vías celulares, entre ellas está el metabolismo energético, potencial y plasticidad de la membrana, desarrollo celular, entre otras que aun no están bien definidas. **Justificación:** Se ha demostrado en distintos estudios que la ATX tiene varios mecanismos de acción adicionales a la inhibición de la recaptura de la noradrenalina, estos mecanismos tienen efectos a nivel celular pero aun no están bien definidos. Por lo tanto, nosotros estudiamos si la administración de ATX modifica la función mitocondrial, con lo cual se podrían causar alteraciones en las células, particularmente a las neuronas, causando efectos adversos no contemplados. **Hipótesis:** El tratamiento con ATX producirá alteraciones a nivel de la función mitocondrial en células SH-SY5Y diferenciadas. **Objetivo:** Analizar el efecto de la ATX sobre el potencial de membrana y masa mitocondrial en las células. **Metodología:** Se utilizó la línea celular SH-SY5Y, las cuales fueron diferenciadas con ácido retinoico (AR) 10  $\mu\text{M}$  durante 7 días, con un tratamiento cada 48 horas para comprobar su diferenciación a un fenotipo parecido a neuronas. Posteriormente, a células en proceso de diferenciación se les trató paralelamente con ATX para un estudio de citotoxicidad con diferentes concentraciones relacionadas con el rango encontrado en plasma de pacientes con TDAH. Las células se tiñeron con dos colorantes fluorescentes TMRM y calceína-AM para medir el potencial de membrana y masa mitocondrial con microscopía confocal y obtener imágenes, las cuales fueron analizadas con el programa *ImageJ*. **Resultados:** En el ensayo de citotoxicidad se observó una diferencia significativa de muerte celular con respecto al control con las concentraciones de ATX 20  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ . Cuando se analizó el potencial de membrana mitocondrial, se observó una disminución significativa con ATX 50  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, al analizar la masa mitocondrial se observó un aumento significativo con ATX 10  $\mu\text{M}$  y una disminución significativa con la concentración de ATX 50  $\mu\text{M}$ . **Conclusiones:** Podemos concluir que la ATX modificó la función mitocondrial dependiente de la concentración como se demostró por el ensayo de citotoxicidad y por la medición del potencial y masa mitocondrial.

## I. INTRODUCCIÓN

---

### **Trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH)**

El TDAH es un trastorno neuropsiquiátrico, multifactorial y clínicamente heterogéneo, debido a su falta de atención, actividad motora excesiva, impulsividad y distracción, se deterioran los factores tanto sociales como emocionales, está asociado a una gran carga financiera, estrés para las familias y resultados académicos y profesionales desfavorables (Biederman *et al.* 1990; Biederman 2005). El TDAH afecta a más del 5% de niños y adolescentes (Polanczyk *et al.* 2007), mientras que la prevalencia en adultos mayores es del 2.8% (Simon *et al.* 2009). Las causas y fisiopatología del TDAH aún no están completamente definidas (Faraone *et al.* 2015).

Debido a la heterogeneidad del trastorno, su fisiopatología se basa en varios factores, como se indica a continuación:

#### **Factores genéticos**

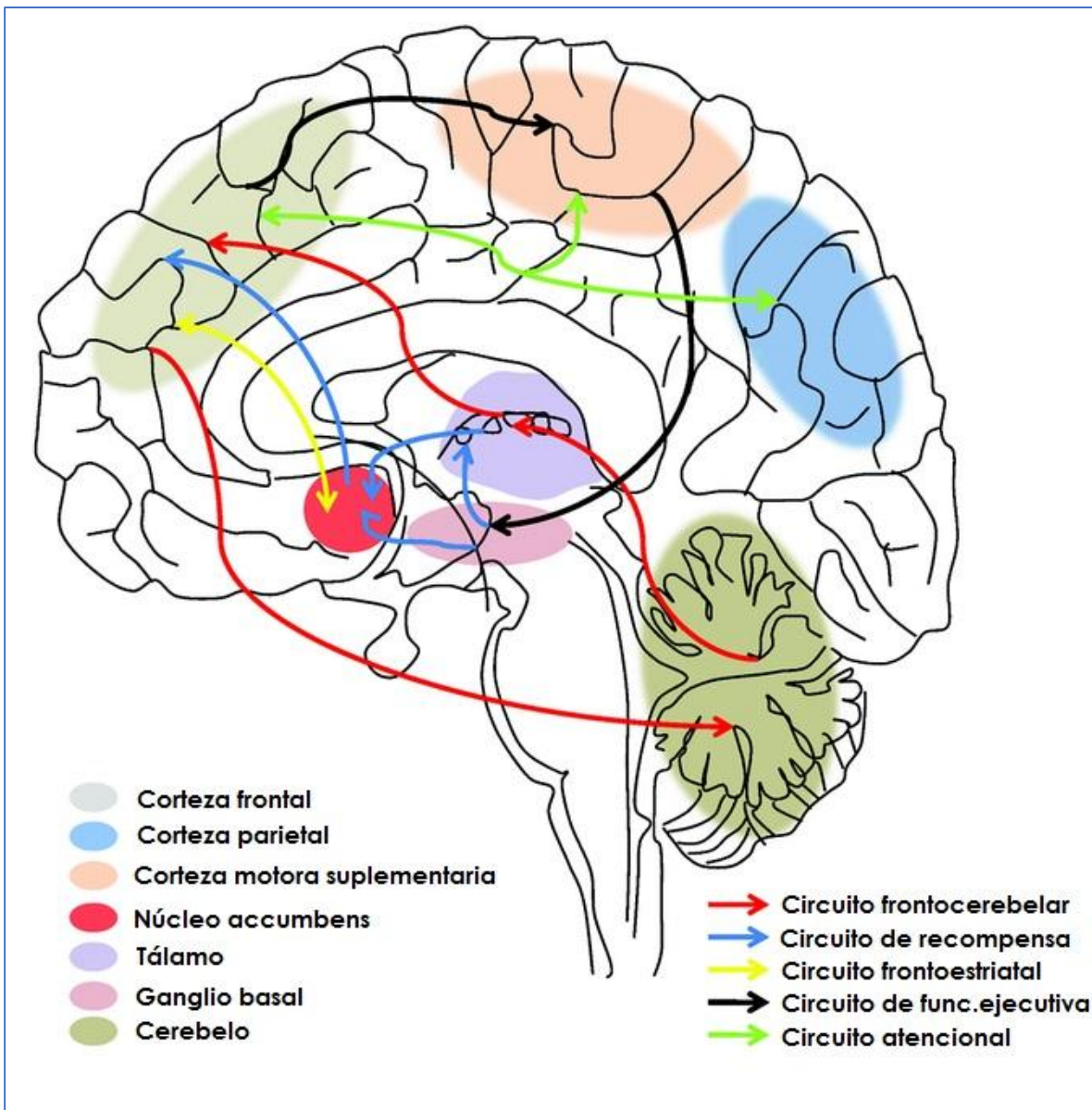
Se han realizado diversos estudios en familias con pacientes de TDAH; en padres y hermanos se presentó entre cinco y diez veces más el riesgo de desarrollar el trastorno comparado con la población general (Biederman *et al.* 1990; Biederman *et al.* 1992). Este trastorno es poligenético, se han implicado genes de diversas regiones cerebrales, aunque los resultados han sido inconsistentes, los principales genes estudiados son los relacionados con el sistema de neurotransmisión monoaminérgica (Gizer *et al.* 2009), este sistema está implicado en la fisiopatología del TDAH por los mecanismos de acción de los fármacos utilizados para su tratamiento (Faraone *et al.* 2015).

#### **Factores ambientales**

Los factores de riesgo ambientales para el TDAH no están bien definidos, en muchos casos se han presentado con poco efecto y en pocos casos con un gran efecto, las causas ambientales podrían derivarse de distintas fuentes, entre ellos: prenatales; si la madre fuma o bebe alcohol, al igual que el nacimiento prematuro, exposición a toxinas como pesticidas, bifenilos policlorados, zinc y plomo, también influye el comportamiento de los padres como la hostilidad, el maltrato, etc. Esto conlleva a una relación muy amplia entre los factores ambientales y genéticos (Faraone *et al.* 2015).

## Áreas cerebrales afectadas por el TDAH

Una variedad de subregiones cerebrales como las cortezas frontal y parietal, ganglio basal, cerebelo, tálamo y núcleo accumbens, se han visto afectadas en el TDAH, así como las respuestas neuronales de varios circuitos que resultan dañadas o son más débiles que en individuos sanos como se muestra en la **figura 1** (Faraone *et al.* 2015; Purper-Ouakil 2011).



**FIGURA 1. Representación esquemática de los circuitos funcionales involucrados en la fisiopatología del TDAH** (modificado de Purper-Ouakil 2011). Los circuitos mayormente implicados, son los relacionados con el control cognitivo (incluyendo el

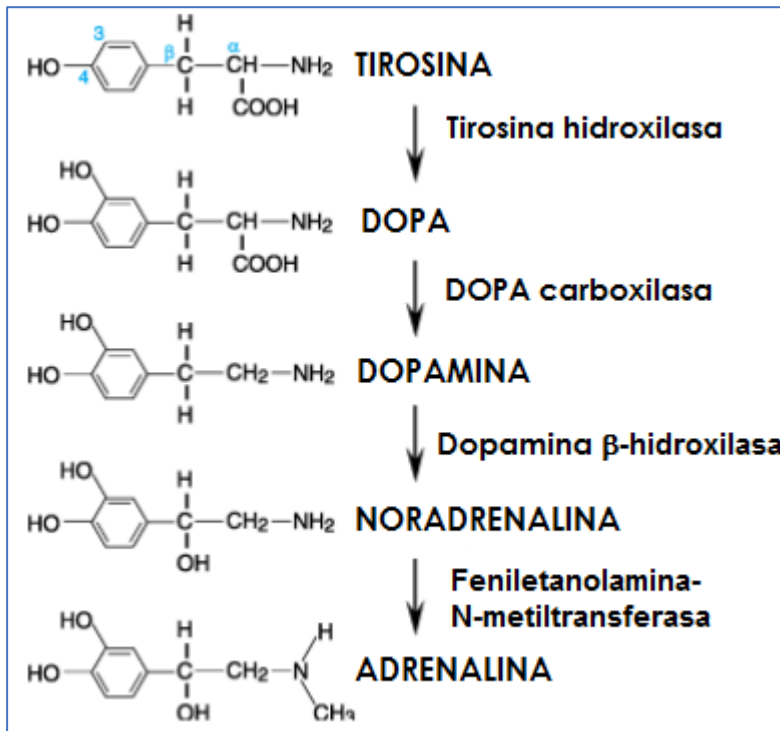
funcionamiento atencional), procesamiento de recompensas y funcionamiento ejecutivo, los cuales constituyen los principales síntomas del TDAH.

Este trastorno se ha conceptualizado desde hace tiempo como un trastorno neurobiológico de la corteza prefrontal y sus conexiones. Los circuitos de la corteza prefrontal para el TDAH incluyen los circuitos frontoestriatal (flecha amarilla) y frontocerebelar (flecha roja). Los circuitos frontoestriatales se han relacionado con el control cognitivo y el procesamiento de recompensas. El circuito corticocerebelar está involucrado en el funcionamiento ejecutivo que incluye: planeación, comportamiento dirigido, inhibición de la respuesta, memoria de trabajo y adaptación flexible al contexto. Además, hay una intrincada relación entre estas subregiones que aún no están bien establecidas, sin embargo, se han podido observar conexiones como el circuito de recompensa (flechas azules) que incluye una relación entre la corteza prefrontal, tálamo, ganglio basal y núcleo accumbens; el circuito de función ejecutiva (flechas negras) que involucra la corteza frontal, corteza motora suplementaria y ganglio basal, y el circuito atencional (líneas verdes), el cual relaciona a la corteza frontal, corteza motora suplementaria y corteza parietal. La disfunción neurobiológica en cualquiera de estos circuitos podría conducir a síntomas de TDAH, ya que el control del comportamiento podría ser perturbado por: 1) déficits en la corteza prefrontal en sí; o 2) problemas en los circuitos de transmisión de información a la corteza prefrontal, lo que conduce a la reducción de la señalización para el control (Faraone *et al.* 2015; Durston *et al.* 2011).

### **Sistema catecolaminérgico**

En el TDAH también están involucrados los circuitos neurotransmisores. La ruta de las catecolaminas es una de las rutas de mayor interés por el significado tan trascendental que supone la utilización de los neurotransmisores como la dopamina, la noradrenalina (norepinefrina) y la adrenalina (epinefrina).

Todas las catecolaminas transmisoras (dopamina, noradrenalina y adrenalina) son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina en una vía biosintética común que contiene cuatro enzimas: tirosina hidroxilasa, descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, dopamina  $\beta$ -hidroxilasa y feniletanolamina N-metil transferasa (ver **figura 2**). Las catecolaminas poseen un núcleo catecol y un anillo bencénico 3,4 dihidroxilado (Murray 2010; Eric R. Kandel 2001).



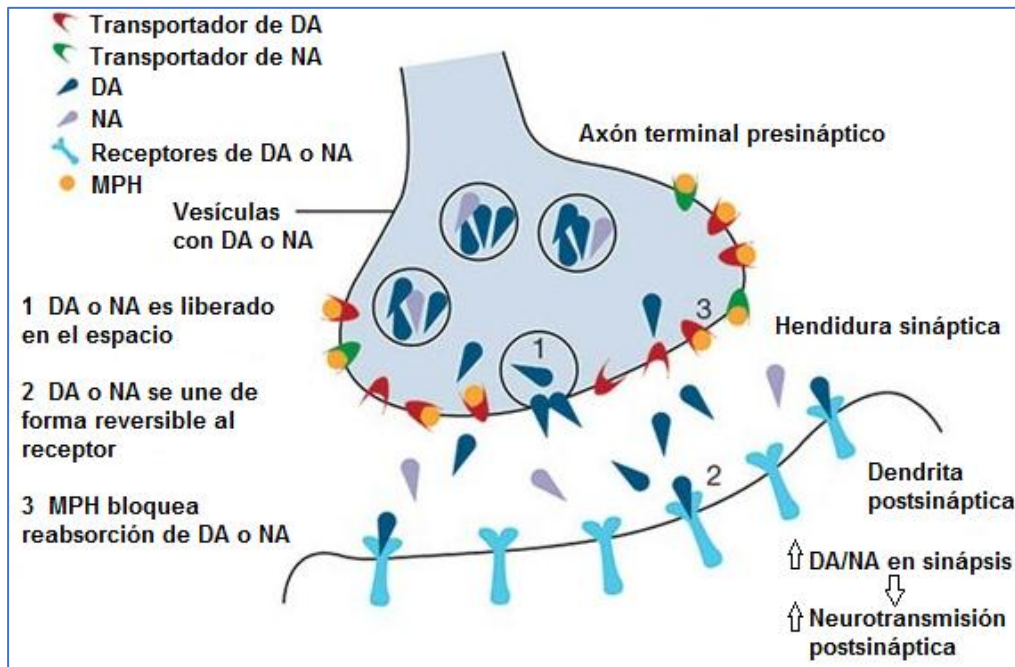
**Figura 2. Diagrama de la síntesis de las catecolaminas.** La dopamina y noradrenalina juegan un papel importante en funciones cognitivas que son a menudo dañadas en el TDAH.

