



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON METILFENIDATO Y  
ATOMOXETINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL HIPOCAMPO  
DE RATAS JÓVENES**

***TÉSIS***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**Mireya Estefanía Bejarano Coria**



**CDMX**

**2023**



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: IBARRA RUBIO MARIA ELENA

**VOCAL:** Profesor: CANIZALES QUINTEROS SAMUEL

**SECRETARIO:** Profesor: CORONA CASTILLO JUAN CARLOS

**1er. SUPLENTE:** Profesor: PLASENCIA DE LA PARRA FRANCISCO JAVIER

**2° SUPLENTE:** Profesor: PEDRAZA CHAVERRI JOSÉ

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

**ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Juan Carlos Corona Castillo

**SUSTENTANTE (S):**

Mireya Estefanía Bejarano Coria

## ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina / Serotonina
Ach	Acetilcolina
ALDH	Aldehído Deshidrogenasa
ATP	Adenosín Trifosfato
ATX	Atomoxetina
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
CA	Cornu Ammonis
CAT	Catalasa
CE	Cuerpo Estriado
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
DRD1-5	Receptor de Dopamina
DA	Dopamina
DAB	3,3' Diaminobenzidine
DAMP	Patrones Moleculares Asociados a Daño
DAT	Transportador de Dopamina
DBH	Dopamina Beta Hidroxilasa
DHE	Dihidroetidina
DPN	Día Postnatal
DSM-V	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GD	Giro Dentado
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
GPx	Glutación Peroxidasa
GSH	Glutación Reducido
GSSG	Glutación Oxidado
GST	Glutación-S Transferasa
GWAS	Estudio de Asociación de Genoma Completo
H2-DCF	2'7'-diclorofluorescina
hOGG1	8-hidroxiguanina glicosilasa 1
HSP	Proteína de Choque Térmico
LC	Locus Coeruleus
MAO	Monoaminoxidasa
MDA	Malondialdehído
MPH	Metilfenidato
NA	Noradrenalina
Nac	Núcleo Accumbens
NET	Transportador de Noradrenalina
PAMP	Patrón Molecular Asociado a Patógenos
PBS	Solución Salina Tamponada con Fosfato

PCB	Bifenilos Policlorados
PUFA	Ácidos Grasos Poliinsaturados
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SHR	Rata Espontáneamente Hipertensa
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Polimorfismos de Nucleótido Único
SNpc	Sustancia Nigra pars compacta
SOD	Superóxido Dismutasa
TAC	Capacidad Antioxidante Total
TAS	Estado Antioxidante Total
TBARS	Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico
TDAH	Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad
TH	Tirosina Hidroxilasa
TOS	Estado Oxidante Total
VC	Violeta de Cresilo
VMAT	Transportador Vesicular de Monoaminas
VTA	Área Tegmental Ventral

## ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	2
ÍNDICE GENERAL.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	8
I. INTRODUCCIÓN.....	9
• TRASTORNO POR DÉFICIT DE ATENCIÓN E HIPERACTIVIDAD.....	9
• PREVALENCIA.....	9
• ETIOLOGÍA DEL TDAH.....	9
• DIAGNÓSTICO DEL TDAH.....	10
• MECANISMOS CEREBRALES ALTERADOS EN EL TDAH.....	11
• TRATAMIENTO DEL TDAH.....	12
• METILFENIDATO.....	13
• ATOMOXETINA.....	14
• RELACIÓN DEL HIPOCAMPO Y EL TDAH.....	15
• VÍAS CATECOLAMINÉRGICAS Y SU RELACION CON EL TDAH.....	18
• EL TDAH Y EL ESTRÉS OXIDATIVO.....	19
• RELACIÓN DEL TRATAMIENTO CON MPH Y EL ESTRÉS OXIDATIVO.....	22
• RELACIÓN DEL TRATAMIENTO CON ATX Y EL ESTRÉS OXIDATIVO.....	23
• PAPEL DE LA NEUROINFLAMACIÓN Y TDAH.....	24
II. JUSTIFICACIÓN.....	27
III. HIPÓTESIS.....	27
IV. OBJETIVOS.....	27
• OBJETIVO GENERAL.....	27
• OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
• ANIMALES Y TRATAMIENTOS.....	28
• TINCIÓN CON VIOLETA DE CRESILO.....	29
• INMUNOHISTOQUÍMICA.....	30
• MEDICIÓN DEL RADICAL SUPERÓXIDO EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA....	32
• ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
VI. RESULTADOS.....	33
• DAÑO NEURONAL EN EL HIPOCAMPO DE RATAS JÓVENES DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON MPH Y ATX.....	33

- CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN ASTROCITOS INMUNORREACTIVOS A GFAP EN EL HIPOCAMPO DE RATAS JÓVENES DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON MPH Y ATX..... 43
- EFECTO SOBRE EL NIVEL DE SUPERÓXIDO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON MPH Y ATX ..... 53
- VII. DISCUSIÓN..... 60
- VIII. CONCLUSIONES ..... 67
- IX. PERSPECTIVAS ..... 67
- X. REFERENCIAS ..... 68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anomalías estructurales presentes en el TDAH.....	13
Figura 2. Mecanismo de acción de MPH.....	15
Figura 3. Mecanismo de acción de la ATX.....	11
Figura 4. Regiones del hipocampo y tipos celulares .....	17
Figura 5. Circuitos dopaminérgicos y noradrenérgicos .....	18
Figura 6. Biogénesis, degradación y autooxidación de las catecolaminas.....	20
Figura 7. Relación del tratamiento con metilfenidato MPH y el estrés oxidativo....	23
Figura 8. Relación del tratamiento con atomoxetina ATX y el estrés oxidativo....	24
Figura 9. Diagrama del proceso experimental.....	28
Figura 10. Selección para la toma de micrografías en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, teñidas con violeta de cresilo (VC).....	30
Figura 11. Selección para la toma de micrografías en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, empleando inmunohistoquímica (IHC) .....	31
Figura 12. Selección para la cuantificación de fluorescencia en las regiones CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo, empleando dihidroetidina (DHE) .....	32
Figura 13. Fotomicrografía representativa de la región hipocampal de una rata control (CN), teñida con VC.....	33
Figura 14. Imágenes representativas y cuantificación neuronal en cortes de hipocampo teñidos con VC del grupo CN .....	35
Figura 15. Imágenes representativas y cuantificación neuronal en cortes de hipocampo teñidos con VC del grupo tratado crónicamente durante 28 días con MPH. ....	38
Figura 16. Imágenes representativas y cuantificación neuronal en cortes de hipocampo teñidos con VC del grupo tratado crónicamente durante 28 días con ATX. ....	40
Figura 17. Fotomicrografías representativas de la tinción con CV de las 3 regiones hipocampales en donde se puede observar y comparar el daño neuronal inducido por el tratamiento crónico con MPH o ATX con relación al grupo CN. ....	41
Figura 18. Cuantificación de neuronas viables en los tres grupos experimentales y las tres regiones hipocampales (CA1, CA2 y CA3) y análisis estadísticos. ....	42
Figura 19. Fotomicrografía representativa de la inmunohistoquímica (IHC) contra GFAP de la región hipocampal de una rata control.....	43
Figura 20. Evaluación de la expresión de GFAP y morfología de los astrocitos en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo del grupo de ratas CN.....	45

Figura 21. Evaluación de la expresión de GFAP y morfología de los astrocitos en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo del grupo tratado crónicamente con MPH. .....	48
Figura 22. Evaluación de la expresión de GFAP y morfología de los astrocitos en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo del grupo tratado crónicamente con ATX. .....	50
Figura 23. Fotomicrografías representativas de la IHC contra GFAP de las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo .....	51
Figura 24. Cuantificación del número de astrocitos inmunorreactivos a GFAP en los tres grupos y en las tres regiones hipocampales y análisis estadístico.....	52
Figura 25. Evaluación de la oxidación de la DHE en las regiones CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo del grupo CN.....	54
Figura 26. Evaluación de la oxidación de la DHE en las regiones CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo del grupo tratado crónicamente con MPH.....	55
Figura 27. Evaluación de la oxidación de la DHE en las regiones CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo del grupo tratado crónicamente con ATX.....	56
Figura 28. Niveles de estrés oxidativo inducido por el tratamiento crónico con MPH o ATX. ....	57
Figura 29. Cuantificación de la oxidación de la DHE en los tres grupos y en las cuatro regiones hipocampales y análisis estadístico.....	58
Figura 30. Resumen de resultados obtenidos.....	59
Figura 31. Principales hallazgos del presente estudio.....	66

## RESUMEN

**Antecedentes:** El Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) es un trastorno del neurodesarrollo que se caracteriza por inatención, impulsividad e hiperactividad. Su etiología incluye factores genéticos, neuropsicológicos, estructurales y ambientales. Los fármacos aprobados para el tratamiento del TDAH son el metilfenidato (MPH) y la atomoxetina (ATX), los cuales disminuyen los síntomas característicos del trastorno; sin embargo, se han relacionado ambos tratamientos con el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que a su vez produciría neuroinflamación y finalmente daño neuronal. Así, el estrés oxidativo y la neuroinflamación se han asociado como causa fisiopatológica del trastorno. **El objetivo:** del presente trabajo fue estudiar si la administración crónica de MPH y ATX producen estrés oxidativo, aumentando la neuroinflamación y muerte neuronal en el hipocampo de ratas jóvenes. **Metodología:** Se utilizó como modelo rata Wistar sin distinción por género en etapa prepuberal, a las cuales 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 del hipocampo y realizar la tinción con violeta de cresilo (VC), inmunohistoquímica (IHC) contra GFAP y medición de estrés oxidativo con la sonda dihidroetidina (DHE). **Resultados:** El tratamiento crónico con MPH redujo significativamente la cantidad de neuronas teñidas con VC en la región CA3 del hipocampo con respecto al grupo control. Además, mostró un aumento en el número de astrocitos marcados con GFAP en la región CA1 y CA3 con tendencia al aumento en CA2, así como incremento en los niveles de estrés oxidativo (oxidación de la DHE) en las cuatro regiones evaluadas (CA1, CA2, CA3 y GD) siendo más evidente para la región CA2. Por otro lado, el tratamiento crónico con ATX disminuyó la densidad neuronal en las regiones CA1 y CA3; aunado a un aumento significativo de astrocitos reactivos en las regiones CA1, CA2 y CA3. También generó un aumento significativo estrés oxidativo en las regiones CA1 y CA2 con una tendencia al aumento en las regiones CA3 y GD. **Conclusión:** La administración crónica de MPH y ATX produjeron una disminución significativa de la densidad neuronal en las distintas subregiones del hipocampo de la rata, así como un incremento de estrés oxidativo, lo que a su vez indujo un incremento en el número de astrocitos reactivos (neuroinflamación) en el hipocampo.

## I. INTRODUCCIÓN

- TRASTORNO POR DÉFICIT DE ATENCIÓN E HIPERACTIVIDAD

El Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) es un trastorno del neurodesarrollo que se caracteriza por la presencia de *inatención* (incapacidad de planificar y completar una tarea determinada) que provoca descuidos o errores en las actividades realizadas y puede ser evidente como una marcada distracción, o bien, el olvido de las tareas a realizar; *impulsividad* (toma de decisiones rápida sin atender a las opciones disponibles) e *hiperactividad* (cambio de actividad sin finalizar la anterior, movimientos inadecuados persistentes) como un habla excesiva o la interrupción de las actividades ajenas y propias antes de llegar a su término. En un grado que no coincide con el nivel de desarrollo del paciente según su edad y que afecta sus actividades cotidianas (American Psychiatric Association, 2013; Roshannia, S. et al., 2021; Faraone, S. V. et al., 2015; Posner, J. et al., 2020). Los pacientes con TDAH presentan dificultades en el ámbito académico, laboral y social, pues la sintomatología presente puede generar un bajo rendimiento escolar y conflictos con compañeros lo que conlleva al rechazo social.

- PREVALENCIA

Su aparición temprana, hace del TDAH un trastorno común en la infancia y la adolescencia, con una prevalencia del 5.9 % en la población mundial (Wilcutt, E. G. 2012; Polanczyk, G. V. et al., 2007; Posner, J. et al., 2020), que lo convierte en uno de los trastornos del neurodesarrollo más frecuentes, según estudios de población afecta predominantemente a varones en una proporción de 2:1 (Polanczyk, G. V. et al., 2007; Sayal, K. et al., 2018), pero considerando que los pacientes masculinos presentan puntajes más altos para todos los síntomas en comparación con pacientes femeninos y debido a esto aumenta su probabilidad de recibir un diagnóstico de TDAH, es importante considerar que las mujeres con TDAH podrían no recibir adecuadamente un diagnóstico (Faraone, S. V. et al., 2021; Mohammadi, M. R. et al., 2019; Mowlem F.D. et al., 2018).

En México durante el año 2017, la Secretaría de Salud informó que hay una prevalencia del 5 % en niños y adolescentes. Un estudio poblacional en Guadalajara incluyó a 4399 niños en edades entre 5 a 15 años de los cuales 8.9 % presentó un diagnóstico concluyente para TDAH, con una prevalencia mayor en varones relación 2.3:1; sin embargo, aún no existen suficientes estudios en la población mexicana para definir la prevalencia del trastorno (Salud, s. f.; Barrios, O. et al., 2016). Se ha reportado que persiste hasta la edad adulta, con síntomas agravados por lo que es considerado un factor de riesgo para otros trastornos.

- ETIOLOGÍA DEL TDAH

La etiología del TDAH es compleja ya que incluye factores genéticos, ambientales, neuroanatómicos y funcionales. La evidencia sugiere que el TDAH es altamente hereditario en una proporción estimada del 70 % al 80 % (Faraone & Larsson 2018; Biederman & Faraone, 2005). Sin embargo, aún no se tiene identificado un gen o variación genética que sean detonantes del trastorno de forma exclusiva, por la complejidad de las correlaciones entre

variantes genéticas y exposición ambiental, la mayoría de estas asociaciones aún no se han demostrado como causales (Faraone & Larsson 2018).

Un metaanálisis del año 2022 enfocado en estudios de asociación del genoma completo (GWAS) para TDAH, identificó 76 genes considerados de riesgo potencial, cuya expresión se encuentra enriquecida en la corteza frontal durante el desarrollo temprano del cerebro. En suma, siete mil variantes explican el 90% de la heredabilidad SNP (fracción de variación fenotípica generada de los efectos conjuntos de un grupo dado de variación genética), por lo que TDAH es un trastorno altamente poligénico (Demontis, D. et al., 2023). Entre las variantes que se encontraron como candidatos a ser una causa de la fisiopatología del trastorno están las implicadas en la vía catecolaminérgica. Por ejemplo, se encontró una asociación significativa con el TDAH para los genes relacionados con el transportador de dopamina 1 (DAT1), los receptores de dopamina 4 y 5 (DRD4 y DRD5) así como el gen del transportador de serotonina (5-HTT) (Roshannia, S. et al., 2021; Faraone & Larsson., 2018; Anttila, V. et al., 2018; Posner, J. et al., 2020).