La dopamina y noradrenalina juegan un papel importante en las funciones ejecutivas a través de influencias neuromoduladoras sobre circuitos fronto-estriato-cerebelosos. Aunque la desregulación de la dopamina es central en la comprensión de la neurobiología del TDAH y su tratamiento farmacológico, la potencial contribución de la noradrenalina también ha sido implicada en su fisiopatología. La producción de noradrenalina se origina primariamente de neuronas en el locus ceruleus y se envían a múltiples regiones, incluyendo la corteza prefrontal, la cual juega un papel crítico en un alto nivel de funciones cognitivas como la memoria de trabajo y el control de respuesta inhibitoria, como ya se mencionó, estas son a menudo dañadas en TDAH. El mecanismo principal para terminar la neurotransmisión de la noradrenalina en el SNC, es a través de la recaptura del transportador de la noradrenalina, terminando rápidamente con la acción de este neurotransmisor, antes de su difusión lejos de la sinapsis (Del Campo *et al.* 2011).

### **Tratamiento terapéutico para el TDAH**

Por lo tanto, los fármacos utilizados en el tratamiento del TDAH, actúan para aumentar los niveles de catecolaminas en el cerebro, sin embargo, los mecanismos prefrontales

corticales y subcorticales debido a estos fármacos, aún no están completamente definidos (Del Campo *et al.* 2011). Los psicoestimulantes como metilfenidato y anfetaminas representan la primera línea en el tratamiento farmacológico de este trastorno y actúan para incrementar los niveles extracelulares de noradrenalina y dopamina al bloquear el transportador y previniendo su recaptura como se puede observar en la **figura 3** (Chamberlain *et al.* 2007). Las propiedades farmacológicas del metilfenidato imitan la metanfetamina, ya que posee similitudes estructurales, pero las alteraciones neuroquímicas y neurocomportamentales causadas por su abuso no están claras (Motaghinejad *et al.* 2016).



**FIGURA 3. Esquema del mecanismo de acción del metilfenidato.** El metilfenidato es un psicoestimulante que aumenta los niveles extracelulares de dopamina (DA) y noradrenalina (NA) al bloquear el transportador de estos dos neurotransmisores.

De las opciones para el tratamiento farmacológico disponibles para el TDAH, la mayoría tienen un importante efecto en la transmisión noradrenérgica, incluyendo el metilfenidato, también los no psicoestimulantes como la atomoxetina (ATX) y agonistas adrenérgicos  $\alpha_2$  como son la clonidina y guanfacina, así como el bupropión, un inhibidor de la recaptación de dopamina y noradrenalina (Del Campo *et al.* 2011; Lopresti 2015).

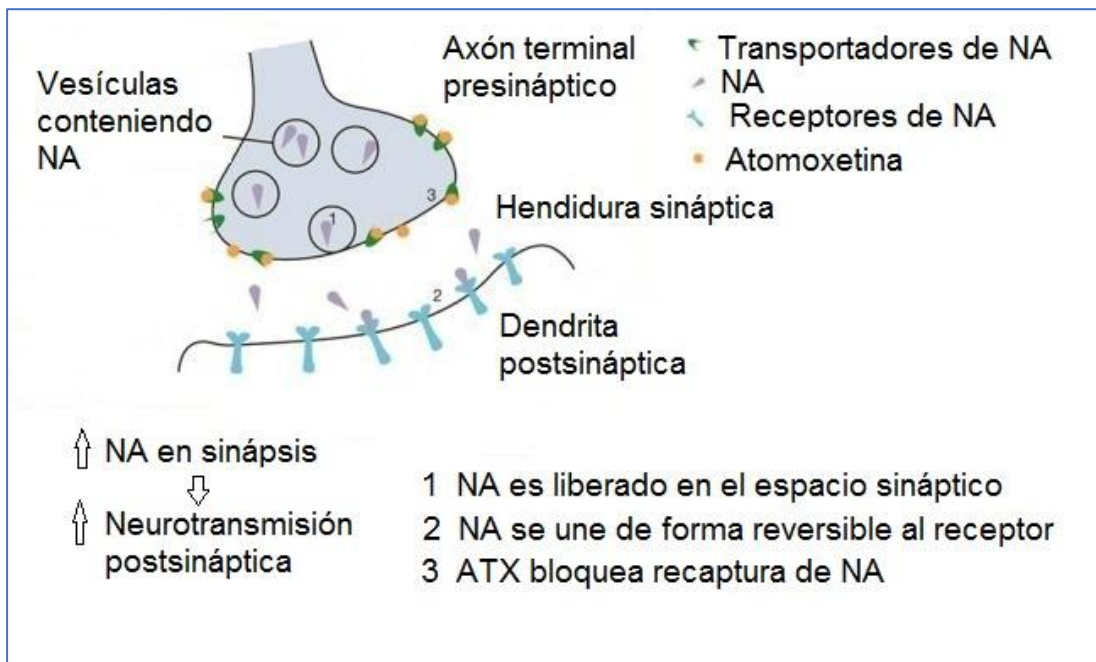
Estos medicamentos han sido asociados con severos efectos adversos, esto incluye pérdida de apetito, crecimiento ralentizado y trastornos del sueño. Es importante observar que a pesar de su amplia aceptación de eficacia a un corto tiempo, la efectividad a un largo tiempo de este tratamiento farmacológico en lo social, educacional y funcionamiento ocupacional en personas con TDAH, continúa en debate (Del Campo *et al.* 2011).

### **Atomoxetina**

La ATX tiene alta solubilidad acuosa y permeabilidad en la membrana plasmática, esto facilita una rápida y completa absorción después de la administración oral, con rangos de biodisponibilidad oral absoluta de 63 a 94%, ya que su activación no requiere de un metabolismo hepático. Tres rutas metabólicas oxidativas están involucradas en el sistema de aclaramiento de la ATX: hidroxilación de anillo aromático, hidroxilación bencílica y N-dimetilación (Sauer *et al.* 2005). La ATX es un inhibidor selectivo de la recaptura de la noradrenalina, incrementando así los niveles de este neurotransmisor en el espacio sináptico como se muestra en la **figura 4** (Hemrick-luecke *et al.* 2002; Chamberlain *et al.* 2007; Wang 2016).

La ATX presenta eficacia en el tratamiento del TDAH y es el único agente no estimulante actualmente disponible, con licencia aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) desde el 2002 para el tratamiento farmacológico de este trastorno (Chamberlain *et al.* 2007). Además, varios estudios sugieren que puede ser potencialmente útil para el tratamiento de otras condiciones psiquiátricas, incluyendo el trastorno de ansiedad, trastornos de la alimentación, trastorno de uso de sustancias y narcolepsias (Kobayashi *et al.* 2010). Puede tener varias ventajas clínicas importantes sobre los psicoestimulantes; existe un 20% - 30% de pacientes con TDAH que no responden a un tratamiento adecuado con psicoestimulantes o son intolerantes a estos medicamentos. Los psicoestimulantes presentan adicción potencial y en algunos casos pueden empeorar los tics comórbidos. En contraste, estudios sugieren que la ATX carece de efectos de dopamina en el cerebro medio y no tiene propiedades adictivas, pero presenta eficacia como tratamiento y en tics comórbidos. También puede presentar otras ventajas clínicas que han sido relativamente exploradas, por ejemplo, el tratamiento con ATX ha sido asociado con grandes mejoras en la calidad del sueño comparado con el metilfenidato en niños con el trastorno (Chamberlain *et al.* 2007). En estudios de ratas, la ATX ha

presentado un incremento de niveles extracelulares de noradrenalina y dopamina en corteza prefrontal, pero no altera la dopamina extracelular en estriado o núcleo accumbens, en contraste, el psicoestimulante metilfenidato incrementa la noradrenalina y dopamina extracelular en la corteza prefrontal pero también aumenta la dopamina en estriado y núcleo accumbens (Hemrick-luecke *et al.* 2002). Se piensa que estos efectos dopaminérgicos subcorticales son los responsables de la potencial adicción del tratamiento psicoestimulante. Como tal, la ATX puede ofrecer ventajas clínicas por los efectos limitados en la dopamina subcortical (Del Campo *et al.* 2011). Los datos a largo plazo muestran que el impacto de la ATX no se debe a un efecto farmacológico agudo sino que dura o incluso se amplifica después de un período libre de fármaco de 2 meses, lo que conduce a un desarrollo alterado de la composición sináptica (Patrick *et al.* 2013).



**FIGURA 4. Esquema del mecanismo de acción de la ATX.** La ATX es un fármaco no psicoestimulante, el cual aumenta los niveles de noradrenalina (NA) extracelular al bloquear su transportador.



## **Mecanismos adicionales a la inhibición de recaptura de la noradrenalina con el tratamiento de atomoxetina**

Así mismo, se ha demostrado en la literatura, que la ATX tiene mecanismos adicionales a la recaptura de la noradrenalina, entre estos se encuentra el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), este es miembro de un grupo de neurotrofinas que desempeñan un papel importante en la regulación de supervivencia y diferenciación de poblaciones específicas de neuronas, el gen BDNF de rata consiste de 5 exones, designados exones I-V (Takeuchi *et al.* 2002). En un estudio realizado con un modelo animal de TDAH, con ratas preadolescentes con hipertensión espontánea, se observó que la administración sub crónica de ATX incrementa la expresión y señalización del mRNA del exón IV-BDNF en la corteza prefrontal, paralelo a un incremento significativo de la proteína madura en una fracción de membrana, lo cual sugiere un incremento en el tráfico de la neurotrofina hacia compartimentos sinápticos. Estos efectos podrían resultar benéficos para la plasticidad celular y la resistencia neuronal que sostiene la cognición (Fumagalli *et al.* 2010), debido a que la inactivación del promotor IV-BDNF ha sido reportada en pacientes deprimidos, BDNF es un importante factor neuronal implicado en la fisiopatología de la depresión (Jha *et al.* 2016).

También se ha reportado que la ATX inhibe los canales de potasio rectificadores de entrada asociados a proteína G (GIRK), del tipo cerebrales GIRK1/2 y GIRK2, y tipo cardíaco GIRK1/4, causando un cambio en la conformación alostérica en estos canales con una simple oclusión de la abertura de canal. La inhibición de canales GIRK causa una despolarización del potencial de membrana, resultando en un incremento en la excitabilidad celular, por lo que estos canales tienen una importante función en la regularización de la excitabilidad neuronal, transmisión sináptica y en ritmo cardíaco. Por lo tanto, incluso una inhibición parcial de los canales GIRK por ATX, puede tener ciertos efectos en el cerebro y funciones cardíacas. A pesar de que los efectos terapéuticos que se le han atribuido primariamente es la inhibición de recaptura de la noradrenalina en el cerebro, la inhibición de canales GIRK presentó una reducción del comportamiento relacionado a la ansiedad, lo cual podría contribuir a la mejora de los síntomas de la ansiedad (Kobayashi *et al.* 2010).

Así mismo, se investigó el impacto de la ATX en receptores NMDA (N-metil-D-aspartato). Los receptores NMDA son receptores del glutamato y están asociados con los procesos de aprendizaje, memoria y con el desarrollo y la plasticidad neural; el principal hallazgo es que la ATX bloquea estos receptores en concentraciones bajas, que son el equivalente o incluso menor que las encontradas en el plasma de pacientes tratados. La ATX interacciona de una manera no competitiva, lo que indica que podría unirse al receptor aparte del sitio de unión al ligando, por lo que el bloqueo depende del voltaje, de modo que la inhibición se atenúa por despolarización. Los datos en este estudio podrían ser prueba de que la alteración de la transmisión glutamatérgica podría desempeñar un papel fundamental en la fisiopatología del TDAH (Ludolph *et al.* 2010; Dorval *et al.* 2007). Así mismo, la ATX parece disminuir la transmisión glutamatérgica en una región específica del cerebro.(Patrick *et al.* 2013)

También se demostró que el tratamiento crónico con ATX en ratas jóvenes, afecta varios genes incrementando en la corteza prefrontal la expresión de las subunidades del receptor del ácido  $\gamma$ -aminobutírico A (GABA A), así como en el complejo 2 nuclear proteínico ubiquinol-citocromo C reductasa (Uqcrc2) y la proteína sinaptosomal asociada de 25 KDa (SNAP-25). Los receptores de GABA A son una parte principal de la señalización de neurotransmisión inhibitoria en la red neuronal y representa un importante objetivo de varias clases de sitios de ligandos de benzodiazepinas, barbitúricos, neuroesteroides, anestésicos y alcohol. En este estudio se observó el incremento de expresión de receptores GABA-A  $\alpha$ 1 y  $\beta$ 3 en la corteza prefrontal después del tratamiento con ATX, ya que la baja regulación de los receptores GABA puede ser mecanismo fisiopatológico en TDAH, el incremento en niveles de este receptor podría contrarrestar dicho mecanismo por mejoramiento de la transducción de señal y reducción de concentraciones GABA extracelulares. Como ya se mencionó, también Uqcrc2 se incrementa después del tratamiento crónico con ATX, esta es una enzima del complejo III mitocondrial involucrado en la cadena respiratoria de transporte de electrones, se ha visto que la regulación del gen involucrado en esta enzima está alterado en la corteza prefrontal de pacientes que sufren de trastorno bipolar, indicando su participación en trastornos psiquiátricos. Así mismo, se observó el incremento de SNAP-25 después del tratamiento con ATX, la cual es una proteína ligada a la membrana en neuronas y junto

con otras moléculas regula la exocitosis vesicular sináptica. El incremento de expresión de SNAP-25 apunta hacia un posible mecanismo terapéutico activo adicional de ATX involucrado en efectos de exocitosis de neurotransmisores dentro de la hendidura sináptica (Lempp *et al.* 2013).

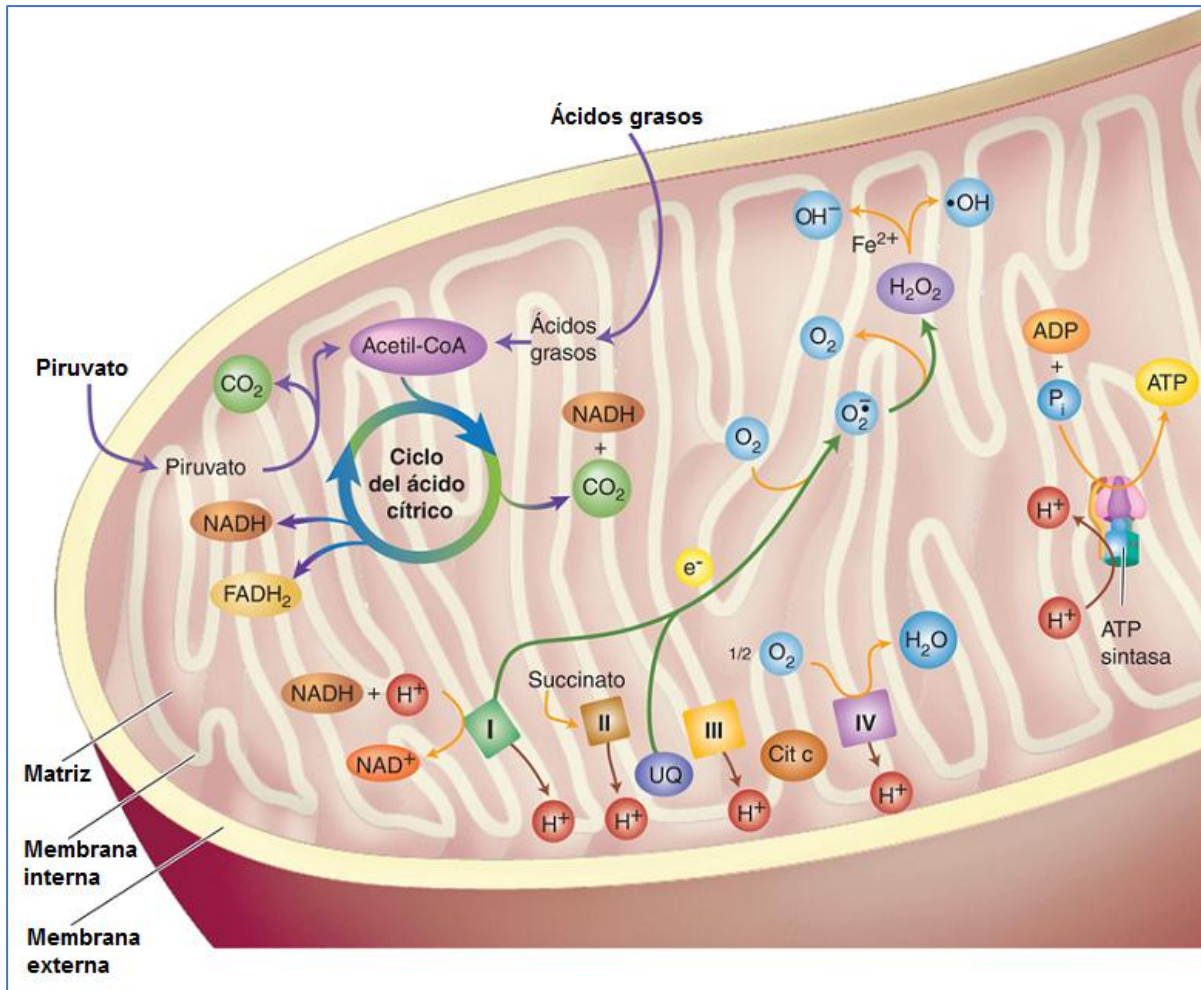
Por último, un estudio reciente concluyó que la ATX puede actuar como un neuroprotector, protegiendo la médula espinal y mejorando las funciones neurológicas, esto se puede observar a través de la prevención de la apoptosis en la médula espinal mediante la inhibición de la actividad de la caspasa 3, así como por el efecto antiinflamatorio mediante la inhibición de los niveles de TNF- $\alpha$  y por la disminución de los niveles de malondialdehído (un producto de la peroxidación lipídica), así como por el aumento en el número de neuronas motoras y la preservación de la mielinización del axón en lesión traumática de la médula espinal. (Wang 2016).

### **Mitocondria**

Tomando en cuenta las alteraciones de la ATX a nivel celular, es importante analizar su efecto en un organelo elemental para la célula; la mitocondria. La mitocondria (**figura 5**) juega un papel esencial en el mantenimiento de la integridad celular y en la fisiopatología celular del SNC. Es la principal productora de trifosfato de adenosina (ATP) en células eucarióticas aeróbicas, reguladora de homeostasis iónica y estado redox, siendo directamente involucrada en el transporte de metabolitos, proteínas, metabolismo de lípidos, aminoácidos y es el árbitro final de la muerte celular (Corona y Duchon 2014; Gómez Puyou 2015).

Para la producción de ATP, la mitocondria utiliza el potencial del gradiente electroquímico de protones o fuerza motor de protón electroquímico ( $\Delta p$ ), generado por la transferencia de electrones mediante la cadena de transporte de electrones. La transferencia de electrones se lleva a cabo mediante los complejos proteínicos I-IV en el interior de la membrana mitocondrial proporcionando la energía para conducir protones H<sup>+</sup> contra su gradiente de concentración a través de la membrana mitocondrial interna (fuera del citoplasma mitocondrial) como se observa en la **figura 6**. Esto resulta en una acumulación neta de H<sup>+</sup> fuera de la membrana, el cual fluye de nuevo al interior de la mitocondria mediante la generación de ATP por la ATP sintasa, esto produce ATP y completa la

cadena de transporte de electrones. La fuerza total de la conducción de protones dentro de la mitocondria ( $\Delta p$ ) es una combinación de ambos; potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) y el gradiente o pH mitocondrial ( $\Delta pH_m$  o gradiente de concentración químico) (Corona y Duchon 2014; Perry *et al.* 2011).



**FIGURA 5. La mitocondria y sus principales mecanismos** (modificado de McKee 2014). Está compuesta por doble membrana, la interna formada por crestas en las cuales se realizan la fosforilación oxidativa que implica 5 complejos: I, II, III y IV o componentes principales de la cadena de transporte de electrones y complejo V o ATP sintasa; así como también el ciclo del ácido cítrico.

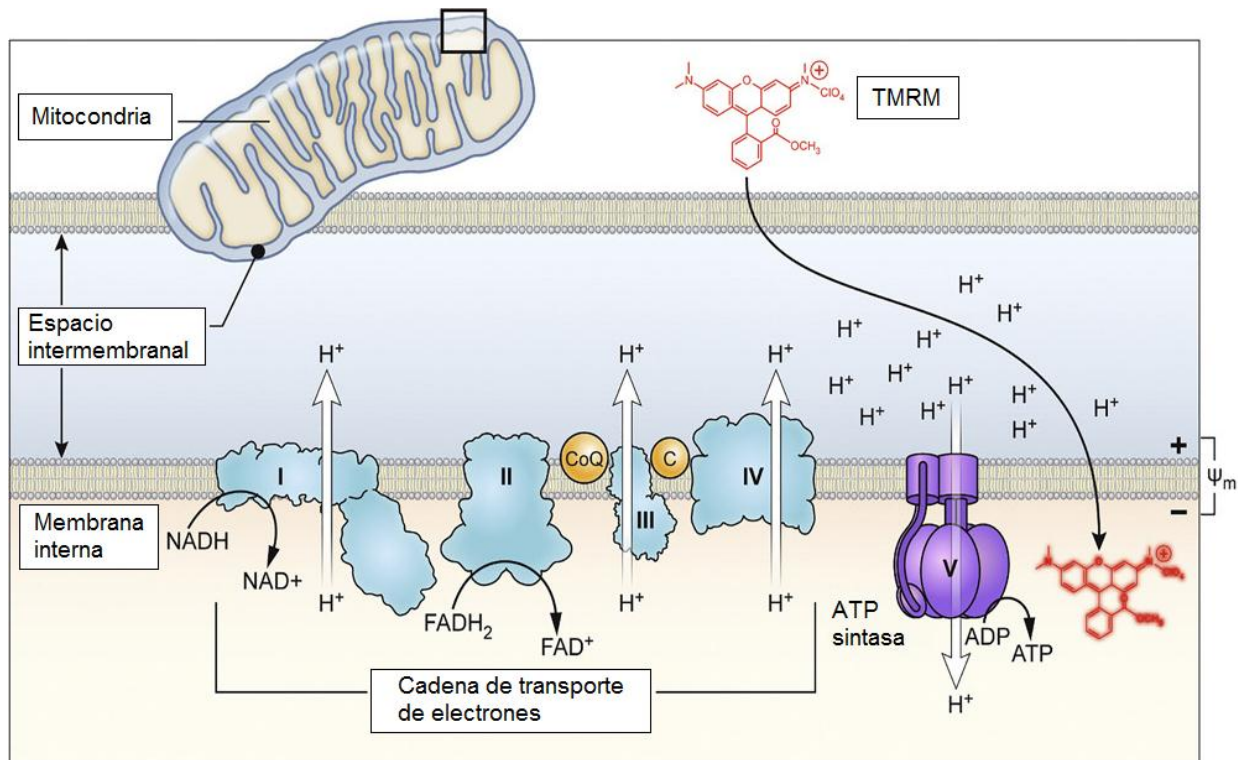
En conjunto, estos factores ayudan en el control mitocondrial sobre el metabolismo energético, homeostasis iónica intracelular y muerte celular en células eucariotas. Mientras  $\Delta p$  proporciona la fuerza motriz bioenergética para la producción y regulación

de ATP, el  $\Delta\psi_m$  componente de  $\Delta p$ , proporciona el gradiente de carga requerido para el secuestro de calcio mitocondrial y regula la producción de ROS y, por lo tanto, es también un regulador central de la integridad celular. Durante el estrés celular, el  $\Delta\psi_m$  puede a su vez ser alterado por desregulación de cargas iónicas intracelulares (por ejemplo, calcio o potasio) consecuentemente cambiando  $\Delta p$  y así la producción de ATP. Cuando los flujos iónicos superan la habilidad de la mitocondria de equilibrar estos cambios  $\Delta p$ ,  $\Delta\psi_m$  y/ o  $\Delta pH_m$  pueden colapsar, llevando al fracaso de producción de ATP y estrés bioenergético (Corona y Duchon 2014; Perry *et al.* 2011).

En los últimos años los colorantes fluorescentes para la medición del  $\Delta\psi_m$  se han convertido en herramientas usadas comúnmente para monitorear los cambios en este importante parámetro fisiológico mitocondrial relacionado a la capacidad de la célula de generar ATP en la fosforilación oxidativa. Como tal, el  $\Delta\psi_m$  es un indicador clave en la integridad o lesión celular. Estos colorantes son típicamente componentes catiónicos lipofílicos como el tetrametilrodamina metil éster (TMRM), acumulándose en la membrana de la matriz del espacio mitocondrial en proporción al  $\Delta\psi_m$  como se puede observar en la **figura 6**, donde se muestra la estructura del TMRM al entrar a la mitocondria. Entre más polarizada la mitocondria (por ejemplo, hiperpolarizada, por lo tanto, su interior va a ser más negativo) acumula más colorante catiónico y la mitocondria despolarizada (el interior es menos negativo) acumula menos colorante y su despolarización nos marca la pérdida de la funcionalidad de la mitocondria lo cual favorece su degradación (Corona y Duchon 2014; Perry *et al.* 2011).

La biogénesis mitocondrial es de especial importancia en la neuroquímica moderna debido al amplio espectro de enfermedades que se origina por defectos en la mitocondria y el balance de radicales libres en su interior, la cantidad de energía producida y la morfología. Las disfunciones mitocondriales son la principal fuente de enfermedades neurodegenerativas y desórdenes del desarrollo neuronal. El mantenimiento de mitocondrias sanas y estables es crucial para el desarrollo neuronal. Se sabe que debe existir un balance entre la dinámica mitocondrial, fusión mitocondrial, fisión y sistemas de control de calidad, así como la biogénesis mitocondrial. La disminución en la cantidad de mitocondrias o bien, la alteración en cualquiera de los pasos de la biogénesis mitocondrial

es la causa de más de 250 enfermedades asociadas al daño por radicales libres o al estrés oxidativo (Hao *et al.* 2010; Zhu *et al.* 2010).



**FIGURA 6. Esquema del cambio de potencial de membrana mitocondrial.** (modificado de Sukumar *et al.* 2016). El potencial de membrana mitocondrial cambia de acuerdo al paso de protones generado por la fosforilación oxidativa, cuando el interior de la mitocondria es más negativo, está más polarizada y acumula más colorante catiónico (TMRM) en su membrana interna, por el contrario, si el interior de la mitocondria es menos negativo, está despolarizada y acumula menos colorante, la despolarización nos marca la pérdida de la funcionalidad de la mitocondria.

### Estrés oxidativo

Como ya se mencionó, las ROS y también las especies reactivas de nitrógeno (RNS) como óxido nítrico y peroxinitrito son moléculas inestables que reaccionan con otras y causan una alteración en la célula, a lo que se le da el nombre de estrés oxidativo y nitrosativo (Lopresti 2015; Andreazza *et al.* 2008). El estrés oxidativo se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno, que provocan daño oxidativo a las biomoléculas y que no puede ser

contrarrestado por los sistemas antioxidantes, al igual que el estrés nitrosativo, pero éste con nitrógeno.