Varios factores ambientales también están profundamente relacionados con el TDAH, entre ellos el estrés materno, fumar o beber durante el embarazo, bajo peso al nacer, parto prematuro, exposición a toxinas ambientales (organofosforados, Bifenilos Policlorados [PCB], plomo), así como condiciones psicosociales adversas durante el desarrollo infantil y el tipo de dieta del paciente, algunos de éstos se encuentran a su vez asociados a la variabilidad genética encontrada (Carlsson, T. et al., 2020; Bölte, S. et al., 2021; Bélanger, S. A. et al., 2018).

Sin embargo, los síntomas y la gravedad de estos varían de forma importante entre individuos, una de las razones es la comorbilidad psiquiátrica, que se ha descrito como clínicamente importante en la heterogeneidad del TDAH (Faraone, S. V. et al., 2021). Una gran parte de las personas que lo padecen tienen además un trastorno mental adicional o bien múltiples trastornos mentales comórbidos; afectando adversamente el pronóstico y generando el uso de medidas terapéuticas específicas (Faraone, S. V. et al., 2021; Bölte, S. et al., 2021). Una revisión realizada en el 2019 por Gnanavel y su equipo enlista las principales comorbilidades y su incidencia en la población evaluada en diversos estudios, entre éstas se encuentran; trastornos del espectro autista, trastornos del aprendizaje, trastornos de tics, depresión, trastorno bipolar, trastornos de ansiedad, trastornos de conducta y trastorno de oposición desafiante, de los cuales la incidencia va del 5 al 50 %, o en el caso de trastornos del espectro autista hasta un 70%; otros estudios reportan comorbilidad con trastornos alimentarios (Gnanavel, S. et al., 2019). A partir de la adolescencia, las comorbilidades con el TDAH y el trastorno por sí mismo se asocian con el uso y la dependencia a sustancias de abuso (Faraone, S. V. et al., 2021; Bölte, S. et al., 2021).

- **DIAGNÓSTICO DEL TDAH**

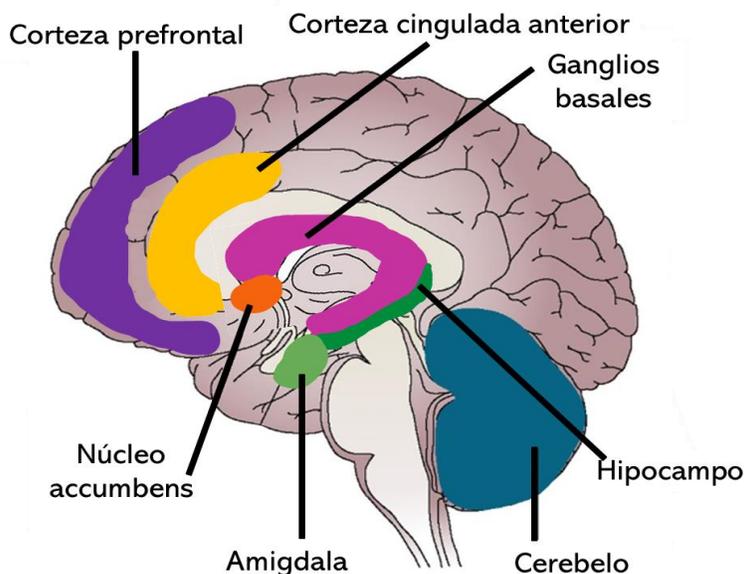
Los pacientes son diagnosticados mediante la evaluación del deterioro psicosocial en diferentes entornos (familia, escuela, trabajo, etc.). Según el DSM-V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) (American Psychiatric Association, 2013), la edad de inicio es de

12 años y es necesario recopilar información del historial de desarrollo detallado del paciente, así como antecedentes familiares, una evaluación de diagnóstico psicológico y una evaluación de diagnóstico físico (Posner, J. et al., 2020; Wolraich, M. L. et al., 2019).

El DSM-V enlista los síntomas en dos tipos, los relacionados con falta de atención y los de impulsividad/hiperactividad (American Psychiatric Association, 2013). A partir de esta lista, el paciente debe presentar 6 de los síntomas por un periodo mínimo de 6 meses para ser diagnosticado, ya que es necesario descartar que los síntomas sean propios de un trastorno diferente antes de iniciar un tratamiento; después de los 17 años, los criterios positivos se reducen a 5, debido a que el deterioro funcional puede persistir o agravarse con la edad (American Psychiatric Association, 2013; Faraone, S. V. et al., 2015; Wolraich, M. L. et al., 2019).

- MECANISMOS CEREBRALES ALTERADOS EN EL TDAH

El TDAH se ha asociado con diversas anomalías estructurales y funcionales del sistema nervioso central (SNC) (**Figura 1**), resultado de un retraso en el desarrollo cerebral (Ball, G. et al., 2019; Leisman & Melillo, 2022; Faraone, S. V. 2018; Purper-Ouakil, D. et al., 2011; Hoogman, M. et al., 2017; Quintero, J. et al., 2022).



**Figura 1. Anomalías estructurales presentes en el TDAH. Se han encontrado alteraciones en las regiones de la corteza prefrontal (morado), corteza cingulada anterior (amarillo), núcleo accumbens (naranja), amígdala (verde claro), hipocampo (verde oscuro), ganglios basales (rosa) y cerebelo (azul) (Tomado y modificado de Faraone, S. V. et al., 2018).**

La evidencia encontrada en estudios de neuroimagen relaciona la sintomatología con cambios anatómicos evidenciando un menor volumen cerebral, así como de sustancia gris y blanca, también se encontraron diferencias significativas entre el grosor de la corteza prefrontal y el volumen de los ganglios basales (Ball, G. et al., 2019; Leisman & Melillo, 2022). En un estudio

reciente Hoogman y colaboradores demostraron que existe alteración en las regiones de la amígdala, el núcleo accumbens y el hipocampo de pacientes con TDAH en comparación con controles sanos (Hoogman, M. et al., 2017). Previamente Purper-Ouakil y su equipo de investigación ligaron la normalización de los volúmenes en corteza parietal e hipocampo, con la mejora clínica de los síntomas (Purper-Ouakil, D. et al., 2011). La función de estas regiones responde en gran medida de la neurotransmisión regulada por DA, NA, 5-HT, glutamato y ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Faraone, S. V. 2018; Quintero, J. et al., 2022).

Dentro de los factores neuroanatómicos, estudios de neuroimagen han evidenciado que, en los pacientes con TDAH, el volumen cerebral global se ve reducido lo que puede relacionarse con la sintomatología (Bélanger, S. A. et al., 2018; Ball, G. et al., 2019; Leisman & Melillo, 2022). Muchos casos implican una desregulación de la estructura y función de las vías frontal – subcortical - cerebelosa que controlan la atención, la respuesta a la recompensa, el control inhibitorio y la conducta motora; la actividad entre estas áreas depende de los circuitos cerebrales catecolaminérgicos (Roshannia, S. et al., 2021; Posner, J. et al., 2020).

En un estudio de neuroimagen, Ball y colaboradores relacionaron el volumen cerebral con la capacidad cognitiva de los pacientes y encontraron que un volumen más alto en el cerebelo y regiones temporales, aunado a volumen más bajo en las regiones frontales dorsolaterales, el caudado y el tálamo, se asocian a una mayor hiperactividad y falta de atención, a un coeficiente intelectual bajo y rendimiento deficiente en las pruebas de matemáticas y razonamiento visoespacial (Ball, G. et al., 2019).

Pero la sintomatología no se asoció únicamente al volumen del cerebro, Leisman et al. describieron en su revisión, la existencia de una diferencia en el desarrollo de los lóbulos frontales de niños con TDAH en comparación con niños neurotípicos, esta deficiencia explica los síntomas motores hiperactivos y la falta de atención sostenida, por una hiperactivación de las conexiones del hemisferio izquierdo y la falta de actividad del hemisferio derecho (Leisman & Melillo, 2022).

- TRATAMIENTO DEL TDAH

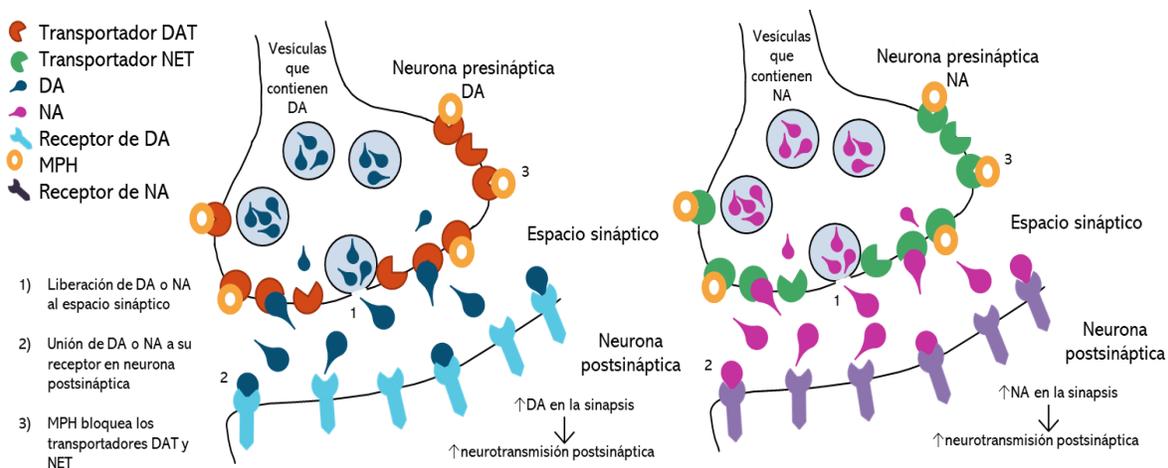
El tratamiento del TDAH es de tipo multimodal con el fin de una mejora conductual que permita al paciente adaptarse a su entorno social de forma satisfactoria, se basa en la psicoeducación, que incluye el soporte académico y la adaptación escolar, así como las prácticas de los padres, en busca de una mejora comportamental (Posner, J. et al., 2020). Además, se utilizan fármacos, que regulan la disfunción de los mecanismos cerebrales implicados, a partir de la edad escolar, debiendo considerarse el manejo de las comorbilidades que se tratan de forma conjunta con un régimen farmacológico específico definido por el médico (Faraone, S. V. et al., 2015; Wolraich, M. L. et al., 2019).

Los fármacos aprobados para el tratamiento del TDAH se clasifican en psicoestimulantes (metilfenidato (MPH) y anfetamina) y no psicoestimulantes (atomoxetina (ATX), guanfacina y clonidina) (Faraone, S. V. 2018; Mechler, K. et al., 2022). El uso del MPH y la ATX, tiene evidencia sobre su eficacia en la disminución de los síntomas característicos del TDAH por su

modulación de las funciones ejecutivas y la inhibición de la respuesta inmediata o impulsiva por la vía catecolaminérgica (Wu, C. S. et al., 2021; Wolraich, M. L. et al., 2019).

- METILFENIDATO

El MPH es el medicamento de primera línea en el tratamiento del TDAH, se puede encontrar en presentaciones de liberación variante, entre las cuales el médico puede elegir la adecuada para optimizar el efecto del fármaco, su uso está aprobado a partir de los seis años. Actúa bloqueando los transportadores de dopamina (DAT) y noradrenalina (NET) en las neuronas presinápticas, aumentando así su disponibilidad en el espacio sináptico, (**Figura 2**) (Faraone, S. V. 2018; Quintero, J. et al., 2022; Verghese, C. et al., 2022).



**Figura 2. Mecanismo de acción de metilfenidato (MPH). El MPH bloquea los transportadores de dopamina (DAT) y noradrenalina (NET) en la neurona presináptica aumentando los niveles de dopamina (DA) y noradrenalina (NA) en el espacio sináptico, lo que conlleva un aumento en la neurotransmisión postsináptica (Modificado de Muñuzuri Nájera & Yepiz Lachica, 2015).**

La dopamina (DA) es uno de los neurotransmisores implicados en el correcto funcionamiento de la memoria, el estado de ánimo, la anticipación de eventos, la motivación, la inhibición conductual o control de impulsos, la toma de decisiones y la resolución de problemas; mientras que la noradrenalina (NA) también está implicada en el control de impulsos y respuestas conductuales, la memoria de trabajo y la respuesta inhibitoria, así como en la regulación de la atención, por lo que una deficiencia en los circuitos de estos neurotransmisores se puede relacionar con los síntomas del TDAH (Quintero, J. et al., 2022). La regulación de catecolaminas llevada a cabo por MPH ocurre principalmente en la corteza prefrontal, la cual permite la modulación de la hiperactividad y déficit de atención, así como del procesamiento cognitivo (Faraone, S. V. 2018). Además, tiene un efecto agonista sobre 5-hidroxitriptamina o serotonina (5-HT), con acción sobre su receptor (5-HT1A) que se relaciona con la modulación de los niveles de DA (y a su vez con el TDAH) (Faraone, S.V. 2018). Sin embargo, MPH no actúa exclusivamente en la región mencionada y su actividad sobre neuronas dopaminérgicas puede estar presente en todo el sistema nervioso central (SNC) (Faraone, S. V. 2018; Verghese, C. et al., 2022).

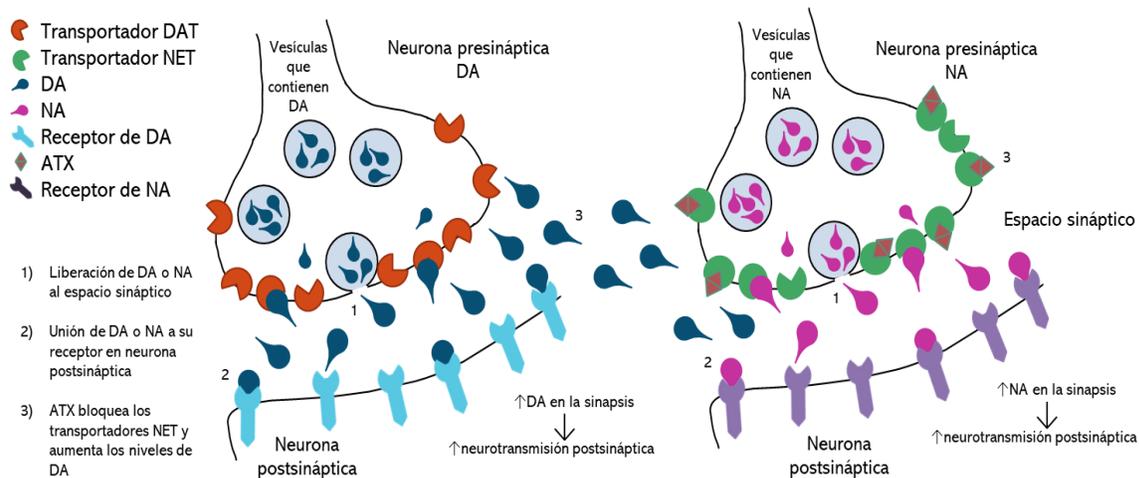
En el núcleo accumbens (Nac; sitio del sistema de recompensa), por ejemplo, existe una amplia proyección de neuronas dopaminérgicas. El nivel de DA y NA aumenta en esta área cerebral a medida que se acerca la recompensa, generando respuestas conductuales que pueden ser iniciadas por drogas adictivas u otras formas de estímulos gratificantes (Bayassi-Jakowicka, M. et al., 2021). Por lo que MPH al potenciar la presencia de DA y NA en el Nac es clasificado como psicoestimulante, dado que se puede utilizar como potenciador cognitivo y causar adicción. Se ha relacionado al MPH con situaciones de adicción, aunque la evidencia actual puede ser contradictoria en este aspecto, pues según estudios las dosis terapéuticas no son suficientes para activar el sistema de recompensa (Faraone, S. V. 2018; Verghese, C. et al., 2022). Así mismo se encuentra una conexión entre el uso de psicoestimulantes como MPH con la reducción de la altura y el peso en pacientes niños y adolescentes (Carucci et al., 2021).