Recientemente, se ha incrementado el interés en el estrés oxidativo y nitrosativo en TDAH y su potencial para contribuir a esta condición. Por ejemplo, ha aumentado el interés en estudiar las vías inmuno-inflamatorias y el estrés, vinculándose a diversos trastornos psiquiátricos. Se ha confirmado que la depresión está asociada con el incremento del estrés, en relación con los marcadores antioxidantes (Lopresti 2015; Andreatza *et al.* 2008), también en trastorno bipolar se ha observado un incremento de peroxidación, de óxido nítrico y daños en DNA/RNA (Brown *et al.* 2014; Andreatza *et al.* 2008), al igual, el incremento del estrés se ha visto en personas con trastornos de ansiedad (Lopresti 2015), esquizofrenia (Emiliani *et al.* 2014), autismo (Chauhan and Chauhan 2006a) y Alzheimer (Chauhan and Chauhan 2006b). Estas especies reactivas son constantemente producidas, principalmente durante la fosforilación oxidativa en la matriz mitocondrial, así como por una ligera radiación ultravioleta, contaminantes ambientales y por neutrófilos, eosinófilos y macrófagos durante la inflamación. A través de su influencia en proteínas, ácidos grasos y DNA, las ROS y RNS tienen numerosos papeles fisiológicos esenciales involucrados en la regulación de la función celular. En circunstancias normales, las ROS y RNS son eliminadas por defensas celulares antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. Dentro de los mecanismos enzimáticos para las ROS está la superóxido dismutasa 2 (SOD2), que convierte el radical  $O_2^-$  en  $H_2O_2$ , así como la catalasa y la glutatión peroxidasa, las cuales metabolizan  $H_2O_2$  en  $H_2O + O_2$ . Algunas proteínas como albúmina, transferrina, haptoglobina y ceruloplasmina, también funcionan como antioxidantes vinculadas a las ROS y RNS. Sin embargo, si las ROS y RNS no son efectivamente estabilizadas por defensas antioxidantes, pueden causar estrés oxidativo y nitrosativo, como la peroxidación de lípidos (en membranas y organelos), proteínas (receptores y enzimas) y en la estructura genética de la célula por causa del daño al DNA. Algunos órganos son más vulnerables al efecto perjudicial causado por el estrés, debido a su alto nivel de utilización de oxígeno, alto contenido lipídico y baja concentración antioxidante (Lopresti 2015; Andreatza *et al.* 2008).

En un estudio de pacientes de TDAH, se evaluaron los productos finales de la peroxidación lipídica (lípidos dañados), especialmente malondialdehído, a través de

niveles de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS). Se obtuvo como resultado mayores niveles de malondialdehído (producto de peroxidación lipídica) y niveles menores de paraoxonasa y arilesterasa (enzimas contra la peroxidación lipídica) en pacientes con TDAH en comparación con sujetos sanos. Ha sido demostrado que la deficiencia de las enzimas paraoxonasa y arilesterasa, están relacionadas con la susceptibilidad incrementada de peroxidación lipídica, lo cual nos indica que el metabolismo oxidativo resultó ser dañado en TDAH (Andreazza *et al.* 2008; Bulut *et al.* 2013).

Al igual que en el estrés oxidativo, ha sido confirmado un incremento del estrés nitrosativo, ya que se ha demostrado el aumento de la concentración de óxido nítrico en niños y en adultos con TDAH, así como un incremento en la actividad de la óxido nítrico sintasa en niños con TDAH (Lopresti 2015; Ceylan *et al.* 2012). Esto se observa en otro estudio, donde se midieron en suero los cambios en niveles de actividad de óxido nítrico sintasa, xantina oxidasa, glutatión S-transferasa y paraoxonasa-1, los cuales son marcadores importantes de estrés y la actividad de adenosin deaminasa, un marcador de inmunidad celular. La inmunidad celular contribuye bastante a la ocurrencia del trastorno por células neuronales dañadas, similar al metabolismo oxidativo. La actividad de la óxido nítrico sintasa, xantina oxidasa y adenosin deaminasa en pacientes adultos con TDAH, es significativamente mayor que en sujetos sanos. La actividad de la glutatión S-transferasa y paraoxonasa-1 fue significativamente menor en adultos con TDAH que en los controles (Ceylan *et al.* 2012).

Es necesario que se realicen más estudios para clarificar los efectos neurobiológicos en la ATX ya que no se tiene claro el efecto que causa en este sistema, aunado al hecho de que el TDAH ya está por si mismo relacionado al estrés oxidativo y nitrosativo (Lopresti 2015).



## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

Los mecanismos y las posibles consecuencias a nivel mitocondrial debido a la exposición de ATX son poco conocidos o aún desconocidos. Sin embargo, se ha demostrado que el TDAH produce estrés oxidativo en regiones cerebrales, así mismo, la ATX afecta algunas vías de transducción de señales. Por lo tanto, en este trabajo se estudiarán las posibles consecuencias a nivel mitocondrial debido al tratamiento con ATX en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano, diferenciadas a un fenotipo parecido a neuronas.

### III. JUSTIFICACIÓN

---

Se ha demostrado en distintos estudios que la ATX tiene varios mecanismos de acción adicionales a la inhibición de la recaptura de la noradrenalina, estos mecanismos no están aún bien definidos. Por lo tanto, nosotros estudiaremos si la administración de ATX produce algún tipo de alteración en la función mitocondrial, con lo cual podría haber efectos no contemplados en las células, particularmente en las neuronas.

Diversas evidencias indican que la diferenciación de las células SH-SY5Y resulta en un fenotipo neuronal maduro y funcional. Si bien la diferenciación de las células SH-SY5Y difieren de las neuronas maduras del humano, estas células diferenciadas puede ser un modelo celular ideal, ya que poseen más similitud bioquímica, ultraestructural, morfológica y electrofisiológica a las neuronas maduras.

#### **IV. HIPÓTESIS**

---

El tratamiento con ATX producirá alteraciones en potencial de membrana mitocondrial y en la masa mitocondrial en células SH-SY5Y diferenciadas.

## V. OBJETIVOS

---

### **Objetivo general**

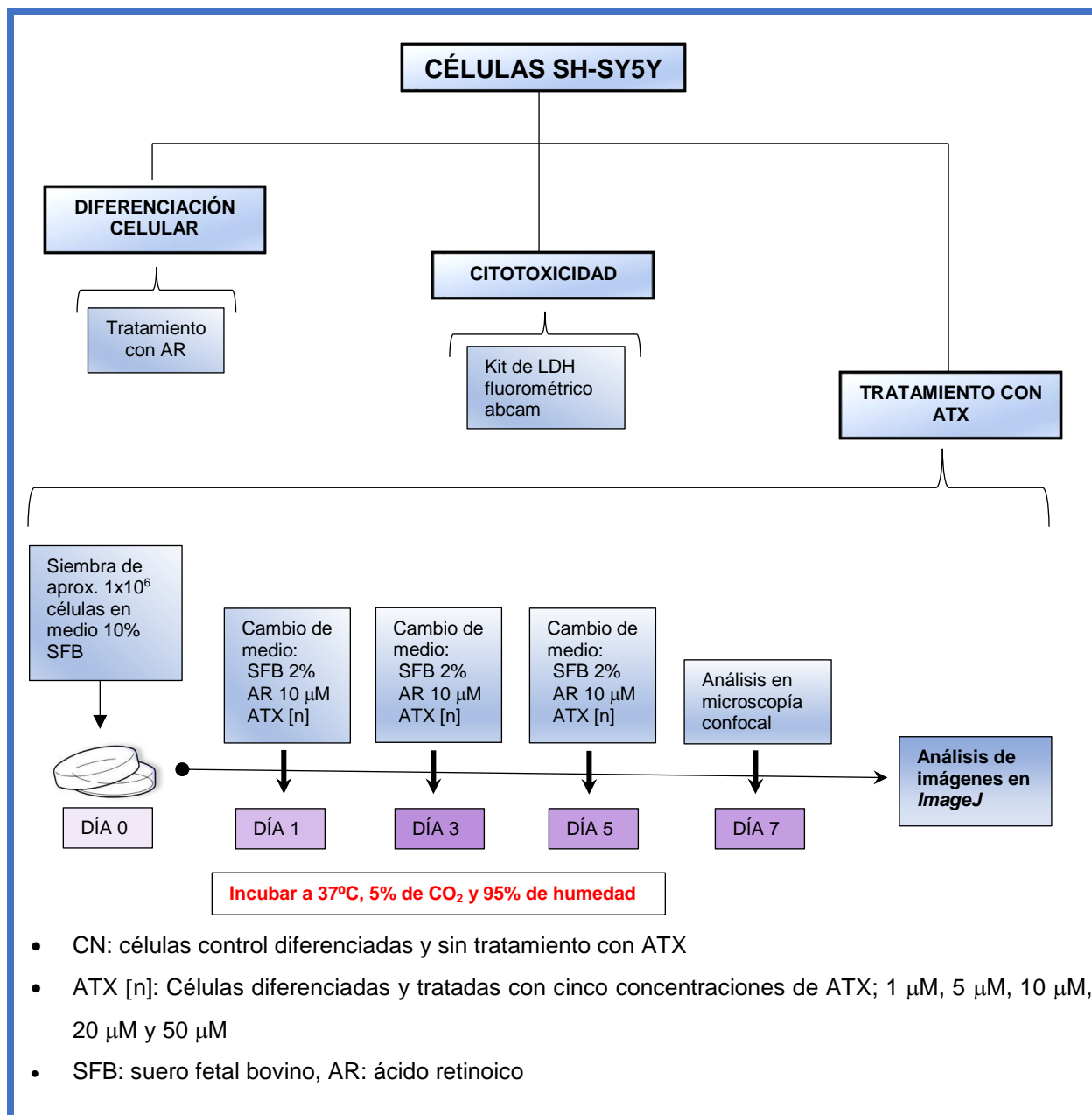
Estudiar los cambios en el potencial de membrana y masa mitocondrial con diferentes concentraciones de ATX en células SH-SY5Y diferenciadas.

### **Objetivos particulares**

- 1 Diferenciar células SH-SY5Y a un fenotipo parecido a neuronas.
- 2 Estudiar el efecto del tratamiento con ATX sobre la viabilidad celular.
- 3 Estudiar cambios en el potencial de membrana y masa mitocondrial debido al tratamiento con ATX.

## VI. METODOLOGÍA

### Esquema experimental



**FIGURA 7. Diagrama experimental del tratamiento con ATX.**

## **Cultivo de células SH-SY5Y**

Se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, la cual constituye un valioso modelo celular debido a sus características bioquímicas y fácil manejo (Ferreira *et al.* 2013).

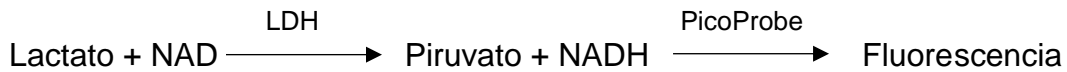
Las células fueron cultivadas en frascos de 75 cm<sup>2</sup> para cultivo celular con medio DMEM/F12 1:1, con suero fetal bovino (SFB) 10%, adicionado con ampicilina, estreptomycin y anfotericina B (antibiótico/antimicótico) 1% y aminoácidos no esenciales 1% (este medio se identifica en este trabajo como medio estándar), en condiciones de incubación de 37°C, CO<sub>2</sub> 5% y humedad al 95%, cambiándoles el medio estándar cada 48 horas hasta llegar a confluencia. Para transferir las células, tanto para multiplicación como para comenzar un tratamiento, se les retiró el medio, se utilizó amortiguador de fosfatos (PBS) 1X para lavar los restos de medio y posteriormente tripsina 0.05% - EDTA 1X para desprenderlas, una vez desprendidas se transfirieron a medio estándar, se centrifugaron a 200 g (1200 rpm) por 5 minutos, se les retiró el medio y se resuspendieron en 1 mL de medio estándar, en este punto, las células que fueron para multiplicar sólo se dividieron para sembrar en botellas nuevas y las que fueron para comenzar un tratamiento; se contaron en cámara de Neubauer para sembrar la cantidad aproximada de células requerida.

## **Diferenciación celular**

Esta línea celular puede ser diferenciada a un fenotipo parecido a las neuronas. Para realizar la diferenciación se agregó ácido trans-retinoico (AR) 10 µM en oscuridad, debido a su sensibilidad a la luz, el ácido retinoico genera cambios en la expresión de genes implicados en la diferenciación y proliferación; produce una parada en el ciclo celular, debido a un incremento en los niveles de la proteína p27 e inhibición de cinasas dependientes de ciclinas y diferencia estas células a un fenotipo parecido a neuronas, la diferenciación se observa al ver las dendritas más alargadas (Korecka *et al.* 2013). Se realizaron tres administraciones de AR 10 µM, una cada 48 horas, al mismo tiempo se disminuyó el porcentaje de SFB de 10% a 2% en el medio para detener el ciclo celular. Se observó la morfología de las células diferenciadas y sin diferenciar en microscopio invertido de campo claro, para comprobar el alargamiento de las neuritas (ver **figura 8**).

## Viabilidad celular

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima estable y se presenta en todos los tipos de células, el daño celular conduce a la liberación de la enzima LDH en el medio y su actividad se utiliza ampliamente como marcador de citotoxicidad. La LDH convierte reversiblemente el lactato en piruvato, con la interconversión concomitante de NADH y NAD<sup>+</sup>.



Para este ensayo se utilizó el kit de citotoxicidad LDH fluorométrico de Abcam (ab197004). Se sembraron 250,000 células por pozo en una placa de 24 pozos, llevando a cabo el proceso ya mencionado de AR y ATX y los respectivos controles negativo (sólo diferenciación), control de LDH (para comprobar que se realizó bien el procedimiento y los reactivos funcionan), de ruido de fondo (sin células, para restar la interferencia del medio) y de lisado (total de células que quedan vivas sin ningún tratamiento). En el séptimo día de tratamiento, se llevaron a temperatura ambiente todos los materiales y reactivos preparados previo a su uso, se les agregó a cada pozo su reactivo correspondiente de acuerdo a la función de cada uno, se recolectaron todos los sobrenadantes y se centrifugaron a 200 g (1200 rpm) por 3 min a 4°C para descartar restos celulares, se realizó la dilución con agua y se agregó 5 µL de cada muestra y 95 µL de la mezcla de reacción preparada previamente siguiendo indicaciones del kit, finalmente se analizaron las muestras, absorbiendo a una longitud de onda de 535 nm y emitiendo en 587 nm.

### Tratamiento con ATX

Se sembraron aproximadamente  $1 \times 10^6$  células en una placa en una caja de petri de 35x10 mm para cultivo celular, en la que previamente se introdujo un cubreobjetos circular de 22 mm de diámetro con 2 mL de medio estándar y se incubó por 24 horas en condiciones estándar, esto se hace con el fin de permitir que se adhieran las células al cubreobjetos. Después de 24 horas, y al mismo tiempo que se diferenciaron las células se le agregó la cantidad requerida de ATX tres veces, una cada 48 horas y con cinco

concentraciones diferentes de ATX: 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M y 50  $\mu$ M, y los respectivos controles de células diferenciadas y sin ATX.

### **Microscopía confocal**

La microscopía confocal es una poderosa herramienta de visualización de especímenes fluorescentes, la principal ventaja es que este revela estructuras tridimensionales, recogiendo selectivamente la luz de una sección óptica en el plano de enfoque de la muestra. Una vista tridimensional de la muestra puede reconstruirse a partir de una serie de secciones ópticas a diferentes profundidades (Smith 2011).

Se utilizó un microscopio confocal (Zeiss Axiovert 100M) con un objetivo Plan-Neofluar 63x/1.25 en aceite de inmersión a temperatura ambiente. Se excitó la fluorescencia del TMRM a 543 nm y la calceína-AM fue excitada a una longitud de onda de 488 nm. La potencia del láser se mantuvo lo más baja posible para evitar el blanqueo (bleaching) de la señal o destrucción de las moléculas fluorescentes.

A la muestra se le retiró el medio del tercer tratamiento con ATX, se le hizo un lavado de HBSS a 37 °C y posteriormente se le agregó 1 mL de la solución salina balanceada de Hank (HBSS), la cual es una solución con presión osmótica y pH parecidos al de las células, con los colorantes fluorescentes TMRM 25 nM para teñir las mitocondrias (rojo) y calceína-AM 1  $\mu$ M para teñir el citoplasma (verde) y delimitar a las células, también se le agregó ácido plurónico 2  $\mu$ M, el cual es un detergente de baja toxicidad que se utiliza para facilitar la entrada de los colorantes a través de la membrana, se incubó por 25 minutos en las condiciones mencionadas. Pasado ese tiempo se le retiró la solución y se le agregó 1 mL de HBSS a 37°C y se llevó a analizar. Se introdujo el cubreobjetos en los aros metálicos del microscopio confocal y se le agregaron 800  $\mu$ L de HBSS con TMRM a una concentración final de 25 nM. Se obtuvieron 5 imágenes en el plano Z (5 Z stack).

### **Cuantificación de potencial de membrana y masa mitocondrial**

Las imágenes se analizaron utilizando el programa de software *ImageJ* 1.50i (Wayne Rasband). Para cada imagen en el plano Z, los dos canales, calceína y TMRM fueron separados, posteriormente se le restó la fluorescencia de fondo (ejemplo umbral), para adquirir dos imágenes binarias separadas. La proporción del citoplasma (teñido con



calceína-AM) ocupada por la red mitocondrial (teñida con TMRM) se calculó a partir del área de ambas imágenes, calculando la ocupación del volumen mitocondrial (masa mitocondrial) del citosol. Se obtuvieron diez células por campo y al menos cinco campos por muestra, dando un total de mínimo 50 células por muestra analizadas individualmente con una n=6.

### **Análisis estadístico**

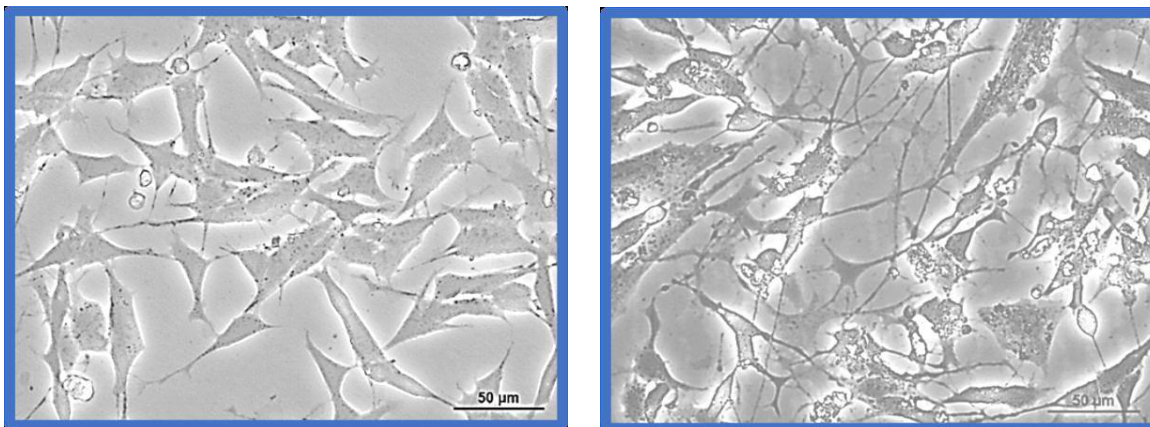
Los valores de los promedios  $\pm$  error estándar, de al menos 6 experimentos fueron analizados por ANOVA de una vía y tomando en cuenta el nivel mínimo de significancia del 95%, por lo que se consideraron como diferencias significativas cuando los valores fueron de  $p < 0.05$  con respecto al control.

## VII. RESULTADOS

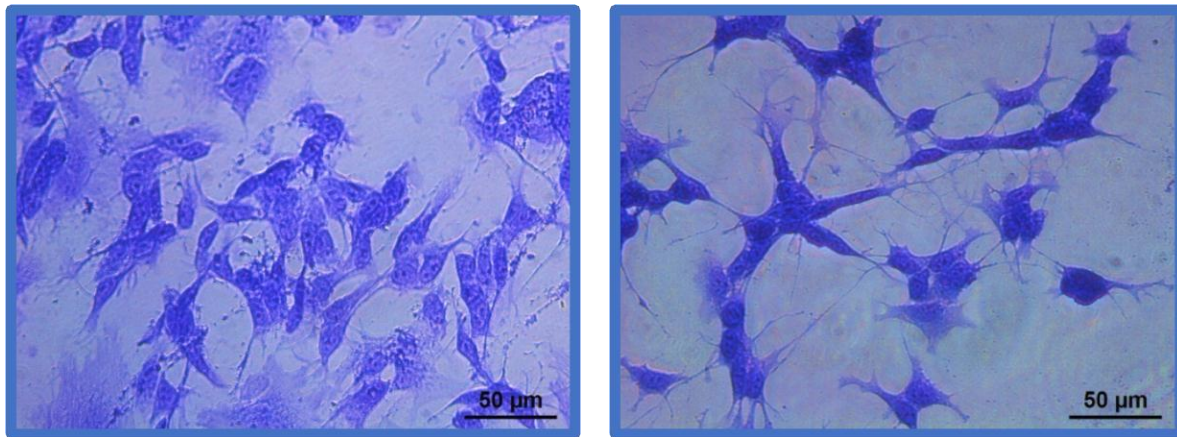
---

### Diferenciación celular

Para comprobar la diferenciación de las células SH-SY5Y hacia un fenotipo parecido a neuronas con AR, se realizaron varios ensayos con dicho reactivo, como se puede observar en la **figura 8**, a la izquierda se muestran las células sin diferenciar donde se ven de una forma compacta y a la derecha las células diferenciadas, las cuales se observan con dendritas alargadas simulando una red. Para resaltar mejor su morfología se realizó una tinción con cristal violeta, como se observa en la **figura 9**, la imagen de la izquierda muestra las células sin diferenciar, mientras que a la derecha se observan las células diferenciadas donde se aprecian las dendritas alargadas, lo cual nos indica que el AR activó los genes específicos para que estas células se diferenciaron a un fenotipo parecido a neuronas, como ha sido demostrado en la literatura (Encinas *et al.* 2000).



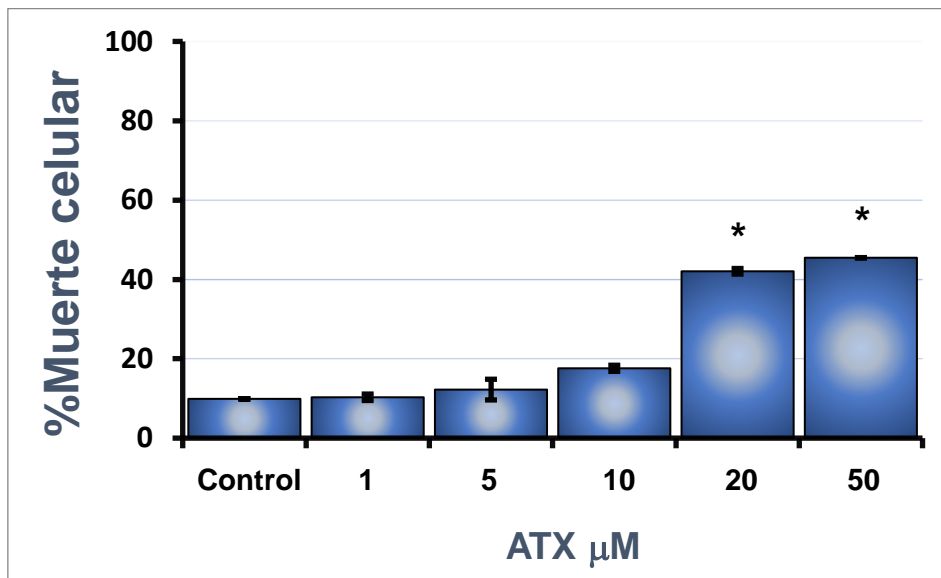
**FIGURA 8. Diferenciación de células SH-SY5Y a un fenotipo parecido a neuronas.** Micrografías tomadas con microscopio invertido de campo claro, a la izquierda se observan células sin diferenciar, a la derecha células diferenciadas con tres adiciones de AR 10  $\mu$ M en intervalos de 48 horas, se observan sus dendritas alargadas, características de éstas.



**FIGURA 9. Diferenciación de células SH-SY5Y hacia un fenotipo parecido a neuronas, con tinción de cristal violeta.** Micrografías tomadas con microscopio invertido de campo claro, a la izquierda se observan células sin diferenciar, a la derecha células diferenciadas con tres adiciones de AR 10 µM en intervalos de 48 horas, teñidas con cristal violeta, el cual nos permite observar más detalladamente la diferenciación.

#### Ensayo de viabilidad celular

Para determinar si hay citotoxicidad por parte de la ATX, se realizó un ensayo utilizando la enzima LDH como marcador, en la **figura 10** se puede ver el efecto del fármaco en diferentes concentraciones, la mayor muerte celular se da a partir de la concentración de 20 µM, habiendo un incremento significativo de 31.16% y de 35.58% para 50 µM.



**FIGURA 10. Elevadas concentraciones de ATX producen muerte en las células SH-SY5Y diferenciadas.** En la barra de control se analizó la muerte de células diferenciadas y sin tratamiento de ATX.

En las barras posteriores se analizó la muerte en células diferenciadas y con concentraciones de ATX 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$  respectivamente, sin encontrar una diferencia significativa con respecto al control. Las concentraciones con ATX 20  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  (\*), presentan una diferencia significativa con respecto al control.

Datos presentados como media  $\pm$  error estándar,  $p < 0.05$  con respecto al control,  $n=3$  independientes.

### **Efecto del tratamiento con ATX sobre el potencial de membrana mitocondrial en células SH-SY5Y diferenciadas**

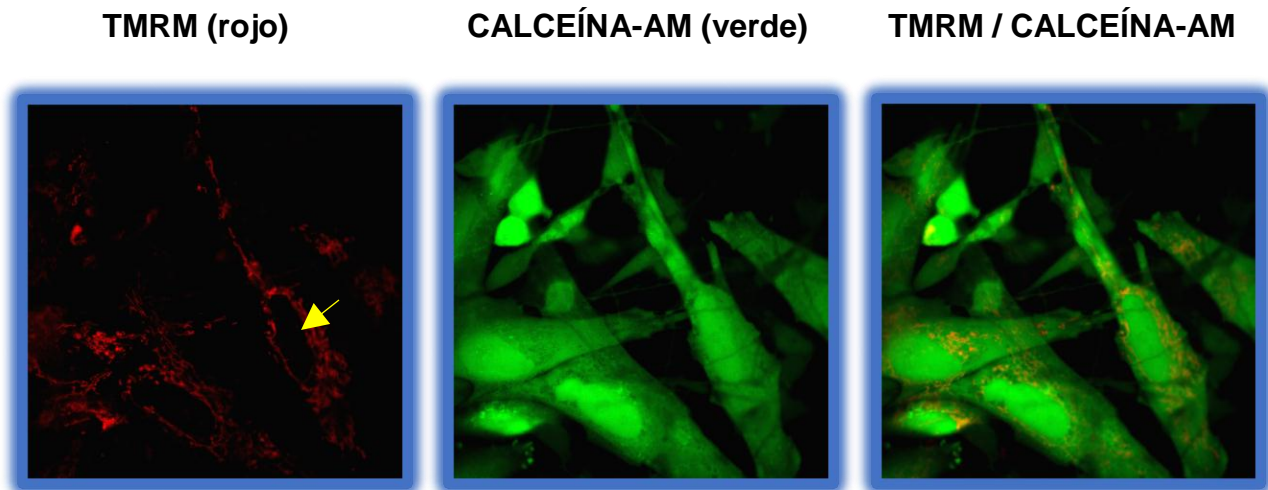
Para determinar si el tratamiento con ATX podía alterar la función mitocondrial, las células fueron teñidas con el colorante TMRM y se utilizó microscopía confocal en tiempo real para poder observar cambios en el potencial de membrana mitocondrial. En la **figura 11** se pueden observar las imágenes representativas de las células control, obtenidas con el microscopio confocal, así como en las **figuras 12, 13, 14, 15 y 16** tratadas con diferentes concentraciones de ATX y en donde se observa la disminución del tamaño de las células conforme aumenta la concentración de ATX, así como también disminuye la intensidad del colorante y su extensión de neuritas, finalmente en la **figura 17** se observa la cuantificación del potencial. El tratamiento con ATX 50  $\mu\text{M}$  durante 7 días causó una disminución del 17.56 % en el potencial de membrana mitocondrial (**figura 17**) con respecto al control, mostrando que la ATX es capaz de inducir un efecto directo en la disfunción mitocondrial. Sin embargo, el tratamiento con las concentraciones de 1, 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$  no produjo cambios significativos en el potencial de membrana mitocondrial (**figuras 12, 13, 14 y 15**).