El tratamiento se ajusta a las necesidades clínicas del paciente, por lo que la administración se realiza durante los periodos de mayor estrés escolar, conductual o social, lo que depende de la presentación del medicamento y la modalidad de tratamiento elegido, teniendo tabletas de liberación prolongada (24 h) de hasta 54 mg; algunos pacientes pueden requerir de 50 a 60 mg diarios mientras que otros de 10 a 15. Las tabletas de liberación prolongada se administran en una sola toma al día mientras que otras presentaciones se racionalizan para un efecto prolongado (Faraone, S. V. 2018; Verghese, C. et al., 2022; RITALIN - PLM, s. f.).

- ATOMOXETINA

La ATX es un fármaco de tipo no psicoestimulante que fue aprobado para el uso terapéutico del TDAH, actúa principalmente en la corteza prefrontal, pero se ha demostrado su eficacia en circuitos como el fronto – estriado – tálamo - parietal, donde bloquea los transportadores NET en neuronas presinápticas, evitando la recaptura de NA y aumentando los niveles de las catecolaminas (NA y DA) en el espacio sináptico (**Figura 3**) (Kowalczyk, O. S. et al., 2019; STRATTERA - PLM, s. f.).

El riesgo de abuso de sustancias por consumo del medicamento es mínimo, debido a la baja cantidad de neuronas noradrenérgicas y transportadores NET presentes en el núcleo accumbens por lo que su bloqueo no lleva a un aumento en los niveles de NA ni DA en esta región. Sin embargo, la ATX normaliza la inactivación en las áreas media y superior de corteza temporal, cíngulo posterior y precúneo, del hemisferio derecho principalmente, activando una red talámica de atención sostenida; esto se demostró en pacientes de 10 a 17 años con TDAH que no habían recibido medicación previa y fueron tratados con ATX o placebo y comparados con controles sanos (Kowalczyk, O. S. et al., 2019).



**Figura 3. Mecanismo de acción de la atomoxetina (ATX). La ATX bloquea los transportadores de noradrenalina (NET) en la neurona presináptica aumentando los niveles de dopamina (DA) y noradrenalina (NA) en el espacio sináptico, lo que conlleva un aumento en la neurotransmisión postsináptica (Modificado de Muñuzuri Nájera & Yepiz Lachica, 2015).**

El tratamiento con ATX se recomienda a partir de los 6 años, en dosis que varían de 0.5 mg/Kg a un máximo de 120 mg diarios divididos en tres administraciones al día o administración única dependiendo de las observaciones médicas al paciente. Tiene absorción casi completa después de su administración oral y alcanza su concentración plasmática máxima 1 a 2 horas después (STRATTERA - PLM, s. f.). En 2018 Griffiths y colaboradores investigaron el efecto de la atomoxetina utilizando un diseño doble ciego controlado con placebo y demostraron su funcionalidad en la mejora de las funciones cognitivas asociadas al TDAH en pacientes jóvenes de 6 a 17 años, que además presentaban comorbilidad con ansiedad; la ATX aumentó la atención sostenida y el reconocimiento de rostros temerosos que evalúa la atención a las expresiones faciales de las emociones básicas y se ve disminuido en pacientes con TDAH (Griffiths, K. R. et al., 2018). Éste mismo efecto sobre la atención fue observado por Callahan y colaboradores en el 2019 en un modelo de roedor joven, donde aseguran que existe una mejora de las funciones ejecutivas. Entre las funciones donde encontraron un efecto positivo están: flexibilidad cognitiva, memoria de trabajo a corto plazo, menor susceptibilidad a la distracción, disminución de los comportamientos similares a la impulsividad y mejora en la memoria de referencia espacial (Callahan, P. M. et al., 2019).

- RELACIÓN DEL HIPOCAMPO Y EL TDAH

El hipocampo forma parte del sistema límbico y aunque su principal función se relaciona con la memoria espacial y temporal, la correlación entre el volumen hipocampal y los síntomas del TDAH es un campo que ha tomado relevancia, por su actividad en la red de función ejecutiva, inhibición de la respuesta, la memoria episódica, la cognición espacial y las alteraciones en la función cognitiva que constituyen los síntomas centrales del TDAH (Al-Amin, M. et al., 2018). Como se mencionó, diversos estudios indican que pacientes con TDAH presentan volúmenes reducidos del hipocampo, los cuales se relacionan directamente con el aumento de la

inatención e impulsividad, así mismo un volumen aumentado se asocia con la reducción de la sintomatología, lo que indica una compensación ante la disfunción de redes moduladas por esta región cerebral (Hoogman, M. et al., 2017; Al-Amin, M. et al., 2018).

Además, un estudio realizado en el 2013 por Sterley y colaboradores resaltó el papel de GABA en los síntomas conductuales del TDAH, usando como modelo la rata espontáneamente hipertensa (SHR) (utilizadas como un modelo animal de TDAH), demostraron que la estimulación con glutamato aumenta la liberación de NA en su grupo SRH y control; pero cuando solo se estimuló con GABA al control y no a las ratas SHR, los niveles de NA fueron similares para ambos grupos. Por lo tanto, sugieren que las concentraciones extracelulares de GABA disminuidas en el hipocampo pueden ser el origen de la disfunción en la transmisión de catecolaminas observada en SHR generando su comportamiento similar al TDAH (Sterley, T. L. et al., 2013).

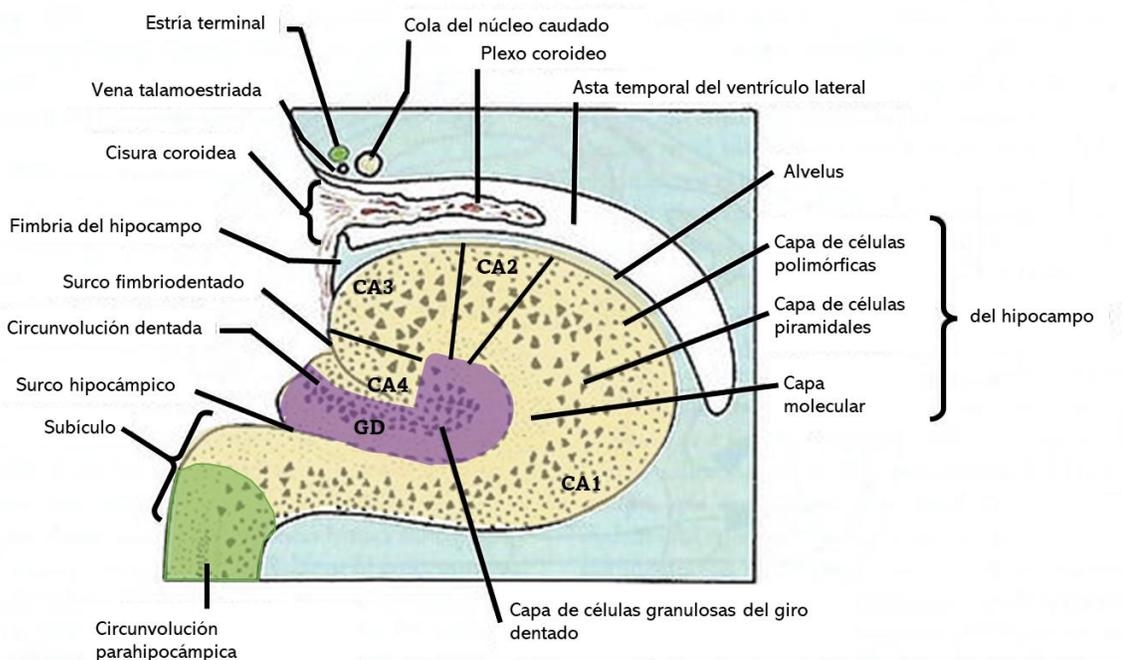
En otro estudio sobre el modelo SHR para dilucidar la cantidad de receptor de dopamina D5 presente en somas y dendritas de células piramidales postsinápticas en la región Cornu Ammonis 1 (CA1) del hipocampo, se encontró que la densidad de DRD5 fue menor en el citoplasma de los somas de SRH en comparación con el control, por lo que se tiene una menor reserva de receptores que puedan ser insertados en la membrana plasmática y este déficit se asocia a las dificultades de aprendizaje en TDAH (Medin, T. et al., 2013). Wu, J. et al., previamente reportaron en su metaanálisis la distribución de receptores para DA (DRD1 - DRD5) en relación con pacientes con el trastorno, indicando que en hipocampo se encuentran altamente expresados DRD1, DRD5 y DRD4, este último en mayor medida que los dos primeros y en las tres regiones CA, así como en giro dentado (GD) (Wu, J. et al., 2012).

Al-Amin y colaboradores investigaron si la alteración en el volumen hipocampal está relacionada con las subregiones de este (**Figura 4**) y comprobaron que en pacientes con TDAH existe atrofia en todo el hipocampo, de forma más notoria en las regiones Cornu Ammonis (CA), [la cual incluye primero a CA4 (que subyace al giro dentado), luego CA3 y una zona muy pequeña llamada CA2 seguida por CA1 (Todas las áreas CA están llenas de células piramidales densamente empaquetadas similares a las que se encuentran en la neocorteza)] principalmente CA1, CA4 y también la capa molecular, las capas de células granulares del giro dentado, el presubiculo, el subiculo, la fimbria y la cola del hipocampo (Al-Amin, M. et al., 2018).

El procesamiento de la información dentro de las subregiones hipocampales se da por conexión entre dendritas de las neuronas de cada región con otras formando redes, la entrada de información cortical del hipocampo se divide en dos de estas redes que inician en la corteza entorrinal: la primera es el circuito trisináptico encargado de la memoria declarativa, esencial para el aprendizaje, que se compone de la conexión entre la corteza entorrinal y el giro dentado, el cual proyecta a CA3 y a su vez está proyecta a CA1; y la segunda es el circuito monosináptico que conecta directamente la corteza entorrinal con CA1 (Bouyeure & Noulhiane, 2021). Parte de la memoria declarativa es la memoria social, que se relaciona principalmente con el envío de información desde la corteza entorrinal a CA2; un estudio demostró que la

actividad de CA2 está directamente relacionada al comportamiento motivado al comprobar su papel en comportamiento social agresivo (Chen, S. et al., 2020; Leroy, F. et al., 2018).

A nivel neuronal, las capas piramidales del hipocampo están estrechamente empaquetadas con neuronas glutamatérgicas que tienen un bajo umbral de activación, lo que garantiza un alto nivel de neuroplasticidad en la región. Las neuronas piramidales glutamatérgicas representan alrededor del 90 % de las neuronas del hipocampo, un porcentaje mucho mayor que en otras partes de la corteza. El 10 % restante de las neuronas del hipocampo consisten en interneuronas inhibitoras GABAérgicas encargadas de la regulación de las neuronas glutamatérgicas fácilmente excitables (Freund & Buzsáki, 1998).



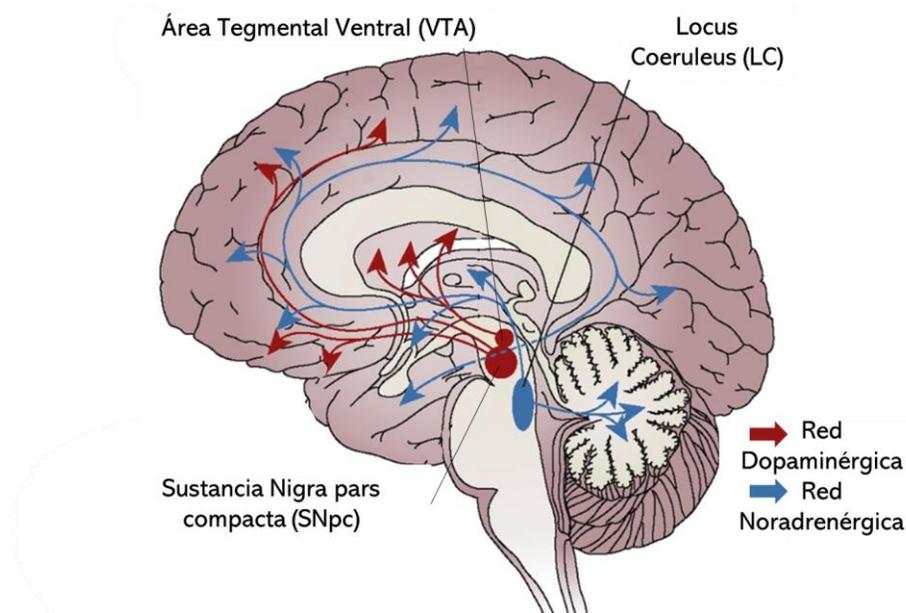
**Figura 4. Regiones del hipocampo y tipos celulares. El hipocampo tiene cuatro regiones llamadas: CA1, CA2, CA3 y CA4 además de la circunvolución dentada (giro dentado GD). Las células se distribuyen formando la capa molecular de axones y dendritas ubicadas centralmente y alrededor del surco del hipocampo. La capa de neuronas piramidales (forma piramidal) cuyas dendritas abarcan la capa molecular y sus axones atraviesan el alveus y la fimbria hasta el fórnix. La capa polimórfica ubicada debajo del alveus, contiene axones, dendritas e interneuronas (Tomado y modificado de Consejo Mexicano de Neurociencias A. C., 2020).**

Por lo tanto, el hipocampo cumple con funciones relacionadas a la memoria, la motivación y la conducta y el neurotransmisor inhibitorio que lleva a cabo dichas funciones es GABA, además, en su función también participan neuromoduladores, tales como la DA, NA, acetilcolina (Ach) y 5-HT. Diversos estudios han demostrado una alta presencia de proyecciones de DA y NA cuya función se relaciona con la memoria codificada a largo plazo. Las redes catecolaminérgicas involucradas en la estimulación hipocámpal provienen del área tegmental ventral (VTA) y el locus coeruleus (LC), aunque por la cantidad de proyecciones de cada uno

se considera al LC como principal fuente de DA y NA (Duszkiewicz, A. J. et al., 2019; Palacios-Filardo & Mellor, 2019). Además, un estudio evaluó la relación entre la exposición acumulada a la medicación de pacientes con TDAH y los volúmenes subcorticales de los mismos por resonancia magnética nuclear y encontraron que en hipocampo izquierdo (región CA1), la exposición acumulada más alta se asoció con volúmenes más pequeños. (Fotopoulos, N. H. et al., 2021).

- **VÍAS CATECOLAMINÉRGICAS Y SU RELACION CON EL TDAH**

Diversos autores afirman que en el TDAH existe disfuncionalidad de la modulación mediada por DA y NA, este razonamiento se hace visible en los principales blancos terapéuticos de los medicamentos estimulantes y no estimulantes que se utilizan para aliviar los síntomas del trastorno (Faraone, S. V. 2018; Martella, D. et al., 2020). La distribución de catecolaminas en el SNC, específicamente DA y NA se da por los circuitos dopaminérgicos y noradrenérgicos (**Figura 5**). Los primeros tienen su origen principal en la sustancia nigra pars compacta (SNpc) y el VTA desde donde proyectan al cuerpo estriado, la corteza y el Nac; el circuito noradrenérgico tiene su origen en el LC desde donde proyecta a la corteza, el hipocampo y el cerebelo (Hussain, L. S. et al., 2022; Rho, H. J. et al., 2018; Chen, A. P. et al., 2021).