### **Efecto del tratamiento con ATX sobre la masa mitocondrial en células SH-SY5Y diferenciadas**

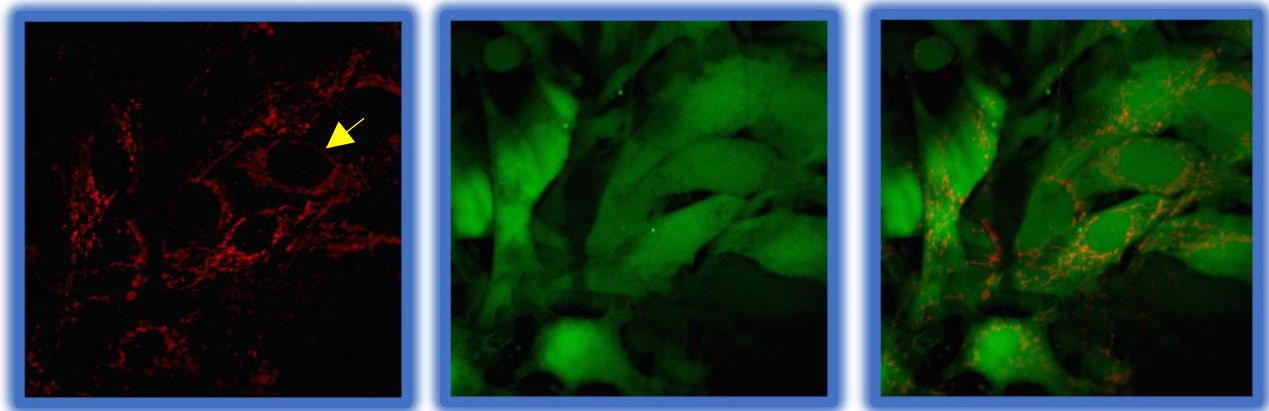
Como fue mencionado en la introducción, se ha demostrado que una disminución en la cantidad de mitocondrias o bien, la alteración en cualquiera de los pasos de la biogénesis mitocondrial es la causa de enfermedades asociadas a un incremento en el estrés oxidativo. Por lo tanto, nosotros nos preguntamos si el tratamiento con ATX altera la biogénesis mitocondrial. Con el fin de evaluar la masa mitocondrial, las células fueron co-teñidas con TMRM para teñir las mitocondrias y con calceína-AM para teñir el citosol, permitiendo así la medición del volumen que ocupa la masa mitocondrial dentro de las

dimensiones del citosol, las **figuras 11, 12, 13, 14, 15 y 16** son representativas de las distintas concentraciones y se puede apreciar la disminución de la masa mitocondrial conforme aumenta la concentración de ATX a excepción de la concentración de ATX 10  $\mu\text{M}$  donde se observa un ligero aumento de esta. Así mismo, obteniendo los datos finales, se comprueba que el tratamiento con ATX 10  $\mu\text{M}$  durante 7 días causó un incremento de 14.66% en la masa mitocondrial (**figura 18**). Sin embargo, conforme se incrementó la concentración se observó una disminución significativa de 13.34% con ATX 50  $\mu\text{M}$ , con respecto al control (**figura 18**), mostrando en este estudio que la ATX puede tener un efecto dual, tanto positivo y negativo dependiendo de la concentración utilizada.

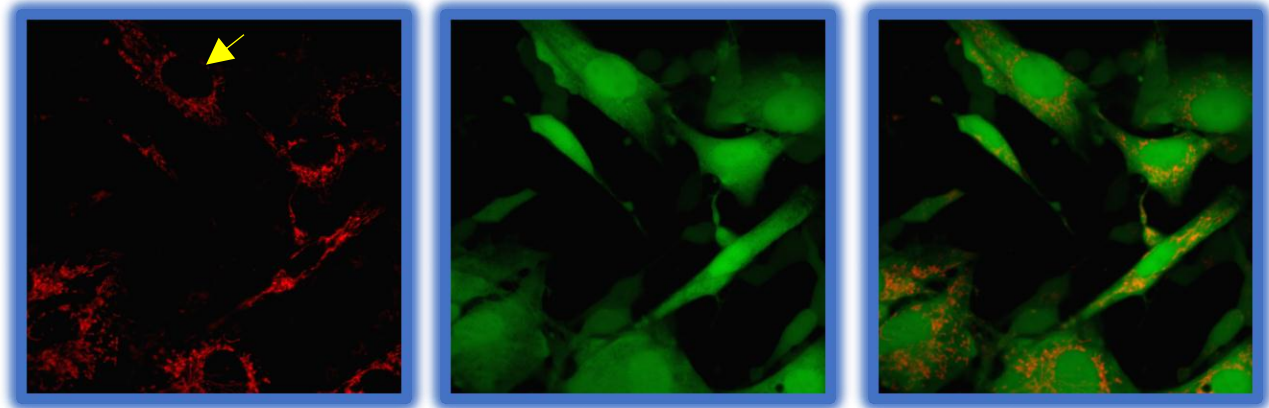
### IMÁGENES REPRESENTATIVAS



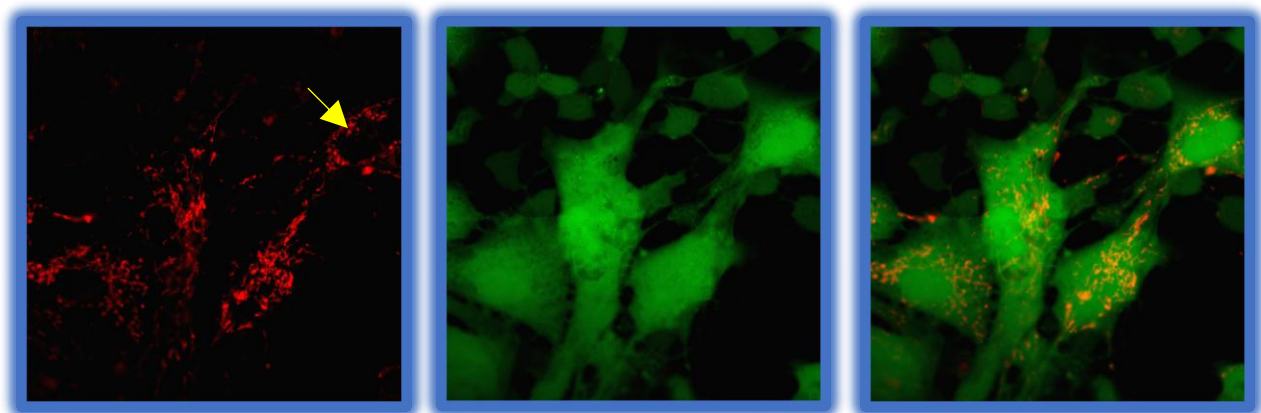
**FIGURA 11. Células SH-SY5Y diferenciadas (control).** Mitochondrias teñidas con TMRM (rojo), mostradas con intensidad en toda la célula y alrededor de un núcleo definido (flecha amarilla). Citoplasmas celulares teñidos con calceína-AM (verde), las células se ven definidas, mostrando un núcleo más intenso que el resto de la célula. Imágenes sobrepuestas de mitochondrias y citoplasma (imagen derecha), pudiendo relacionar la cantidad de mitochondrias con respecto al tamaño total de la célula. n=6.



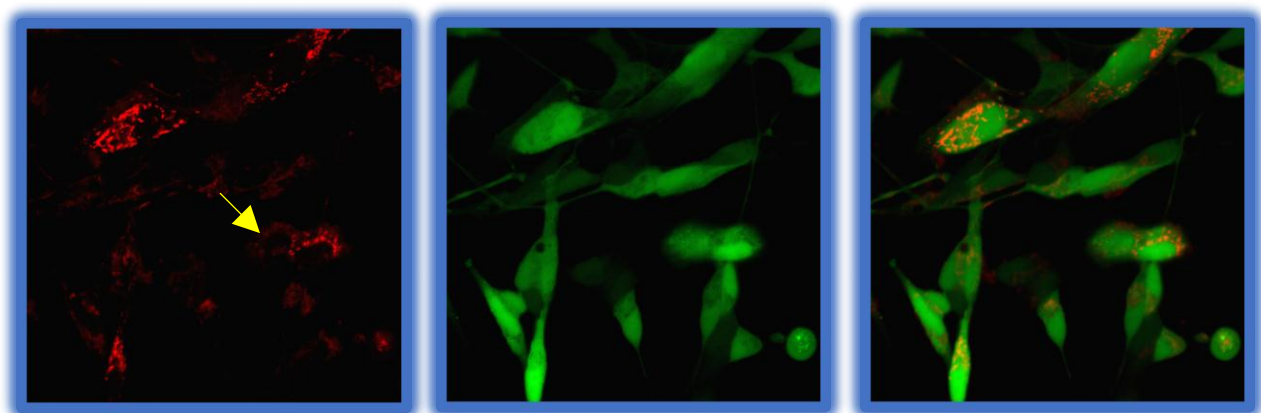
**Figura 12. Células SH-SY5Y diferenciadas y tratadas con ATX 1  $\mu$ M.** Se observan células y mitocondrias del mismo tamaño e intensidad que en el control (figura 11), con núcleos bien definidos flecha amarilla). n=6.



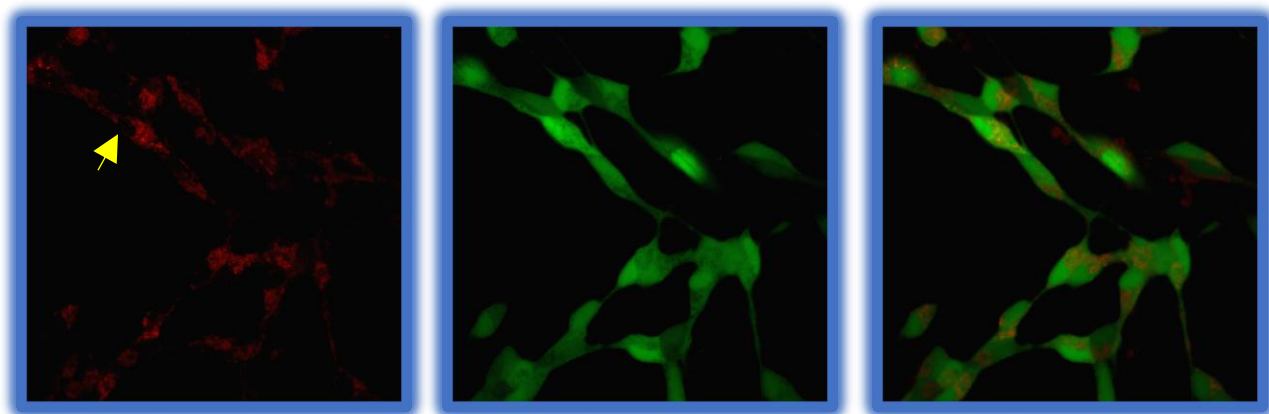
**Figura 13. Células SH-SY5Y diferenciadas y tratadas con ATX 5  $\mu$ M.** Las células se observan ligeramente más pequeñas, con núcleos definidos (flecha amarilla), los núcleos en citoplasma se ven con menor intensidad que en las células sin tratamiento. n=6.



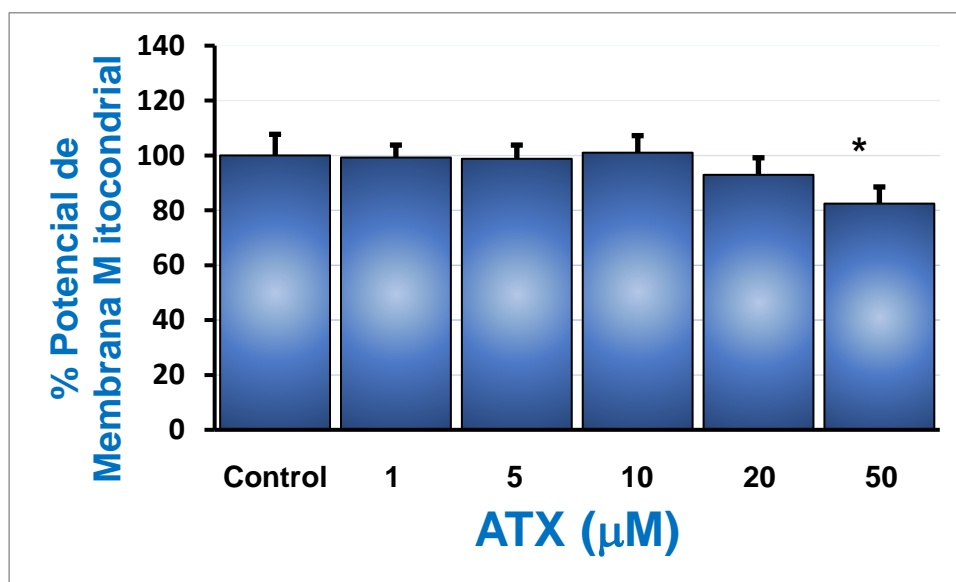
**Figura 14. Células SH-SY5Y diferenciadas y tratadas con ATX 10  $\mu$ M.** Las células y núcleos (flecha amarilla) son ligeramente difusos con mayor cantidad mitocondrial, esto nos indica que hay un aumento en la biogénesis mitocondrial. n=6.



**Figura 15. Células SH-SY5Y diferenciadas y tratadas con ATX 20  $\mu$ M.** Las células se observan más pequeñas, con menor intensidad mitocondrial y núcleos muy pequeños y difusos (flecha amarilla). Hay encogimiento celular, muestra del daño que comienzan a sufrir, con lo cual disminuye la intensidad de la fluorescencia con TMRM, relacionando una menor cantidad mitocondrial con respecto al tamaño total de la célula. n=6.



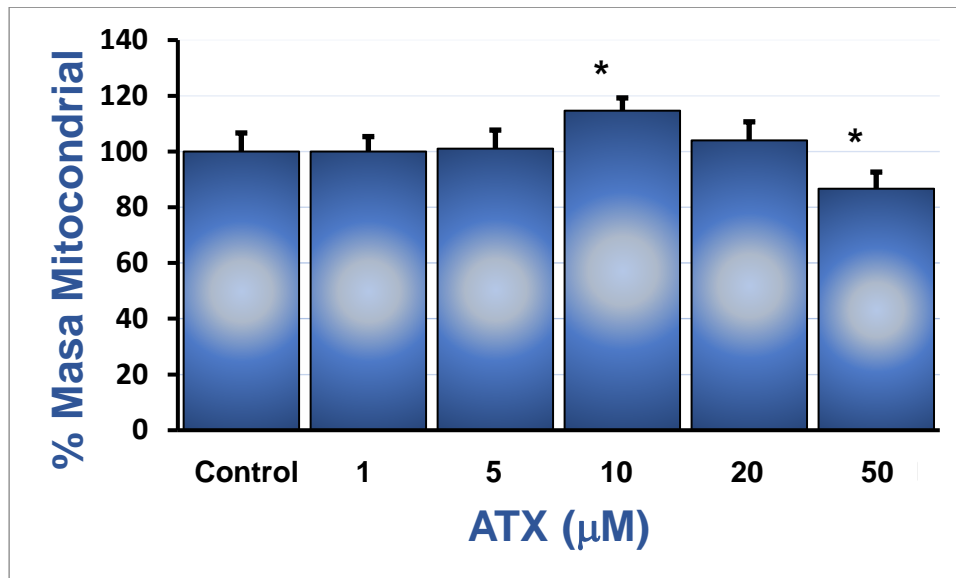
**Figura 16. Células SH-SY5Y diferenciadas y tratadas con ATX 50  $\mu\text{M}$ .** Las células muestran un marcado encogimiento y son mucho más pequeñas, con intensidad mitocondrial muy tenue y núcleos apenas visibles (flecha amarilla). n=6.



**FIGURA 17. Efecto de la ATX sobre el potencial de membrana mitocondrial en células SH-SY5Y.** En la barra de control se analizaron células diferenciadas sin tratamiento con ATX. Las barras posteriores muestran el análisis de células diferenciadas y con diferentes concentraciones de ATX, en las cuales sólo ATX 50  $\mu\text{M}$  (\*) muestra una disminución significativa de 17.56% con respecto al control.

Datos presentados como media  $\pm$  error estándar,  $p < 0.05$  con respecto al control, n=6 independientes.





**FIGURA 18. Efecto de la ATX sobre la masa mitocondrial en células SH-SY5Y.** En el control se analizaron células diferenciadas y sin tratamiento con ATX. Las barras posteriores son de células diferenciadas y con distintas concentraciones de ATX, de las cuales ATX 10 y 50 µM (\*) muestra un aumento significativo de 14.66% y una disminución significativa de 13.34% respectivamente, en relación al control. Datos presentados como media ± error estándar,  $p < 0.05$  con respecto al control,  $n = 6$  independientes.

## VIII. DISCUSIÓN

---

La ATX es un inhibidor de la recaptura de la noradrenalina, la cual se utiliza para el tratamiento del TDAH, sin embargo, se ha relacionado con diversos mecanismos adicionales que podrían alterar la función mitocondrial y celular, es un fármaco acumulativo, el cual presenta un efecto que dura o incluso se amplifica después de un periodo libre de fármaco por dos meses (Patrick *et al.* 2013). Este es comúnmente utilizado por largos periodos de tiempo, lo que puede conducir a una alteración neuronal. Como se ha mencionado, la ATX tiene mecanismos adicionales a la recaptura de la noradrenalina, se observó que la administración sub crónica de ATX incrementa la expresión y señalización del mRNA del exón IV-BDNF en la corteza prefrontal, estos efectos podrían resultar benéficos para la plasticidad celular y la resistencia neuronal que sostiene la cognición (Fumagalli *et al.* 2010), una de las vías que activa el IV-BDNF es la enzima GSK3 $\beta$ , esta enzima participa en el metabolismo energético celular (Takeuchi *et al.* 2002). Así mismo, se ha reportado que la ATX inhibe los canales GIRK cerebrales GIRK1/2, GIRK2 y cardíaco GIRK1/4, la inhibición de estos canales causa una despolarización del potencial de membrana, resultando en un incremento en la excitabilidad celular, por lo que estos canales tienen una importante función en la regularización de la excitabilidad neuronal, transmisión sináptica y en ritmo cardíaco, debido a esto se presentó una reducción del comportamiento relacionado a la ansiedad, sugiriendo que tiene propiedades ansiolíticas (Kobayashi *et al.* 2010). También se reportó que bloquea receptores tipo NMDA en concentraciones bajas, estos son receptores del glutamato y están asociados a los procesos de aprendizaje, memoria y con el desarrollo y la plasticidad neural (Ludolph *et al.* 2010). Así mismo, se sabe que el tratamiento crónico con ATX afecta varios genes incrementando en la corteza prefrontal la expresión de las subunidades del receptor GABA A, así como Uqcrc2, una enzima del complejo III mitocondrial involucrado en la cadena respiratoria de transporte de electrones y SNAP-2, proteína ligada a la membrana en neuronas, la cual junto con otras moléculas regula la exocitosis vesicular sináptica (Lempp *et al.* 2013).

Aunque no se conoce todo el proceso en estos mecanismos que lleva a cabo la ATX (y lo que aun nos falta por descubrir en su mecanismo general), podemos inferir que los mecanismos arriba descritos participan de alguna forma en la bioenergética celular,

siendo las mitocondrias de gran importancia para el funcionamiento celular bajo condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, están profundamente integradas en la red de señalización de células, por lo tanto, la actividad y calidad de las mitocondrias pueden ser un sensor de daños celulares, siendo así, es de gran importancia verificar la biogénesis, actividad y calidad de procesos mitocondriales o como lo mencionan en su trabajo Harbauer y colaboradores; donde se propone que la maquinaria de importación de proteínas mitocondriales juega un papel importante como centro regulador en el metabolismo, respuesta al estrés y patogenia de las enfermedades, siendo también tomada como un sensor para la aptitud y calidad de las mitocondrias, determinado por el estado energético como cambios en el  $\Delta\psi_m$ , donde una reducción es indicio de una actividad de cadena respiratoria deteriorada; cuando la reducción del  $\Delta\psi_m$  es parcial, el defecto es leve, pero cuando hay una fuerte reducción o disipación del  $\Delta\psi_m$ , hay daño mitocondrial, así mismo, bajos niveles de ATP nos indican una disfunción mitocondrial y bajo estrés, la fusión mitocondrial se verá perjudicada, conduciendo a una fragmentación de las mitocondrias y la posibilidad de eliminar selectivamente las mitocondrias dañadas (Harbauer *et al.* 2014; Haynes y Ron 2010).

Aún hay muchas incógnitas con respecto al mecanismo de la ATX, debido a esto, en nuestro laboratorio de investigación en neurociencias, se está llevando a cabo un proyecto en el que se analizan varios parámetros a nivel celular con el tratamiento de ATX, este trabajo se enfocó en obtener los primeros datos del efecto de la ATX a nivel mitocondrial, para esto, se utilizó un modelo *in vitro* de células SH-SY5Y, esta línea celular tiene la ventaja de poderse manejar, multiplicar y diferenciar con facilidad, teniendo así una línea celular que posee muchas características de neuronas dopaminérgicas: expresan TH y DA- $\beta$ -hidroxilasa, así como el transportador de dopamina (Presgraves *et al.* 2004). Para comprobar este modelo, se llevaron a cabo varios experimentos con tratamiento de AR, en los cuales se observó una marcada disminución de la proliferación celular, tal como nos indica la literatura, donde se explica que el tratamiento con AR detiene el crecimiento y desencadena la diferenciación celular, regulando positiva y negativamente cerca de 40 genes en células SH-SY5Y, entre los que se incluyen factores de transcripción y proteínas relacionadas con el ciclo celular, transducción de señales y funciones neuronales (Korecka *et al.* 2013; Cells *et al.* 2000).

Para el ensayo de viabilidad celular, con las distintas concentraciones de ATX (las concentraciones de ATX fueron seleccionadas de acuerdo a varios artículos publicados en la literatura). Ludolph y colaboradores relacionan las concentraciones de 0.75  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  de ATX con las encontradas en el plasma de pacientes que utilizan este fármaco (Ludolph *et al.* 2010). La viabilidad celular se realizó a través de un ensayo colorimétrico, en donde se mide la LDH, esta es una enzima que se encuentra en todas las células, cuando hay daño celular la enzima es liberada al medio, siendo esta utilizada como marcador de muerte celular (Oraday-Cárdenas 2016). Nosotros encontramos que las concentraciones de ATX 20  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  produjeron alrededor de un 35% de daño celular con respecto al control, esto nos indica que en las concentraciones que se encuentran dentro de un rango terapéutico de la ATX, puede existir hasta un 35% de muerte celular al menos en nuestro modelo. Sin embargo, se ha demostrado en la literatura, en células SH-SY5Y y células U-937 donde se utilizaron concentraciones de ATX 50, 500 y 5000 ng/mL, que existe una disminución en los productos del daño oxidativo del DNA, en las células U-937 la disminución se alcanzó después del tratamiento con ATX 50, 500 y 5000 ng/mL (Schmidt *et al.* 2010). En otros estudios el tratamiento con concentración de ATX 31.25 ng/mL, redujo significativamente la supervivencia celular, y las concentraciones mayores aumentaron la supervivencia celular, los autores concluyeron que los fármacos examinados ejercen diferentes efectos dependientes de la concentración en la supervivencia de células en ambas líneas celulares (Schmidt *et al.* 2010).

Después de observar el efecto del tratamiento con ATX a nivel celular, se efectuaron varios experimentos para determinar el efecto a nivel de la función mitocondrial (el  $\Delta\Psi_m$  y la masa mitocondrial).

El  $\Delta\Psi_m$  generado por las bombas de protones (Complejos I, III y IV) es un componente esencial del proceso de almacenamiento de energía durante la fosforilación oxidativa, junto con el gradiente de protones ( $\Delta\text{pH}$ ),  $\Delta\Psi_m$  forma el potencial transmembrana de iones hidrógeno que se aprovecha para producir ATP. En condiciones normales, la célula mantiene un nivel de  $\Delta\Psi_m$  y ATP, aunque hay fluctuaciones limitadas de ambos factores que pueden ocurrir reflejando actividad fisiológica normal, se cree que esta estabilidad es requisito para el funcionamiento normal celular, este parámetro puede cambiar debido a la actividad fisiológica, sin embargo, estos cambios deben ser transitorios, ya que una alteración prolongada puede comprometer la viabilidad celular, dando lugar a

consecuencias patológicas (Corona y Duchon 2014; Perry *et al.* 2011; Zorova *et al.* 2017). En la **figura 17** se puede observar que hubo una disminución significativa del  $\Delta\psi_m$  cuando se utilizó la concentración de ATX 50  $\mu\text{M}$ , disminuyendo casi un 20% con respecto al control, como ya mencionamos, una disminución del  $\Delta\psi_m$  nos indica una disfunción mitocondrial, lo cual podría explicarse a través del estrés oxidativo; en este sentido, en el laboratorio se llevaron a cabo una serie de experimentos en donde se utilizaron las células SH-SY5Y, bajo las mismas condiciones mencionadas en el trabajo, evaluando el estrés oxidativo mediante la fluorescencia emitida por el dihidroetidio (DHE), el cual es una molécula altamente específica para la detección de anión superóxido, oxidándose a etidio y pasando de una fluorescencia azul a una roja tras su oxidación (Barrientos 1997), en estos experimentos se obtuvo un notorio incremento en la tasa de ROS con ATX 50  $\mu\text{M}$  en comparación con el control, debido a esto, nosotros podemos suponer que la disminución en el  $\Delta\psi_m$  con ATX 50  $\mu\text{M}$  que obtuvimos en nuestros resultados, podría ser debido al estrés oxidativo generado por la ATX, el estrés oxidativo es inducido por ROS, la formación y desintoxicación de ROS está bien equilibrado en condiciones fisiológicas, sin embargo, bajo condiciones fisiopatológicas este equilibrio se altera y cambia hacia el lado de la formación de ROS, la interacción bioquímica de ROS y biomoléculas como lípidos de membrana, proteínas y DNA resultan en daño oxidativo y cambios en las bases de DNA, una mutación en el DNA mitocondrial induce pérdida de la funcionalidad de la cadena fosforilativa que lleva a una disminución en la producción de energía y desgraciadamente, a la producción de una gran cantidad de radicales libres, esto último lleva a más mutaciones en el DNA mitocondrial ocasionando una caída en espiral. Este daño también se puede observar en las **figuras 15** y **16**, en las cuales se muestran las células encogidas, con un núcleo muy pequeño y difuso, menor intensidad fluorescente y las dendritas contraídas, una menor intensidad en el colorante nos indica una entrada menor del colorante catiónico a unas mitocondrias despolarizadas con pérdida de funcionalidad, a pesar de que el daño se observa en la **figura 15** donde se utilizó la concentración de ATX 20  $\mu\text{M}$ , en nuestros resultados no se obtiene una disminución significativa con respecto al control, este cambio significativo se presenta hasta la concentración de ATX 50  $\mu\text{M}$  (**figura 16**).