**Figura 5. Circuitos dopaminérgicos y noradrenérgicos. Representación gráfica de las regiones y proyecciones de las catecolaminas dopamina DA y noradrenalina NA (Tomado y modificado de Faraone, S. V. et al., 2018).**

Como se mencionó anteriormente dentro de las funciones cerebrales afectadas en el TDAH están las de atención, orientación y de control ejecutivo, reguladas por los sistemas catecolaminérgicos. Además de las funciones enlistadas, la DA modula el aprendizaje y la respuesta motora, así mismo se asocia a la planificación, la reacción a la novedad y el procesamiento de la recompensa. Mientras que NA se ve implicada en la modulación de la

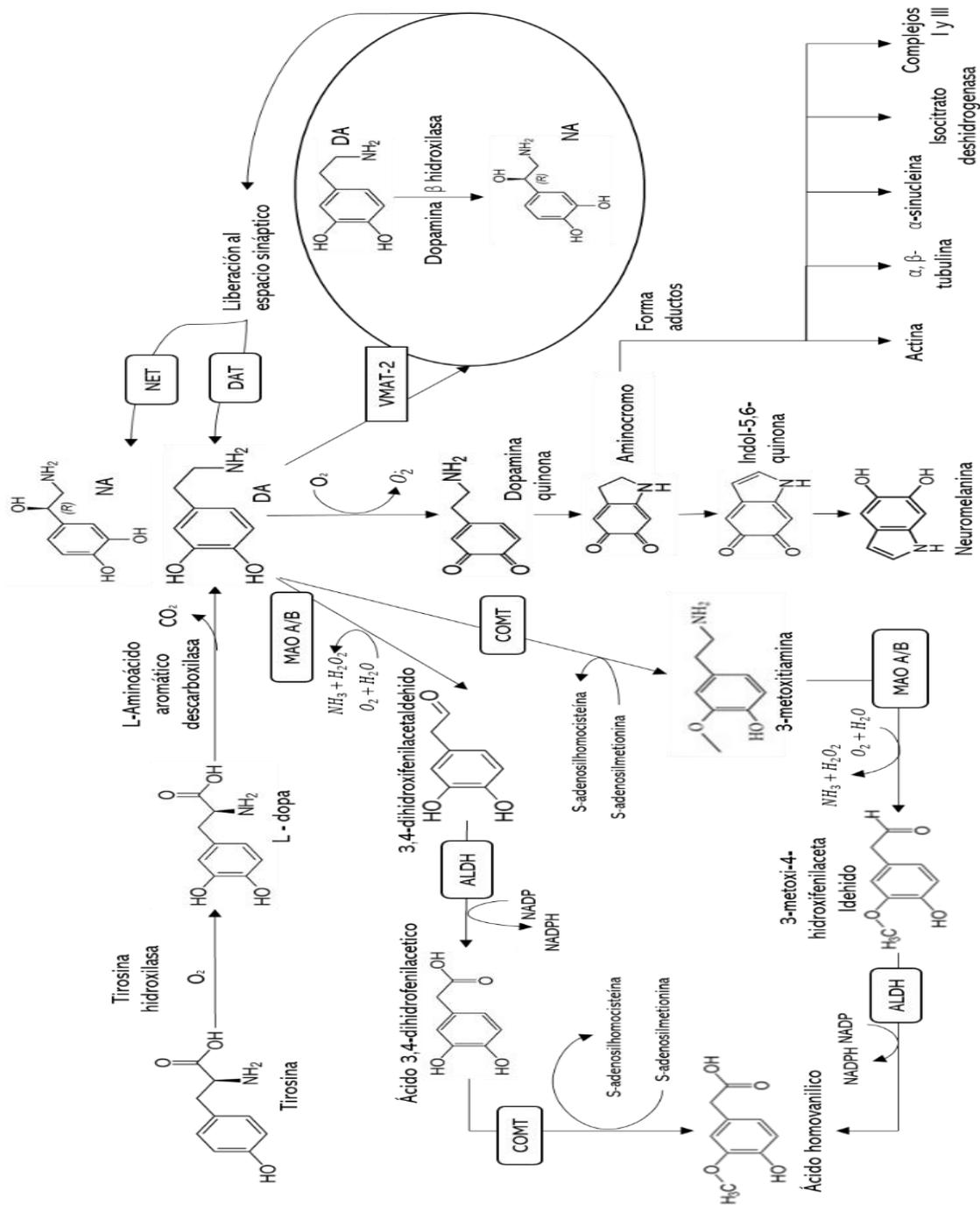
excitación ante un estímulo, la atención y regulación del estado de sueño o vigilia (Duszkiewicz, A. J. et al., 2019; Hussain, L. S. et al., 2022; Rho, H. J. et al., 2018).

La biogénesis de estas catecolaminas tiene una misma ruta metabólica que puede iniciar con la fenilalanina o tirosina en el citosol celular, la última se hidroxila a dihidroxifenilalanina (DOPA) por la tirosina hidroxilasa y posteriormente es descarboxilada por L-aminoácido descarboxilasa para producir DA. La DA sintetizada se transporta en vesículas a través del transportador vesicular de monoaminas (VMAT), donde la enzima DA beta-hidroxilasa puede transformarla en NA, como se representa en la **Figura 6** (Hussain, L. S. et al., 2022; Chen, A. P. et al., 2021; Cai, Y. et al., 2021). Una vez liberadas en el espacio sináptico tras un potencial de acción, las catecolaminas se unen a la terminal postsináptica, y posteriormente pueden ser recapturadas por la neurona presináptica mediante los transportadores DAT y NET o son degradadas por las enzimas monoaminooxidasa (MAO), aldehído deshidrogenasa (ALDH) y catecol-O-metiltransferasa (COMT) hasta ácido vainillín mandélico en el caso de la NA y ácido homovanílico en el caso de la DA como se ejemplifica en la **Figura 6** (Hussain, L. S. et al., 2022; Cai, Y. et al., 2021).

Las catecolaminas en el espacio sináptico pueden pasar por un estado de autooxidación, la cual es una reacción fisiológica normal que depende del pH del medio, cuestión por la que no ocurre en las vesículas transportadoras, pero sí en el espacio sináptico; inicia con la producción de DA o-quinonas, que generan aminocromo y posteriormente 5,6-indolequinona, para polimerizarse en neuromelanina (**Figura 6**) (Cai, Y. et al., 2021; Goldstein & Kopin, 2017). Los intermediarios pueden dañar macromoléculas celulares, reaccionar con el ADN para formar aductos e inhibir a la NADH oxidasa y el complejo mitocondrial I, que en conjunto pueden ser un factor perjudicial para la supervivencia neuronal. Aunado a otros subproductos de la autooxidación de catecolaminas, el anión superóxido y radical de oxígeno, los cuales tienen el potencial de generar varias especies reactivas de oxígeno (ROS) (Goldstein & Kopin, 2017; Cai, Y. et al., 2021; Herrera, A. et al., 2017).

- EL TDAH Y EL ESTRÉS OXIDATIVO

La fisiopatología asociada al TDAH aún no está bien definida. Sin embargo, existe evidencia de la relación entre el estrés oxidativo y la neuroinflamación como factores presentes en el mismo (Corona, J. C. 2020; Álvarez, L. et al; 2020; Dunn, G. A. et al., 2019). Cuando una serie de reacciones fisiológicas en condiciones sanas producen ROS, requieren de la rápida activación de enzimas antioxidantes que las disminuyan para mantener el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, si se rompe la homeostasis se le llama estrés oxidativo y puede ocasionar daño en lípidos, proteínas, RNA y DNA (Corona, J. C. 2020; Álvarez, L. et al; 2020).



**Figura 6. Biogénesis, degradación y autooxidación de las catecolaminas. El aminoácido tirosina da lugar a L-dopa por función de la tirosina hidroxilasa, posteriormente ésta se transforma en dopamina DA que es transportada a vesículas por el transportador VMAT-2, donde en presencia de DA β - hidroxilasa puede transformarse en noradrenalina NA. Ambos neurotransmisores DA o NA se liberan al espacio sináptico y son recapturados por el transportador de dopamina DAT y noradrenalina NET, aunque el pH del medio permite que la DA se autooxide en DA-o-quinona que se cicla a aminocromo un subproducto de la producción de neuromelanina que puede formar aductos con complejos proteicos provocando la disfunción celular. La degradación por su parte, tanto para DA como para NA se lleva a cabo por las enzimas MAO, ALDH y COMT generando ácido homovanílico (Tomado y modificado de Meiser et al., 2013).**

Los altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en el cerebro lo hacen muy sensible al daño causado por el estrés oxidativo debido a la capacidad de las ROS de oxidar los mismos generando más ROS y rompiendo el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes. Las neuronas son ricas en mitocondrias, las cuales tienen funciones como la regulación del estado redox, el equilibrio iónico, la apoptosis y la señalización celular, además de la producción de ATP como fuente de energía para la célula, este proceso requiere de la producción de ROS, que si no son reguladas conducen a cambios energéticos biológicos, desencadenando la muerte celular, así como enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas (Corona, J. C. 2020). Dentro de la función mitocondrial las ROS actúan sobre la señalización de la demanda energética, provocando modificaciones en el contenido y ensamblaje de la cadena transportadora de electrones, además esta señal es utilizada por la célula para aumentar la biogénesis mitocondrial, generando una mayor masa mitocondrial (Kasai, S. et al., 2020; Cobley, J. N. et al., 2018).

Las ROS con mayor toxicidad cuando se aumenta su nivel dentro de la célula son: el ion superóxido ( $O_2^-$ ), el ion hidroxilo ( $OH^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ( $NO_3$ ). Los niveles basales de estas moléculas tienen diversas funciones, por ejemplo,  $H_2O_2$  es utilizado por macrófagos y neutrófilos contra patógenos; también son utilizadas como moléculas señalizadoras, en procesos infecciosos y de neuroinflamación, durante los cuales la concentración de ROS comienza a elevarse, induciendo la expresión de genes que codifican la expresión de defensas antioxidantes (Kasai, S. et al., 2020).

En condiciones de homeostasis, las ROS son eliminadas por defensas antioxidantes que pueden ser del tipo enzimático y no enzimático. Ejemplo de las primeras son: superóxido dismutasa (SOD, que cataliza la conversión del radical superóxido en peróxido de hidrógeno); la catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), que metabolizan peróxido de hidrógeno en  $H_2O$  y  $O_2$ ; además de proteínas como glutatión, albúmina, transferrina, haptoglobina y ceruloplasmina y vitaminas A, C y E, etc. (Cobley, J. N. et al., 2018). Cuando las defensas antioxidantes son rebasadas, las ROS pueden generar peroxidación de lípidos y proteínas, así como daño en ácidos nucleicos. El cerebro, así como otros órganos son más vulnerables a estas reacciones por el alto consumo de oxígeno y contenido lipídico, además de una baja concentración de antioxidantes (Cobley, J. N. et al., 2018).

Un estudio donde evaluaron los niveles en plasma de defensas antioxidantes en pacientes con TDAH, se encontró que la actividad de GPx estaba significativamente reducida comparada con controles sanos (Ceylan, M. F. et al., 2012). Otro estudio en plasma reveló niveles de SOD, glutatión-S transferasa (GST), GPx y CAT significativamente más bajos en niños con TDAH (El Adham, E. K. et al., 2011), así mismo Kul et al. encontraron que el estado antioxidante total (TAS) de pacientes con el trastorno fue significativamente más bajo, al igual que el estado oxidante total (TOS) y la relación entre TAS y TOS de estos fue significativamente más alta que en controles sanos (Kul, M. et al., 2015).

En el estudio en suero de pacientes Nasim et al. evaluó la capacidad antioxidante total (TAC), niveles de CAT y GSH los cuales fueron significativamente más bajos en niños con TDAH que en controles sanos (Nasim, S. et al., 2019). En el modelo SHR, Leffa y colaboradores observaron la disminución en la actividad de enzimas antioxidantes como GPx en la corteza prefrontal, pero sin diferencias en las otras regiones ni en las actividades de GSH, SOD y CAT contra los controles (Leffa, D. T. et al., 2017).

- RELACIÓN DEL TRATAMIENTO CON MPH Y EL ESTRÉS OXIDATIVO

Como se mencionó anteriormente, las catecolaminas se autooxidan produciendo ROS y el aumento la disponibilidad catecolaminérgica en el espacio sináptico (producto de los fármacos utilizados en el tratamiento del TDAH) puede generar estrés oxidativo (Goldstein & Kopin, 2017). En su ensayo Dutt y colaboradores evaluaron el efecto del tratamiento crónico con MPH en un modelo de rata Wistar, encontrando aumento del comportamiento similar a la ansiedad y la locomoción; así como niveles elevados de peroxidación lipídica en la corteza y el hipocampo; en este último se encontró además un nivel reducido de SOD (Dutt, M. et al., 2020).

Estudios previos también demostraron que el MPH aumenta los niveles de estrés oxidativo en varias regiones cerebrales del modelo de rata, evidenciado por el aumento en los niveles de malondialdehído (MDA) un producto generado a partir de la peroxidación de lípidos, además de un nivel de glutatión oxidado (GSSG) elevado mientras el GSH estaba disminuido y la actividad de antioxidantes como SOD, GPx y glutatión reductasa en el hipocampo y la corteza cerebral que se vieron afectados negativamente (Motaghinejad, M. et al., 2016; Motaghinejad, M. et al. 2017).

En el modelo de rata espontáneamente hipertensa (SHR) se evaluaron efectos del tratamiento crónico y agudo con MPH sobre peroxidación lipídica, así como las actividades de SOD y CAT. El tratamiento agudo aumentó la peroxidación de lípidos en corteza y cerebelo, mientras que redujo la actividad de CAT en esas regiones, pero de SOD, aunque esta disminuyó en el cuerpo estriado (CE). El tratamiento crónico también aumentó la peroxidación de lípidos y la actividad de CAT en la corteza prefrontal, hipocampo y CE; mientras que, la actividad de SOD aumentó en el cerebelo después del tratamiento crónico, en comparación con el grupo control (Comim, C. M. et al., 2014). Otro artículo, que describió el efecto del tratamiento crónico de MPH sobre el cerebro de rata Wistar, demostró que en corteza prefrontal aumentó los niveles de especies reactivas según la oxidación de 2'7'-diclorofluorescina (H<sub>2</sub>-DCF) así como de la peroxidación lipídica; mientras que la actividad de GPx aumentó en CE e hipocampo y la actividad de SOD y CAT aumento en cerebelo como respuesta adaptativa al estrés oxidativo (Schmitz, F. et al., 2012). La relación del tratamiento con MPH y el estrés oxidativo se ejemplifica en la **Figura 7**.

Relación del tratamiento con metilfenidato (MPH) y el estrés oxidativo		
Autor	Modelo	Resultado
Dutt, M. et al., 2020	Rata Wistar	↑ Comportamiento similar a la ansiedad ↑ Locomoción ↑ Peroxidación lipídica ↓ SOD
Motaghinejad, M. et al., 2017	Rata Wistar	↑ Malondialdehído (MDA) ↑ Glutación oxidado (GSSG) ↓ Glutación reducido (GSH) ↓ Actividad de SOD, GPx y glutación reductasa
Comim, C. M. et al., 2014	Rata SHR	↑ Peroxidación de lípidos ↓ Actividad de CAT ↓ Actividad de SOD en el cuerpo estriado
Schmitz, F. et al., 2012	Rata Wistar	↑ Niveles de especies reactivas ↑ Peroxidación lipídica ↑ Actividad de GPx ↑ Actividad de SOD y CAT

**Figura 7. Resumen del tratamiento con metilfenidato (MPH) y el estrés oxidativo. En la tabla se resumen los hallazgos citados previamente que respaldan la asociación del tratamiento con el MPH y el aumento del estado oxidativo en la rata.**

- RELACIÓN DEL TRATAMIENTO CON ATX Y EL ESTRÉS OXIDATIVO

La actividad de la ATX permite el incremento extracelular de los niveles de NA en todo el cerebro, pero se demostró que también eleva los niveles extracelulares de la DA, en la corteza prefrontal de rata (Swanson, C. M. et al., 2006). Según autores como Altunkaynak et al., la ATX podría tener efecto tóxico como resultado de la formación ROS debido a la oxidación de DA, lo que podría culminar en neurodegeneración principalmente a nivel hipocampal y del cerebelo (Altunkaynak, B. Z. et al., 2016).

En células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y células monocíticas humanas U-937 cultivadas con diferentes dosis de ATX se demostró el decremento de la enzima reparadora de DNA, 8-hidroxiguanina glicosilasa 1 (hOGG1). Esta enzima actúa ante el daño ocasionado por 8-oxo-OHdG por lo que su disminución es inversamente proporcional al nivel de estrés oxidativo (Schmidt, A. J. et al., 2010). Mientras que en células SH-SY5Y diferenciadas a un fenotipo similar a neuronas, se evaluaron concentraciones crecientes de ATX y se encontró que la concentración más alta produjo un aumento de la tasa de ROS citosólicas y mitocondriales, daño celular, y alteraciones en la función mitocondrial (Corona, J. C. et al., 2019, Carreón-Trujillo, S. et al., 2022).

Recientemente, un estudio en rata Wistar que evaluó el efecto de tratamiento crónico con ATX, demostró que tres concentraciones de ATX utilizadas aumentaron la expresión del factor de transcripción de respuesta al estrés oxidativo NF-κB, lo que sugiere que ATX puede promover

la acumulación de ROS, causando daño en el tejido cerebral (Gür, F. et al., 2021). La relación del tratamiento con ATX y el estrés oxidativo se ejemplifica en la **Figura 8**.

Relación del tratamiento con atomoxetina (ATX) y el estrés oxidativo		
Autor	Modelo	Resultado
Swanson, C. M. et al., 2006	Rata Wistar	↑ Niveles de NA en todo el cerebro ↑ Niveles extracelulares de DA en la corteza prefrontal
Schmidt, A. J. et al., 2010	Células SHSY5Y Células U-937	↓ 8-hidroxiguanina glicosilasa 1 (hOGG1). ↑ Nivel de estrés oxidativo
Corona et al 2019; Carreón-Trujillo, S. et al., 2022	Células SHSY5Y diferenciadas a un fenotipo similar a neuronas	↑ Tasa de ROS citosólicas y mitocondriales, ↑ Daño celular, y alteraciones en la función mitocondrial (biogénesis, fusión y fisión).
Gür, F. et al., 2021	Rata Wistar	↑ La expresión de NF-κB

**Figura 8. Resumen del tratamiento con atomoxetina (ATX) y el estrés oxidativo. En la tabla se resumen los hallazgos citados previamente que respaldan la asociación del tratamiento con ATX y el aumento del estado oxidativo in vivo e in vitro.**

- PAPEL DE LA NEUROINFLAMACIÓN Y TDAH

El estrés oxidativo también podría modificar la respuesta inflamatoria, una de las razones por las que se considera a la inflamación un factor importante relacionado a la sintomatología del TDAH (Dunn, G. A. et al., 2019; Vázquez-González et al., 2023). La respuesta inmune dividida en inmunidad innata y adaptativa es la defensa ante agentes potencialmente dañinos para el organismo (Stephenson, J. et al., 2018).

La primera línea de defensa es la inmunidad innata que actúa ante la infección, durante el período de reparación del tejido, al eliminar las células apoptóticas y en las reacciones ante un tumor; este tipo de inmunidad utiliza los receptores celulares que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) y patrones moleculares asociados a daño (DAMP) (Stephenson, J. et al., 2018). Durante el proceso inflamatorio la inmunidad innata puede activar a la respuesta adaptativa que es altamente específica y capaz de recordar amenazas previamente experimentadas o eliminar tumores, por medio de los linfocitos T y B, las células efectoras y sus productos secretados (Corona, J. C. 2020; Stephenson, J. et al., 2018).

Según diversos estudios, la presencia de patologías que afectan el sistema inmune periférico se encuentra elevada en pacientes con el trastorno, por ejemplo, se comprobó que el asma,

rinitis alérgica, dermatitis atópica y conjuntivitis alérgica se encontraron en mayor proporción dentro de la población con TDAH en comparación con controles sanos (Miyazaki, C. et al., 2017; Yang, C. F. et al., 2018). La respuesta inflamatoria del SNC es llamada neuroinflamación y se caracteriza por la activación de la microglía (células inmunitarias residentes del cerebro), los astrocitos, los mastocitos, los macrófagos y los oligodendrocitos, proteasas, glutamato, ROS, NO, citoquinas tóxicas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6), prostaglandinas e infiltración de células T y B, neutrófilos, monocitos/macrófagos y células dendríticas (Shabab, T. et al., 2016; Chasaide & Lynch, 2020). La neuroinflamación aumenta el riesgo y promueve la progresión de los trastornos neurodegenerativos y del neurodesarrollo, incluido el TDAH, a través de diferentes mecanismos como la activación de las células gliales, el aumento del estrés oxidativo, la pérdida de la función neuronal y los cambios en el neurodesarrollo (Stephenson, J. et al 2018; Corona, J. C. 2020).

Los astrocitos pueden tener funciones proinflamatorias y antiinflamatorias dependiendo del daño. El estado activo de los astrocitos (astrocitos reactivos) y su acumulación (astrocitosis o astrogliosis) son un sello distintivo de la neurodegeneración y la neuroinflamación. Los astrocitos reactivos muestran cambios morfológicos y proteínas de expresión alterada, como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP - considerada una proteína marcadora de la astrogliosis), así como la vimentina y la glutamina sintetasa (Liddelow, S. A. et al., 2017). Los astrocitos activados participan en la producción de ROS y conducen al estrés oxidativo, que como se ha indicado anteriormente, puede inducir neuroinflamación crónica contribuyendo a la neurodegeneración. En estados patológicos, la activación de los astrocitos conduce a su hipertrofia, proliferación, producción de mediadores inflamatorios y alteración de la comunicación con neuronas, lo que contribuye al daño de éstas (Nosi, D. et al., 2021; Liddelow, S. A. et al., 2017). Además, los astrocitos constituyen alrededor del 40 % de las células del SNC y tienen funciones del tipo A2 en el suministro de nutrientes a las neuronas (promoviendo el crecimiento y la supervivencia neuronales), la reparación sináptica, la formación de sinapsis y la transmisión sináptica y del tipo A1 en su papel proinflamatorio, secretando IL-1 $\alpha$  o hematopoyetina (citocina proinflamatoria), TNF- $\alpha$  y C1q (del sistema del complemento) (Liddelow & Barres, 2017; Stephenson, J. et al., 2018).

La microglía y los astrocitos tienen una diferenciación a los tipos M1, A1, del tipo proinflamatorio y M2, A2, inmunoreguladores, según la expresión de quimiocinas y citocinas (Stephenson, J. et al., 2018). La activación microglial es provocada por el fenotipo M1, que se asocia con un aumento de la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , proteína presente en leucocitos) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , citocina proinflamatoria), quimiocinas, ROS, óxido nítrico y prostaglandinas. El fenotipo antiinflamatorio M2 se caracteriza por la expresión de IL-10, IL-4, TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante- $\beta$ ), IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina 1), arginasa y otros factores asociados con liberación de citocinas antiinflamatorias (Réus, G. Z. et al., 2015; Vázquez-González et al., 2023).

En el TDAH, varios factores pueden causar neuroinflamación, las principales asociaciones se derivan de la comorbilidad entre el TDAH y los trastornos inflamatorios, la presencia de

polimorfismos en genes asociados al estado inflamatorio y la exposición prenatal a inflamación. (Corona, J. C. 2020; Álvarez, L. et al., 2020) Diversos estudios respaldan esta relación pues se encontraron niveles elevados de IL-6 una citocina secretada por los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos, que incrementa en respuesta a factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), en suero de pacientes con el trastorno (Darwish, A. H. et al., 2018).

Niveles más altos de proteína C reactiva (proteína plasmática que aumenta en respuesta a la inflamación) y más bajos de TNF $\alpha$ , así como de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) un factor neurotrófico de proliferación, diferenciación y supervivencia de las neuronas (Chang, J. P. C. et al., 2020). Mientras que en la rata SHR, Kozłowska et al. encontraron aumentadas IL-1 $\beta$  (citocina proinflamatoria), IL-6 (citocina con actividad antiinflamatoria y proinflamatoria) y TNF- $\alpha$  (Kozłowska, A. et al., 2019). Se ha planteado que la exposición prenatal a un ambiente inflamatorio también puede formar parte del riesgo a padecer TDAH pues los factores de tabaquismo materno, el síndrome alcohólico fetal y la obesidad materna, se asocian con mayor perfil de inflamación materno (Dunn et al., 2019); en modelos animales se demostró como éste aumento inflamatorio prenatal afecta funciones de atención y ejecutivas asociadas a trastornos del neurodesarrollo y en particular al TDAH (Mattei, D. et al., 2017).

## **II. JUSTIFICACIÓN**

Varios estudios indican la relación del estrés oxidativo y la neuroinflamación con la fisiopatología del TDAH. Además, se ha demostrado que el uso crónico del metilfenidato y la atomoxetina producen efectos secundarios nocivos, tales como incremento en el estrés oxidativo lo que aumentaría aún más los síntomas y, como resultado, desencadenaría un círculo vicioso dañino. Sin embargo, aún se desconoce la relación del tratamiento crónico con metilfenidato y atomoxetina sobre la generación de estrés oxidativo, la neuroinflamación y el daño neuronal en el cerebro, específicamente en hipocampo, una región clave en la neurofisiopatología del trastorno.

## **III. HIPÓTESIS**

La administración crónica de metilfenidato y atomoxetina producirá estrés oxidativo, aumentando la neuroinflamación y daño neuronal en el hipocampo de ratas jóvenes.

## **IV. OBJETIVOS**

- **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar los efectos del tratamiento crónico con metilfenidato y atomoxetina sobre el estrés oxidativo, la neuroinflamación y el daño neuronal en el hipocampo de ratas jóvenes.

- **OBJETIVOS PARTICULARES**

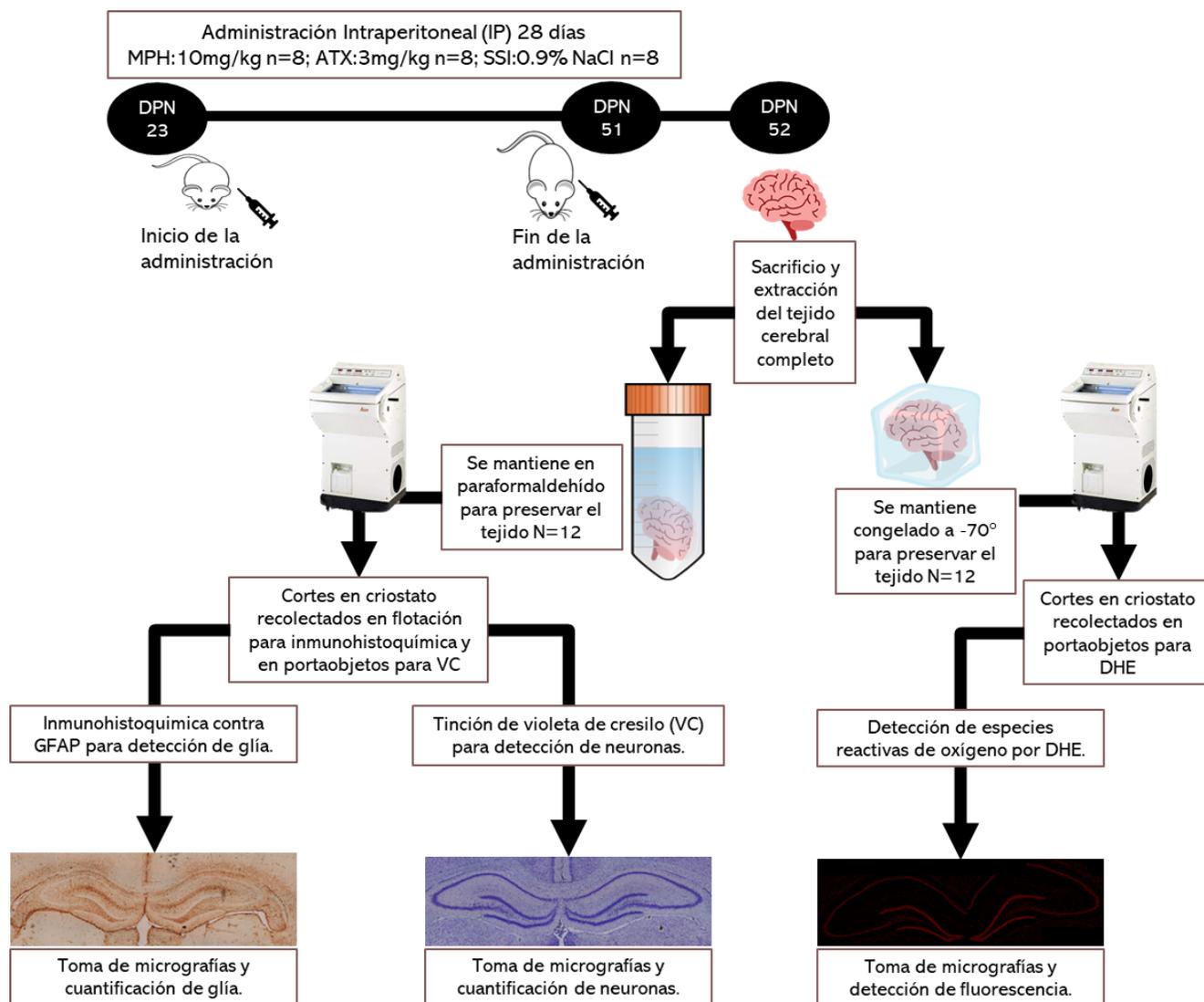
Estudiar el efecto del tratamiento con metilfenidato y atomoxetina sobre:

1. El daño neuronal, mediante la cuantificación neuronal y tinción con violeta de cresilo.
2. La neuroinflamación, por medio de la cuantificación de astrocitos positivos a GFAP.
3. El estrés oxidativo, mediante la intensidad de fluorescencia debido a la oxidación de la DHE.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### • ANIMALES Y TRATAMIENTOS

Para el presente proyecto se utilizaron ratas de la cepa Wistar (un total de n= 24 ambos sexos) con un peso promedio de 35 g al inicio del procedimiento experimental, Las ratas fueron alojadas 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 agua y alimentos ad libitum. 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. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento. En la **Figura 9** se muestra el diagrama del procedimiento experimental.