Otro parámetro medido en este trabajo fue la masa mitocondrial. La biogénesis mitocondrial es el proceso continuo de la formación de nuevas mitocondrias dentro de la

célula, ésta es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis celular y puede ser inducido durante periodos de daño o estrés celular, sin embargo, si algún elemento de este proceso es alterado y las mitocondrias no se recuperan al ritmo deseado, puede ocurrir muerte celular (Perry *et al.* 2011). En nuestros resultados (**figura 18**) se observa que hay un incremento significativo en la masa mitocondrial al tratar las células con una concentración de ATX 10  $\mu\text{M}$ , esto podría ser explicado y correlacionado con el trabajo de Jesinkey y colaboradores (Jesinkey *et al.* 2014), en donde comprobó que la ATX sostiene la expresión de PGC-1 $\alpha$  en ratones tratados con dexametasona, un inductor de atrofia en músculo esquelético, PGC-1 $\alpha$  es un coactivador transcripcional, el cual regula la transcripción de genes que incrementan la biogénesis mitocondrial. Sin embargo, si se aumenta la concentración a ATX 50  $\mu\text{M}$ , la masa mitocondrial disminuye significativamente con una diferencia de 13.34% con respecto al control, esto nos indica que la ATX tiene un efecto dual, el cual es dependiente de la concentración utilizada. Por otra parte, en el laboratorio también se analizó el efecto de ATX sobre el proceso de autofagia, se llevaron a cabo varios experimentos con células SH-SY5Y en las mismas condiciones que en el presente trabajo, utilizando la conversión de LC3-I soluble, a LC3-II unido a lípidos, lo cual se asocia a la formación de autofagosomas (Francesca y Pérez 2008; Levine y Kroemer 2008), donde se obtuvo un incremento significativo en las concentraciones de ATX 20 y 50  $\mu\text{M}$ , esto se comprobó realizando una transfección con LC3B-GFP y posteriormente observando en imágenes confocales el aumento de la fluorescencia punteada de LC3B-GFP a partir de 20 y 50  $\mu\text{M}$ . La autofagia es un proceso por el cual la célula digiere los componentes u organelos de su propio citoplasma como respuesta a la falta de nutrimentos, el efecto de ciertas citotoxinas, la presencia de agregados no funcionales o para eliminar organelos dañados (mitocondrias), siendo un mecanismo de supervivencia celular. En nuestros datos con la concentración de 20  $\mu\text{M}$  no se obtuvo un cambio significativo con respecto al control, sin embargo, como explicamos, con 50  $\mu\text{M}$  hubo una disminución de 13.34% en relación al control, lo cual se podría explicar a través de la autofagia como un efecto alterno a la recaptura de la noradrenalina con la ATX.

La ATX ha demostrado presentar diversos mecanismos alternos a la recaptura de noradrenalina, algunos incluso podrían ser parte de la terapéutica sin haberse

considerado como objetivo desde un principio (como es el caso del incremento de SNAP-25, involucrado en efectos de exocitosis de neurotransmisores (Lempp *et al.* 2013)), sin embargo, todos estos mecanismos en conjunto modifican la maquinaria celular, creando posibles efectos negativos como se ha comprobado en el presente trabajo. Aun nos falta mucho por saber respecto al mecanismo de este fármaco y del TDAH, pero con cada paso nos vamos acercando más a comprender este trastorno y por lo tanto a mejorar su tratamiento.

## IX. CONCLUSIONES

---

En conclusión, el tratamiento con ATX demostró que produce daño en nuestro modelo neuronal en un rango de concentración entre 20 y 50  $\mu\text{M}$ , lo cual se correlacionó con el efecto que tuvo sobre la función mitocondrial como fue demostrado por la disminución en el  $\Delta\psi_m$  en concentraciones similares al rango encontrado en plasma de pacientes tratados con ATX.

Así mismo, encontramos que la ATX tuvo efectos duales sobre la masa mitocondrial, dependientes de la concentración utilizada.



## **X. PERSPECTIVAS**

---

Sería interesante comprobar si la concentración de ATX 10  $\mu\text{M}$  tiene el mismo efecto positivo en algún otro modelo ya sea línea celular o modelo animal en el cual permita verificar el incremento en la biogénesis mitocondrial.

Para corroborar estos datos se podrían evaluar los diferentes complejos de la cadena de transporte de electrones (OXPHOS coctel de anticuerpos) y verificar si en las concentraciones de 20 y 50  $\mu\text{M}$  hay cambios a nivel de proteína en los distintos complejos mitocondriales.

## XI. REFERENCIAS

---

- Andreazza A. C., Kauer-Sant'Anna M., Frey B. N., Bond D. J., Kapczinski F., Young L. T., Yatham L. N. (2008) Oxidative stress markers in bipolar disorder: A meta-analysis. *J. Affect. Disord.* 111, 135–144.
- Barrientos R. C. C. J. E. O. A. A. (1997) *Microscopia confocal y estres oxidativo en celulas*. España.
- Biederman J. (2005) Attention-deficit/hyperactivity disorder: A selective overview. *Biol. Psychiatry* 57, 1215–1220.
- Biederman J., Faraone S. V., Keenan K., Knee D., Tsuang M. T. (1990) Family-Genetic and Psychosocial Risk Factors in DSM-III Attention Deficit Disorder. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 29, 526–533.
- Biederman J., Faraone SV., Keenan K., Benjamin J., Krifcher B., Moore C., Sprich-Buckminster S., Ugaglia K., Jellinek MS., Seingard R., et al., Further evidence for family-genetic risk factors in attention deficit hyperactivity disorder. Patterns of comorbidity in probands and relatives psychiatrically and pediatrically referred samples. *Arch. Gen. Psychiatry*.49, 728-38.
- Brown N. C., Andreazza A. C., Young L. T. (2014) An updated meta-analysis of oxidative stress markers in bipolar disorder. *Psychiatry Res.* 218, 61–68.
- Bulut M., Selek S., Bez Y., Cemal Kaya M., Gunes M., Karababa F., Celik H., Asuman Savas H. (2013) Lipid peroxidation markers in adult attention deficit hyperactivity disorder: New findings for oxidative stress. *Psychiatry Res.* 209, 638–642.
- Encinas M., Iglesias M., Liu Y., Wang H., Ceña V., Gallego C., Comella J.X. (2000) Sequential Treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells, *J. Neurochem*, Volume 75, Issue 3, September 2000, Pages 991-1003.
- Ceylan M. F., Sener S., Bayraktar A. C., Kavutcu M. (2012) Changes in oxidative stress and cellular immunity serum markers in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 66, 220–226.
- Chamberlain S. R., Campo N. del, Dowson J., Müller U., Clark L., Robbins T. W., Sahakian B. J. (2007) Atomoxetine Improved Response Inhibition in Adults with Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol. Psychiatry* 62, 977–984.
- Chauhan A., Chauhan V. (2006a) Oxidative stress in autism. *Pathophysiology* 13, 171–181.
- Chauhan V., Chauhan A. (2006b) Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology* 13, 195–208.
- Corona and Duchon M. (2014) *Brain Energy Metabolism, chapter 7: Mitochondrial bioenergetics assessed by functional fluorescence dyes*.
- Del Campo N., Chamberlain S. R., Sahakian B. J., Robbins T. W. (2011) The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-

- deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 69, e145–e157.
- Dorval K. M., Wigg K. G., Crosbie J., Tannock R., Kennedy J. L., Ickowicz A., Pathare T., Malone M., Schachar R., Barr C. L. (2007) Association of the glutamate receptor subunit gene GRIN2B with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Genes, Brain Behav.* 6, 444–452.
- Durston S., Belle J. Van, Zeeuw P. De (2011) Differentiating frontostriatal and frontocerebellar circuits in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 69, 1178–1184.
- Emiliani F. E., Sedlak T. W., Sawa A. (2014) Oxidative stress and schizophrenia. *Curr. Opin. Psychiatry* 27, 185–190.
- Eric R. Kandel et al. (2001) *Principios de neurociencia*. McGraw Hill, Madrid.
- Faraone S. V., Asherson P., Banaschewski T., Biederman J., Buitelaar J. K., Ramos-Quiroga J. A., Rohde L. A., Sonuga-Barke E. J. S., Tannock R., Franke B. (2015) Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 1, 15020.
- Ferreira P. S., Nogueira T. B., Costa V. M., Branco P. S., Ferreira L. M., Fernandes E., Bastos M. L., Meisel A., Carvalho F., Capela J. P. (2013) Neurotoxicity of “ecstasy” and its metabolites in human dopaminergic differentiated SH-SY5Y cells. *Toxicol. Lett.* 216, 159–170.
- Francesca P. P. G.-X. R. F., Pérez S. A. R. (2008) LC3-I conversion to LC3-II does not necessarily result in complete autophagy. *Int. J. Mol. Med.* 22, 781–785.
- Fumagalli F., Cattaneo A., Caffino L., Ibba M., Racagni G., Carboni E., Gennarelli M., Riva M. A. (2010) Sub-chronic exposure to atomoxetine up-regulates BDNF expression and signalling in the brain of adolescent spontaneously hypertensive rats: Comparison with methylphenidate. *Pharmacol. Res.* 62, 523–529.
- Gizer I. R., Ficks C., Waldman I. D. (2009) Candidate gene studies of ADHD: A meta-analytic review. *Hum. Genet.* 126, 51–90.
- Gómez Puyou M. T. de; J. J. G. T. (2015) La bioenergética, las mitocondrias y la fosforilación oxidativa. *Rev. Digit. Univ. UNAM* 16.
- Hao J., Shen W., Yu G., Jia H., Li X., Feng Z., Wang Y., et al. (2010) Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* 21, 634–644.
- Harbauer A. B., Zahedi R. P., Sickmann A., Pfanner N., Meisinger C. (2014) The protein import machinery of mitochondria - A regulatory hub in metabolism, stress, and disease. *Cell Metab.* 19, 357–372.
- Haynes C. M., Ron D. (2010) The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis. *J. Cell Sci.* 123, 3849–3855.
- Hemrick-luecke S. K., Threlkeld P. G., Heiligenstein J. H., Morin S. M., Gehlert D. R., Ph D., Perry K. W. (2002) Atomoxetine Increases Extracellular Levels of Norepinephrine and Dopamine in Prefrontal Cortex of Rat : A Potential Mechanism for Efficacy in Attention Deficit / Hyperactivity Disorder. 2.
- Jesinkey S. R., Korrapati M. C., Rasbach K. A., Beeson C. C., Schnellmann R. G. (2014) Atomoxetine Prevents Dexamethasone-Induced Skeletal Muscle Atrophy in

- Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 351, 663–673.
- Jha S., Dong B. E., Xue Y., Delotterie D. F., Vail M. G., Sakata K. (2016) Antidepressive and BDNF effects of enriched environment treatment across ages in mice lacking BDNF expression through promoter IV. *Transl. Psychiatry* 6, e896.
- Kobayashi T., Washiyama K., Ikeda K. (2010) Inhibition of G-protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by the selective norepinephrine reuptake inhibitors atomoxetine and reboxetine. *Neuropsychopharmacology* 35, 1560–1569.
- Korecka J. A., Kesteren R. E. van, Blaas E., Spitzer S. O., Kamstra J. H., Smit A. B., Swaab D. F., Verhaagen J., Bossers K. (2013) Phenotypic Characterization of Retinoic Acid Differentiated SH-SY5Y Cells by Transcriptional Profiling. *PLoS One* 8.
- Lempp T., Toennes S. W., Wunder C., Russe O. Q., Möser C. V., Kynast K. L., Freitag C. M., Niederberger E. (2013) Altered gene expression in the prefrontal cortex of young rats induced by the ADHD drug atomoxetine. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 40, 221–228.
- Levine B., Kroemer G. (2008) Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* 132, 27–42.
- Lopresti A. L. (2015) Oxidative and nitrosative stress in ADHD: possible causes and the potential of antioxidant-targeted therapies. *ADHD Atten. Deficit Hyperact. Disord.* 7, 237–247.
- Ludolph A. G., Udvardi P. T., Schaz U., Henes C., Adolph O., Weigt H. U., Fegert J. M., Boeckers T. M., Föhr K. J. (2010) Atomoxetine acts as an NMDA receptor blocker in clinically relevant concentrations. *Br. J. Pharmacol.* 160, 283–291.
- McKee T. J. R. M. (2014) *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida*. McGraw Hill, México.
- Motaghinejad M., Motevalian M., Shabab B. (2016) Effects of chronic treatment with methylphenidate on oxidative stress and inflammation in hippocampus of adult rats. *Neurosci. Lett.* 619, 106–113.
- Murray R. K. et al. (2010) *Bioquímica ilustrada*. McGraw Hill, China.
- Oraday-Cárdenas C. R.-M. M. A. (2016) *Investigación en plantas de importancia médica*. Omniascience, México.
- Patrick U., Karl F., Carolin H., Stefan L., Jens D. B. T. L. A. (2013) Atomoxetine affects transcription/translation of the NMDA receptor and the norepinephrine transporter in the rat brain - an in vivo study. *Drug Des. Devel. Ther.* 7, 1433–1446.
- Perry S. W., Norman J. P., Barbieri J., Brown E. B., Gelbard H. A. (2011) Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: A practical usage guide. *Biotechniques* 50, 98–115.
- Polanczyk G., Lima M. S. De, Horta B. L., Biederman J., Rohde L. A. (2007) The worldwide prevalence of ADHD: A systematic review and metaregression analysis. *Am. J. Psychiatry* 164, 942–948.
- Presgraves S. P., Ahmed T., Borwege S., Joyce J. N. (2004) Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of

- dopamine agonists. *Neurotox. Res.* 5, 579–598.
- Purper-Ouakil D. N. R. A.-M. L.-B. (2011) Neurobiology of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. *Neuropsychiatr. Disord. Pediatr. Psychiatry* 69, 69–76.
- Sauer J. M., Ring B. J., Witcher J. W. (2005) Clinical pharmacokinetics of atomoxetine. *Clin. Pharmacokinet.* 44, 571–590.
- Schmidt A. J., Clement H. W., Gebhardt S., Hemmeter U. M., Schulz E., Krieg J. C., Kircher T., Heiser P. (2010) Impact of psychostimulants and atomoxetine on the expression of 8-hydroxyguanine glycosylase 1 in human cells. *J. Neural Transm.* 117, 793–797.
- Simon V., Czobor P., Balint S., Meszaros A., Bitter I. (2009) Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *Br. J. Psychiatry* 194, 204–211.
- Smith C. L. (2011) Basic confocal microscopy. *Curr. Protoc. Neurosci.* SUPPL. 56, 1–18.
- Sukumar M., Liu J., Mehta G. U., Patel S. J., Roychoudhuri R., Crompton J. G., Klebanoff C. A., et al. (2016) Mitochondrial Membrane Potential Identifies Cells with Enhanced Stemness for Cellular Therapy. *Cell Metab.* 23, 63–76.
- Takeuchi Y., Miyamoto E., Fukunaga K. (2002) Analysis on the promoter region of exon IV brain-derived neurotrophic factor in NG108-15 cells. *J. Neurochemistry* 83, 67–79.
- Wang Q. L. yu, (2016) Neuroprotective effects of atomoxetine against traumatic spinal cord injury in rats. *J. Neurosci.* 36, 272–280.
- Zhu L., Liu Z., Feng Z., Hao J., Shen W., Li X., Sun L., et al. (2010) Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *J. Nutr. Biochem.* 21, 1089–1098.
- Zorova L. D., Popkov V. A., Plotnikov E. Y., Silachev D. N., Pevzner I. B., Jankauskas S. S., Babenko V. A., et al. (2017) Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.*