**Figura 9. Diagrama del procedimiento experimental. MPH = metilfenidato. ATX = atomoxetina. SSI = solución salina isotónica. DPN = día postnatal. DHE = dihidroetidina. GFAP = proteína ácida fibrilar glial. VC = violeta de cresilo.**

Las ratas se dividieron en tres grupos (n=8 por grupo): 1) un grupo control (CN) al cual se le administró con solución salina al 0.9 % por vía intraperitoneal una vez diariamente durante de 28 días; 2) un grupo con metilfenidato (MPH, Ritalin comprimidos, disuelto en SSI 0.9%) el cual recibió 10 mg/kg (Motaghinejad, M. et al., 2017) por vía intraperitoneal una vez diariamente durante de 28 días; 3) un grupo con atomoxetina (ATX, Strattera cápsulas, disuelto en SSI 0.9%) el cual recibió 3 mg/kg (Fumagalli, F. et al., 2010) por vía intraperitoneal una vez diariamente durante de 28 días. El tratamiento inició en el día postnatal 23 (DPN23) cuando la rata es destetada y puede separarse de la madre, por lo que se considera el inicio de la etapa prepuberal del animal (Sengupta, P. 2013). La administración tuvo una duración de 28 días (Comim, C. M. et al., 2014) con el fin de mimetizar un tratamiento crónico que persiste durante la infancia y se detiene al iniciar la adolescencia. En el DPN52 un día después del fin del tratamiento se dividió cada grupo para los distintos ensayos. Del total de ratas (24) se utilizaron 12 para los ensayos de violeta de cresilo (VC) e inmunohistoquímica (IHC) pues el procesamiento de tejido es igual para ambas metodologías, mientras que el resto se utilizó en el ensayo de detección de ROS.

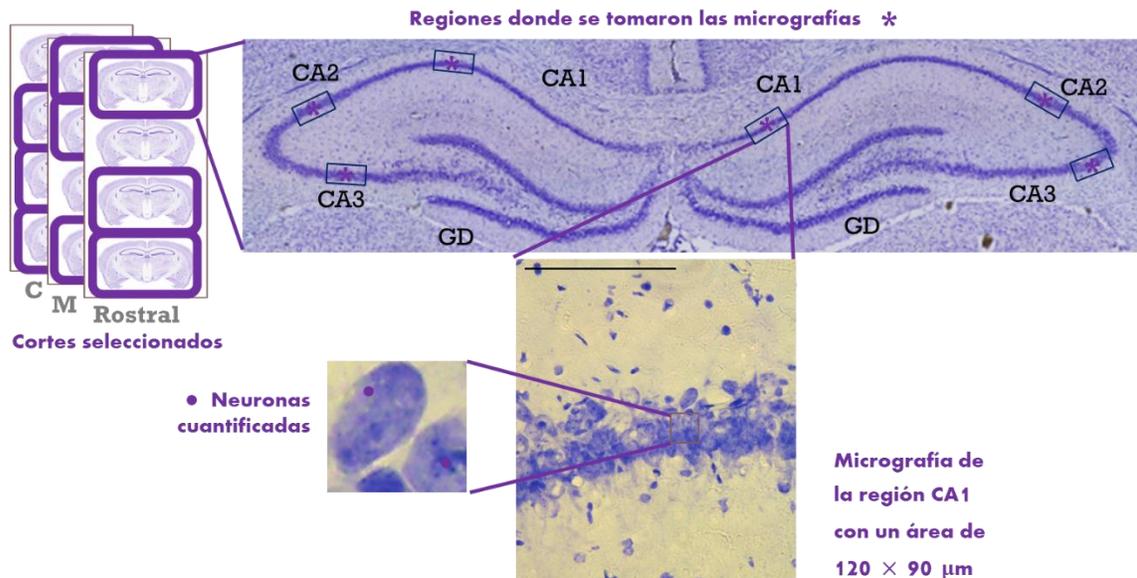
- TINCIÓN CON VIOLETA DE CRESILO

La tinción con VC es ampliamente utilizada en el tejido cerebral y se fundamenta en la afinidad de unión del colorante a estructuras ácidas como el núcleo y los ribosomas en el citoplasma de las neuronas (Zhu et al., 2015). Inmediatamente después de terminado el tratamiento (DPN52), las 12 ratas destinadas a la tinción con VC y la IHC (n=4 por grupo) se sacrificaron por decapitación usando una guillotina. Los cerebros se extrajeron rápidamente y se fijaron inmediatamente con paraformaldehído al 4 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 7 días. Posteriormente se sumergieron en sacarosa al 30 % durante 5 días, se incluyeron en Tissue-Tek® O.C.T.™ a -30 °C y en la región del hipocampo se cortaron 12 secciones coronales (20 µm de espesor) en criostato (Leica CM3050 S), 4 cortes de las zonas rostral, media y caudal se obtuvieron en portaobjetos con el fin de tener cortes representativos de todo el hipocampo.

La tinción con VC se llevó a cabo para examinar alteraciones en la morfología celular (daño neuronal) y distribución en el hipocampo después del tratamiento crónico con MPH y ATX. Brevemente, las secciones de tejido en portaobjetos se sumergieron durante 10 min en soluciones de etanol (EtOH) absoluto, al 96 %, 80 % y 50 % respectivamente y se rehidrataron con agua bidestilada durante 5 min. Luego, se tiñeron con una solución de VC (Sigma) al 0.1 % durante 5 minutos. Finalmente, las secciones se deshidrataron con etanol al 96 % y se trataron con una solución de xilol puro para así aclarar los tejidos antes de montarlos con medio de montaje Entellan™ (Merck) para su posterior observación.

Se eligieron 3 cortes al azar de cada zona (rostral, media y caudal) y se tomaron dos micrográficas a un aumento de 40 x, utilizando un microscopio invertido de campo claro (Leica DMi1) de cada una de las regiones CA1, CA2 y CA3 de ambos hemisferios, siendo un total de 9 cortes por rata. Se obtuvieron 36 imágenes por cada región hipocampal (**Figura 10**).

Las imágenes digitales de las neuronas teñidas con VC fueron capturadas en un campo de  $0.12 \times 0.09$  mm en dos secciones distintas de cada subregión hipocampal (CA1, CA2 y CA3). A partir de las cuales se realizó el conteo de células mediante el uso de un software Fiji ImageJ (Campa, V. M. 2017) para un total de 108 micrografías por cada rata. Como se ejemplifica en el esquema de la **Figura 10**. La cuantificación se realizó por dos personas una de las cuales fue un contador ciego con el fin de tener un resultado no sesgado y se reporta el número de neuronas cuantificadas en el área total de la micrografía.



**Figura 10.** Selección para la toma de micrografías en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, teñidas con violeta de cresilo (VC). Representación del proceso de selección de cortes para una rata y zonas donde se obtuvieron las micrografías para un corte. El conteo se realizó en toda el área capturada, se ejemplifican las células consideradas para el conteo por su morfología.

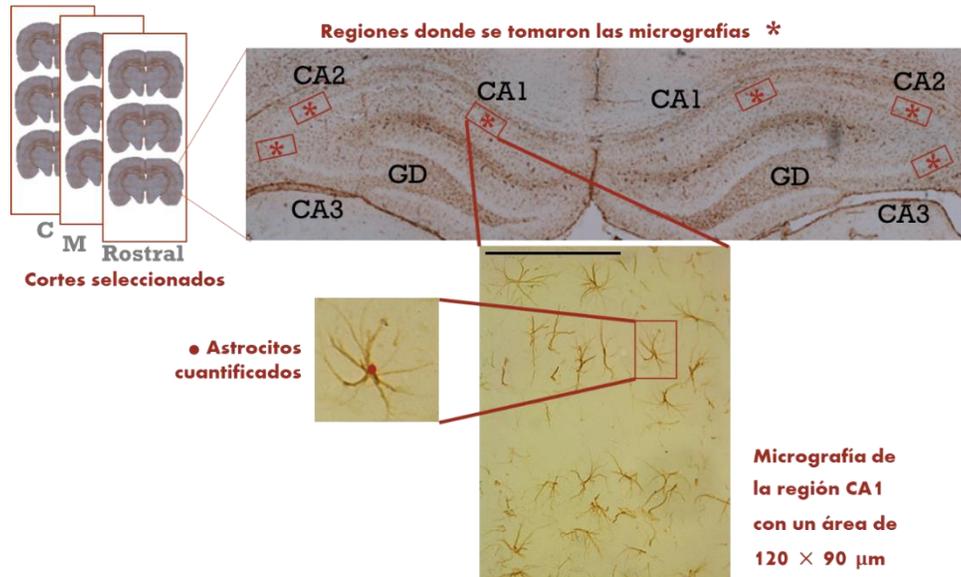
- INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizó una inmunohistoquímica (IHC) para investigar si el daño neuronal generaba astrocitos reactivos como consecuencia del tratamiento crónico con MPH y ATX. Utilizando los cerebros de las 12 ratas destinadas para la tinción con VC y la IHC contra (proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (n=4 por grupo). GFAP es una proteína fibrosa que forma los filamentos intermedios del citoesqueleto y se expresa específicamente en astrocitos por lo que se ha utilizado como marcador estándar de los mismos.

En resumen, posterior al tratamiento previamente descrito, las 12 secciones coronales del hipocampo ( $20 \mu\text{m}$  de espesor) obtenidas en criostato (Leica CM3050 S), 4 cortes de las zonas rostral, media y caudal se obtuvieron en flotación (n=4 ratas por grupo, mismas que se utilizaron en la tinción con violeta de cresilo VC). Los cortes se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a la que se agregó Triton® X-100 (Promega) 0.25%. A continuación, se inhibieron las peroxidasa endógenas con una solución de peróxido de hidrógeno al 0.3% en metanol y se incubaron en anticuerpo primario contra, proteína ácida

fibrilar glial GFAP, una proteína ampliamente utilizada como marcador de astrocitos (1:300 en PBS, mouse anti GFAP, Invitrogen. MA512023), durante toda la noche a 4 °C.

Después de lavar el anticuerpo primario, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario m-IgGk (1:600 en PBS, m-IgGk BP-HRP:sc-516102, Santa Cruz) durante 1h. Finalmente, las secciones de cerebro se visualizaron haciéndolas reaccionar con el kit de 3,3' Diaminobenzidine (DAB) (BD Pharmingen™, DAB Substrate Kit ) por 5 minutos y se lavaron en PBS antes de colocarse en portaobjetos y montarlos con medio Entellan™ (Merck) para su posterior observación en microscopio invertido de campo claro (Leica DMi1).



**Figura 11. Selección para la toma de micrografías en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, empleando inmunohistoquímica (IHC) utilizando un anticuerpo dirigido contra la proteína GFAP. Representación del proceso de selección de cortes para una rata y zonas donde se obtuvieron las micrografías para un corte. El conteo se realizó en toda el área de la micrografía, se ejemplifican las células consideradas para el conteo por su morfología.**

Para analizar cuantitativamente la inmunorreactividad de GFAP, se eligieron 3 cortes al azar de cada zona (rostral, media y caudal) y se tomaron dos micrografías a un aumento de 40 x utilizando un microscopio invertido de campo claro (Leica DMi1), de las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo para cada hemisferio, siendo 9 cortes por rata, se obtuvieron un total de 36 imágenes por cada región hipocampal.

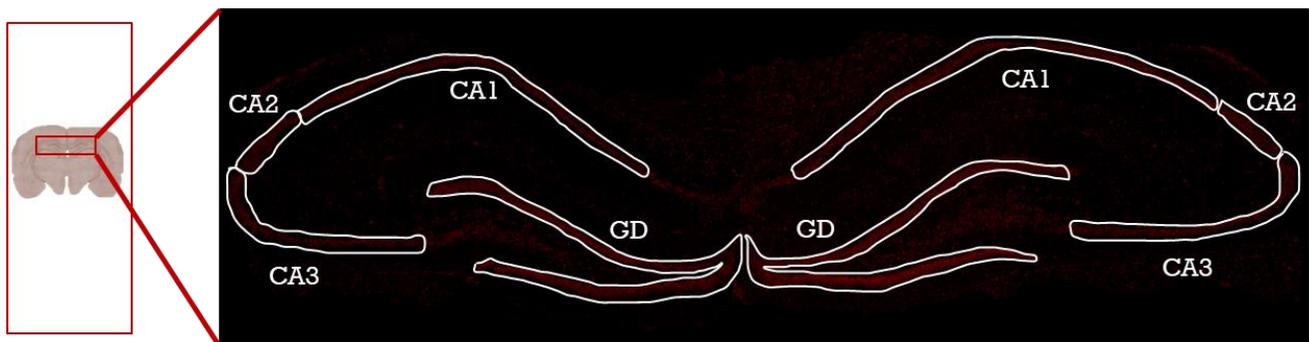
Se capturaron imágenes digitales de los astrocitos inmunorreactivos a GFAP en un campo de 0.12 x 0.09 mm en dos secciones distintas de las regiones hipocampales CA1, CA2 y CA3 y fueron cuantificadas por dos personas una de las cuales no tenía conocimiento de los grupos experimentales con el fin de tener un resultado no sesgado. A partir de éstas se realizó el conteo de células mediante el uso de un software Fiji ImageJ (Campa, V. M. 2017) para el total de 108 micrografías por cada rata. Como se ejemplifica en el esquema de la **Figura 11**.

- MEDICIÓN DEL RADICAL SUPERÓXIDO EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA

Para evaluar el impacto de los tratamientos sobre la presencia cerebral de radical superóxido, en cortes de hipocampo de los diferentes grupos (n=4 ratas por grupo). El análisis de la producción de superóxido se evaluó mediante el uso de la dihidroetidina (DHE) (Invitrogen, D11347), la cual puede detectar directamente la producción de superóxido, ya que emite una señal fluorescente azul en el citoplasma donde por acción del radical se oxida y posteriormente se intercala en el ADN emitiendo fluorescencia roja (Case, A. J. et al., 2017).

Los cerebros aislados (congelados y no fijados) se incluyeron en Tissue-Tek (Tissue-Tek® O.C.T.™) a -70 °C y se cortaron 4 secciones coronales (20 µm de espesor) del hipocampo en criostato (Leica CM3050 S). Cada sección fue colocada en portaobjetos e incubada con DHE 10 µM a temperatura ambiente durante 30 min en una cámara húmeda protegida de la luz e inmediatamente después se tomaron imágenes en un Microscopio confocal (Zeiss Axiovert 100M; excitación 488 nm, emisión 525nm).

Se realizó la reconstrucción de cortes coronales del hipocampo de las ratas de cada grupo, generada a partir de cuatro microfotografías tomadas con el microscopio confocal a un aumento 5x, para obtener la visualización de las regiones CA1, CA2, CA3 y GD, (n=4 por grupo). A partir de éstas se cuantificó la intensidad de la fluorescencia mediante el uso de un software Fiji ImageJ delimitando cada región como se representa en la **Figura 12** (Campa, V. M. 2017) para un total 16 microfotografías por rata.



**Figura 12. Selección para la cuantificación de fluorescencia en las regiones CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo, empleando dihidroetidina (DHE). En cada una de las cuatro microfotografías tomadas se delimitó cada subregión y se cuantificó la intensidad de la fluorescencia.**

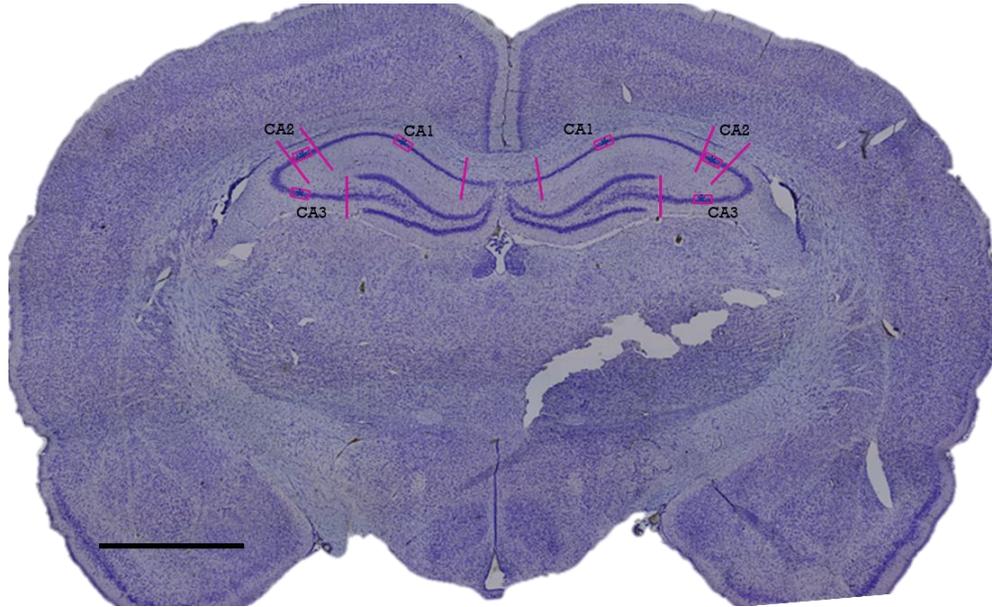
- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism (Versión Prism 6.01, Inc., La Jolla, CA). Los datos se expresaron como la media ± desviación estándar (DE) de al menos 4 experimentos independientes. Las diferencias entre grupos se compararon mediante un análisis de varianza ANOVA unidireccional con prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Se consideró un intervalo de confianza de 95%, la diferencia significativa con respecto al grupo control fue cuando  $*p < 0,05$  y se incluyeron valores  $*p$  entre 0,01 y 0,001.

## VI. RESULTADOS

- DAÑO NEURONAL EN EL HIPOCAMPO DE RATAS JÓVENES DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON MPH Y ATX.

La morfología y distribución celular en el hipocampo de las ratas después del tratamiento crónico con MPH y ATX se evaluaron mediante la tinción con VC para examinar alteraciones que indicaran un daño neuronal.

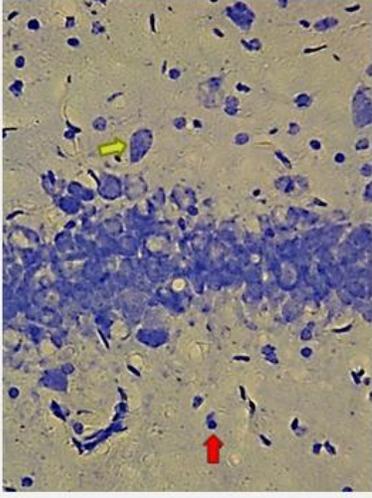
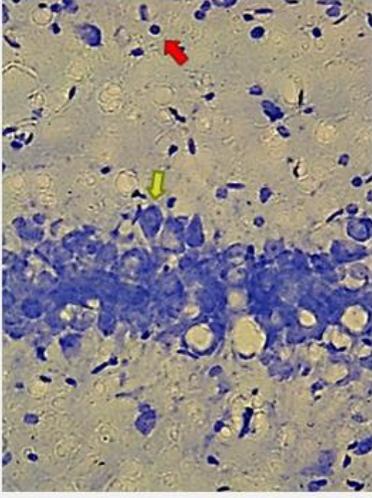
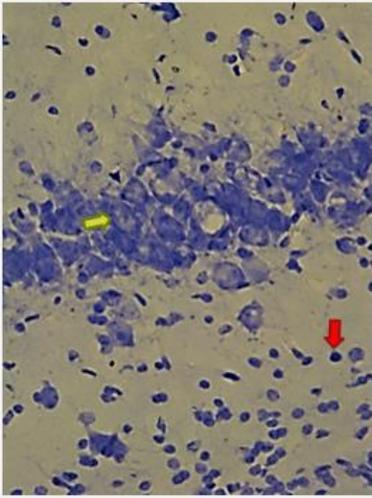
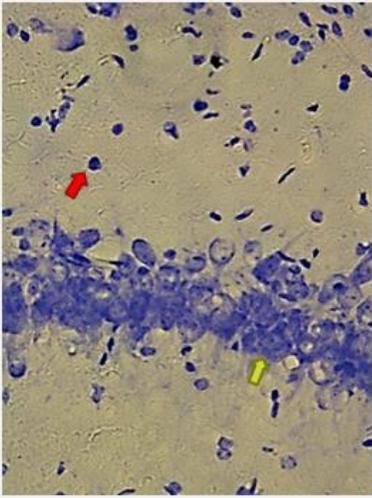
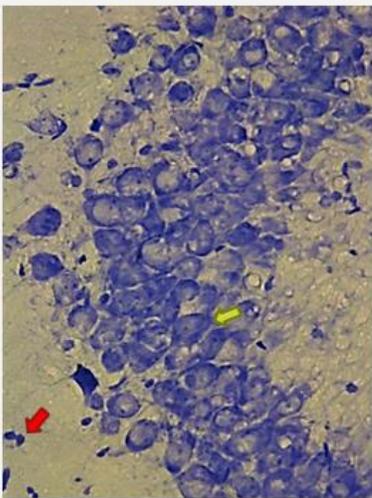
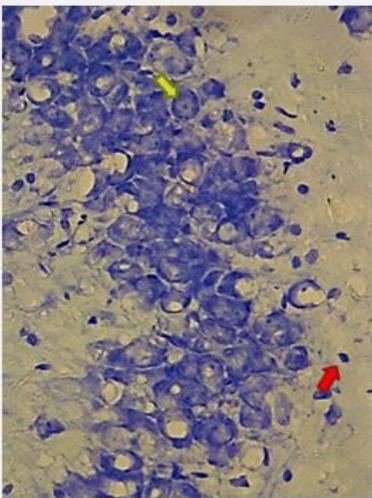


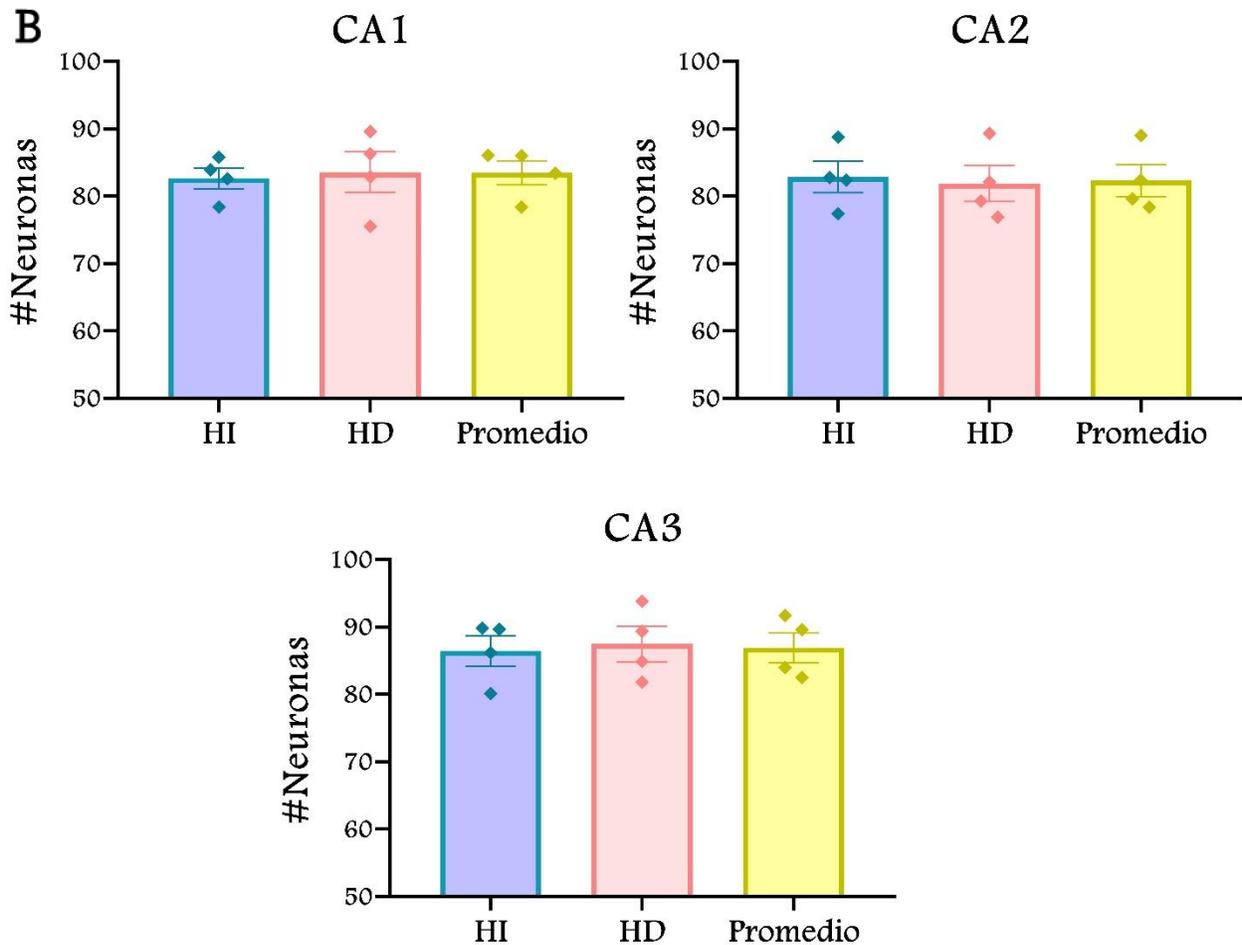
**Figura 13.** Fotomicrografía representativa de la región hipocampal de una rata control (CN), teñida con violeta de cresilo VC. Se señala el área delimitada para cada subregión connus ammonis 1, 2 y 3 (CA1, CA2 y CA3). Las líneas rosas representan el inicio y fin de una región y los recuadros representan el lugar donde se capturó una micrografía a un aumento 40x. Barra de escala 2 mm.

En la **Figura 13** se muestra una imagen representativa del hipocampo de una rata control (CN), teñido con VC, los recuadros representan las regiones de interés (CA1, CA2 y CA3) seleccionadas para la toma de microfotografías a un aumento de 40X, se capturaron dos micrografías digitales por región en cada hemisferio.

Al realizar la evaluación histológica mediante tinción con VC en el hipocampo del grupo CN, se pudo observar la capa de células piramidales correctamente teñida, con cuerpos celulares claramente grandes y un citoplasma visible alrededor del núcleo señaladas en color amarillo en la **Figura 14 A**, con un solo nucleolo y de 1-4 gránulos de cromatina mientras que el resto de los cuerpos celulares se consideraron células gliales: astrocitos, oligodendrocitos y microglía, señalados con flechas rojas (**Figura 14 A**), esto últimos presentan una coloración oscura y tamaño pequeño en comparación con las células neuronales (Zhu et al., 2015). En ambos hemisferios (derecho e izquierdo) se visualiza una cantidad similar de neuronas, la cuantificación del número de neuronas en las distintas regiones (CA1, CA2 y CA3) de las ratas del grupo CN inyectadas con solución salina, se puede observar en la **Figura 14 B**.

A

CN	Izquierdo	Derecho
CA1		
CA2		
CA3		



**Figura 14.** Imágenes representativas y cuantificación neuronal en cortes de hipocampo teñidos con VC del grupo CN. (A) Fotomicrografías donde se muestran las subregiones del hipocampo (CA1, CA2 y CA3), del hemisferio derecho (HD) e izquierdo (HI), las flechas amarillas señalan neuronas con la morfología descrita, las flechas rojas señalan células gliales. (B) La cuantificación neuronal se realizó en 18 micrografías por rata para cada región CA1, CA2 y CA3 tanto del HD en rosa como el HI en azul, la barra amarilla representa el promedio de ambos hemisferios. Aumento 40x, (n=4).

Es importante destacar que las dos micrografías tomadas para cada subregión (CA1, CA2 y CA3) fueron capturadas en zonas al azar dentro del campo limitado ilustrado en rosa, como se muestra en las **Figura 13**.

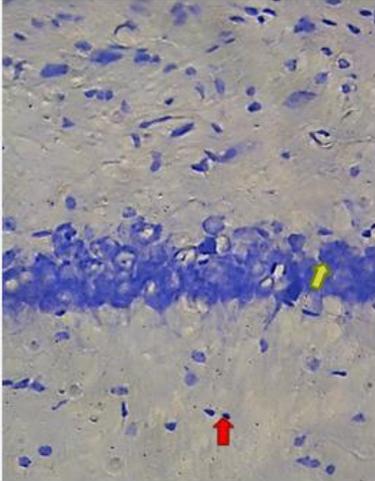
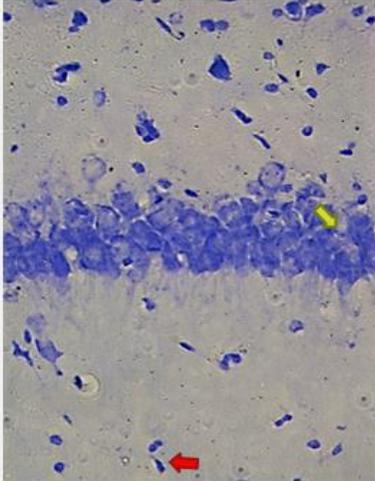
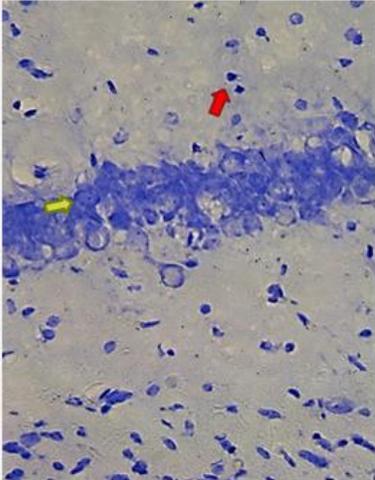
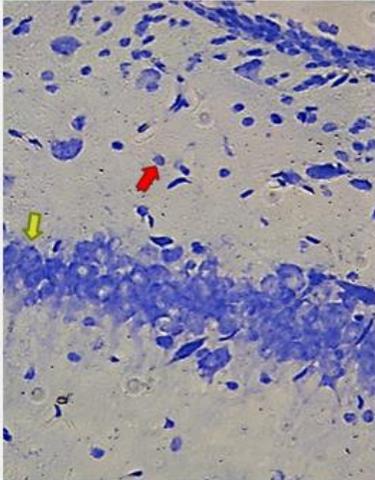
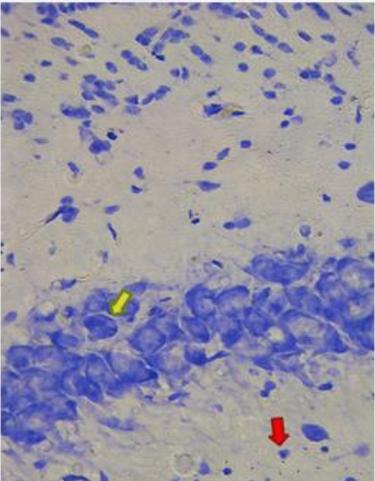
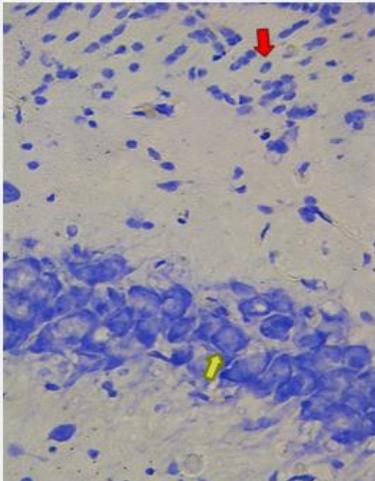
Después realizamos la evaluación histológica mediante tinción con VC del hipocampo de las ratas del grupo tratado crónicamente con MPH (10 mg/kg) durante 28 días intraperitonealmente y como se observa en las microfotografías no hay una disminución en la densidad de la capa de células piramidales en el hipocampo en ambos hemisferios tanto de la región CA1 como CA2, sin embargo, el tratamiento con MPH disminuyó la densidad en la capa de células piramidales en la región CA3 de ambos hemisferios (**Figura 15 A**) comparado con el grupo CN. En la **Figura 15 B** se puede observar la cuantificación de células en ambos hemisferios de las ratas del grupo tratado con MPH, y el promedio de ambos hemisferios.

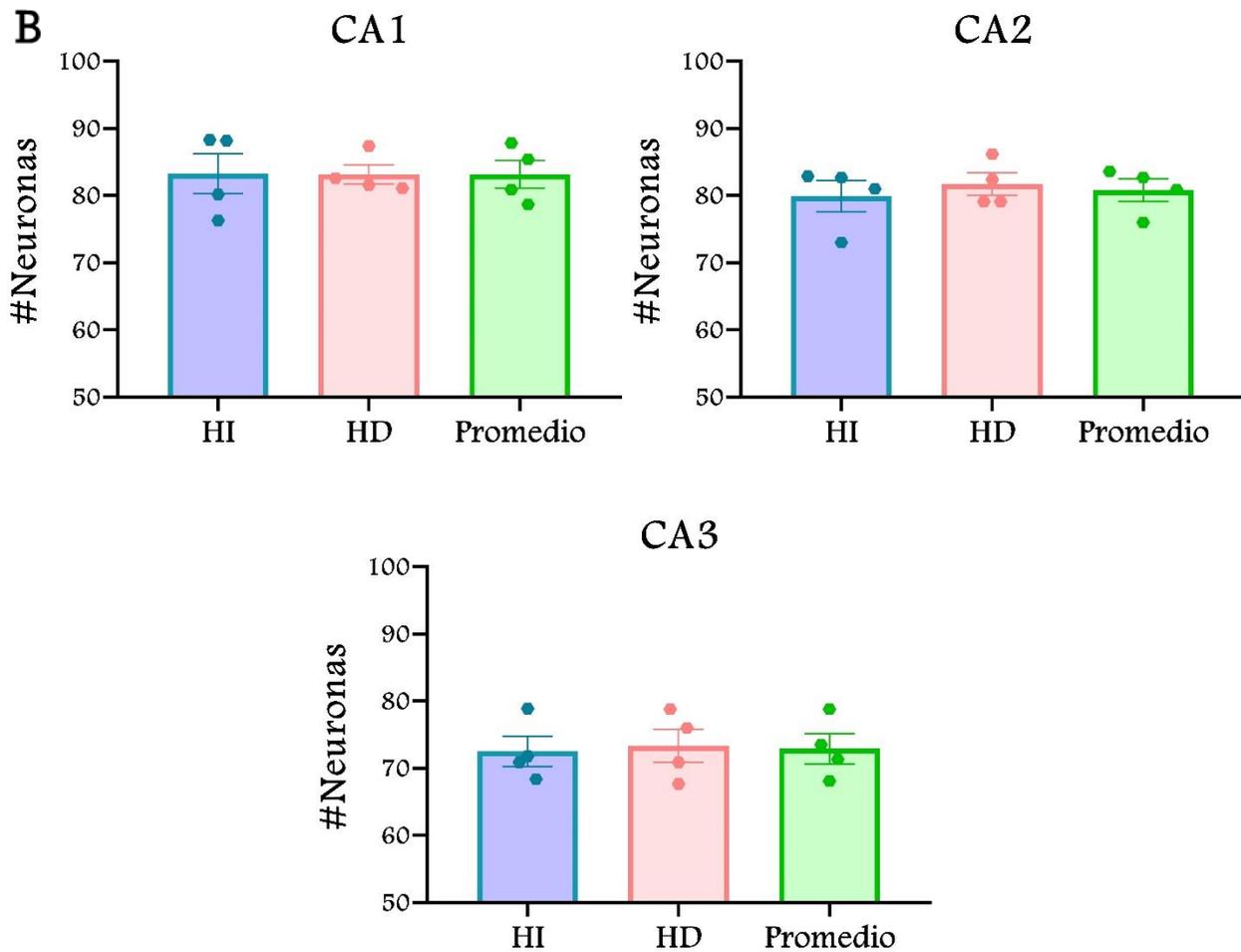
Posteriormente, realizamos la evaluación histológica mediante tinción con VC del hipocampo de las ratas del grupo tratado crónicamente con ATX (3 mg/kg) durante 28 días intraperitonealmente y como se observa en las microfotografías no hay una disminución en la densidad de la capa de células piramidales en el hipocampo en ambos hemisferios en la región CA2, sin embargo, el tratamiento con ATX disminuyó la densidad en la capa de células piramidales en las regiones CA1 y CA3 de ambos hemisferios (**Figura 16 A**) comparado con el grupo CN. En la **Figura 16 B** se puede observar la cuantificación de células en ambos hemisferios de las ratas del grupo tratado con ATX, y el promedio de ambos hemisferios.

En la **Figura 17** se pueden observar y comparar las microfotografías del daño neuronal inducido por el tratamiento crónico con MPH y ATX en relación con el grupo CN, así como el cambio en la morfología de las células piramidales, con cuerpos celulares más pequeños con una coloración oscura señaladas con flechas rosas.

Al realizar el análisis estadístico del número de neuronas viables (densidad en la capa de células piramidales) en los tres grupos y en las tres regiones hipocampales, en la **Figura 18**, se puede observar que el tratamiento crónico con MPH no produjo alteraciones en la densidad neuronal en las regiones CA1 y CA2, pero si causó una reducción estadísticamente significativa en la región CA3 con respecto al grupo CN, mientras que el tratamiento crónico con ATX no produjo cambios notables en la densidad neuronal en la región CA2, pero si causó una reducción estadísticamente significativa en las regiones CA1 y CA3 con respecto al grupo CN. Finalmente, ambos tratamientos crónicos tuvieron efectos nocivos causando daño neuronal en el hipocampo de la rata.

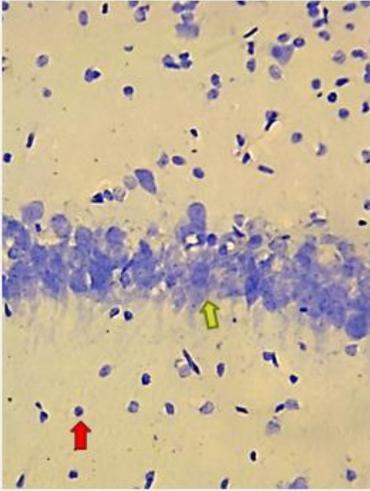
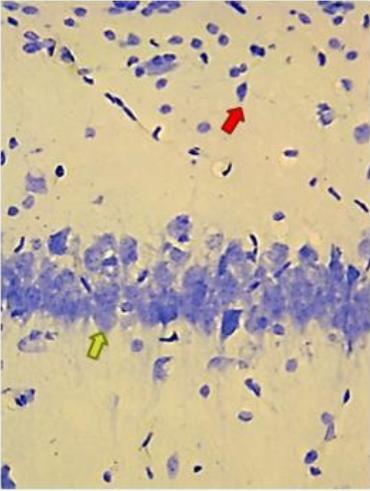
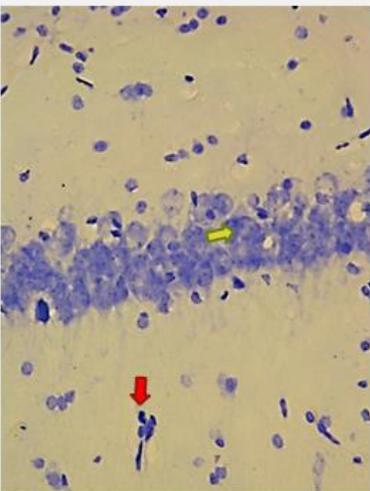
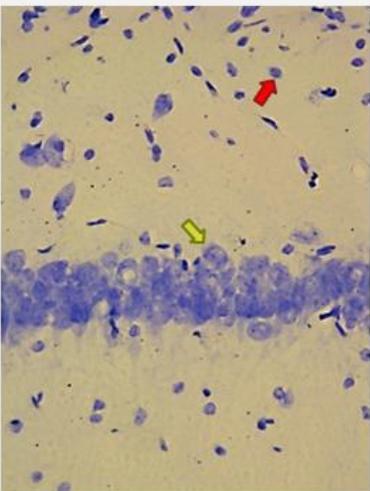
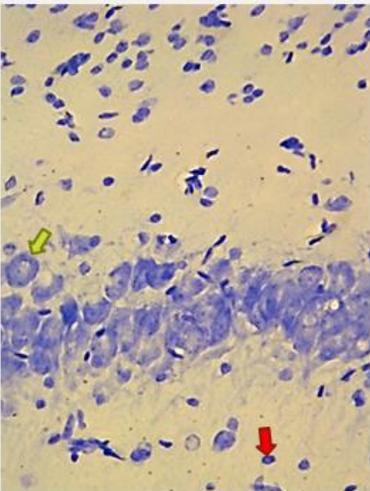
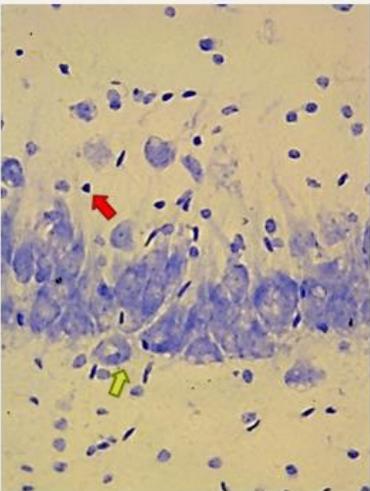
A

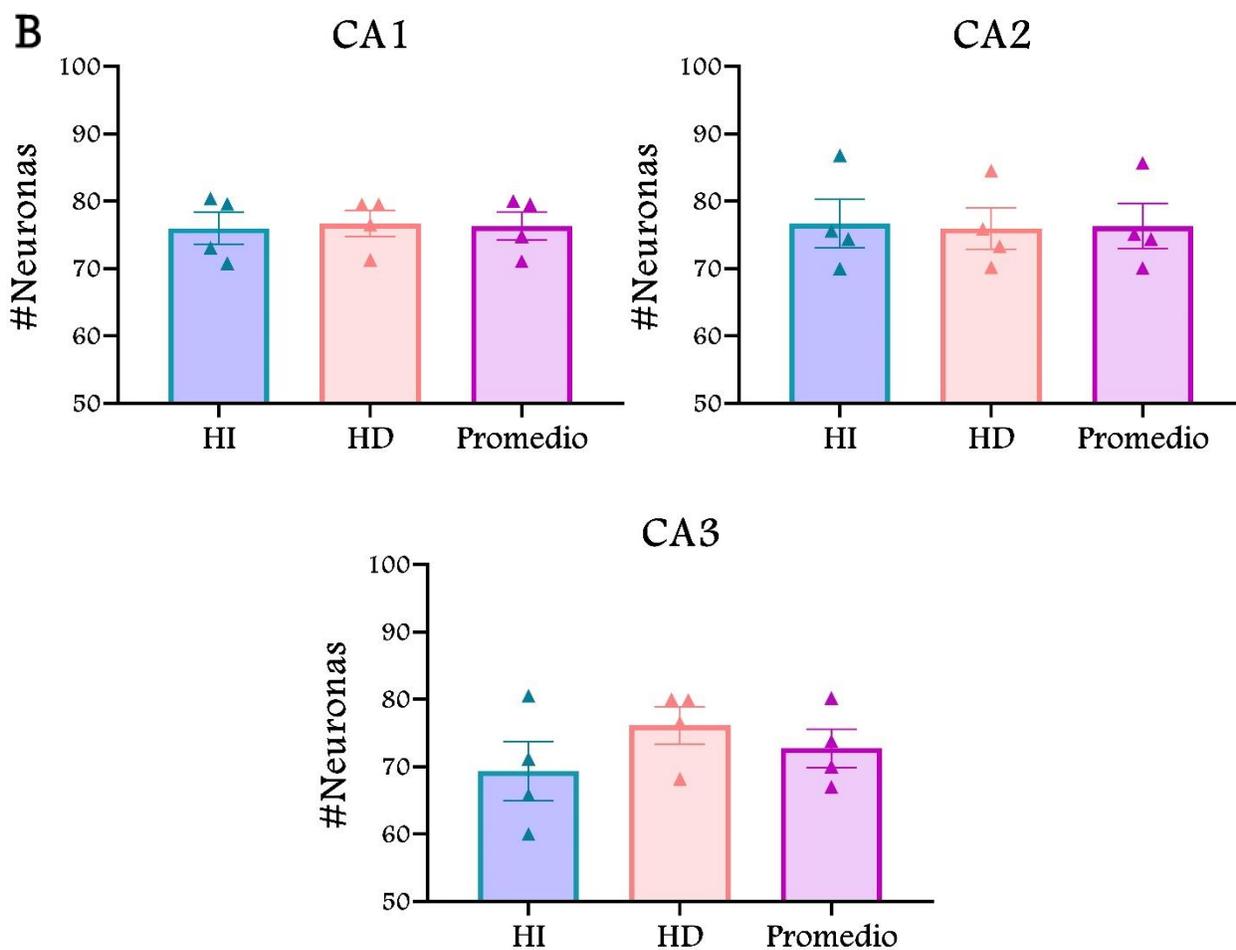
MPH	Izquierdo	Derecho
CA1		
CA2		
CA3		



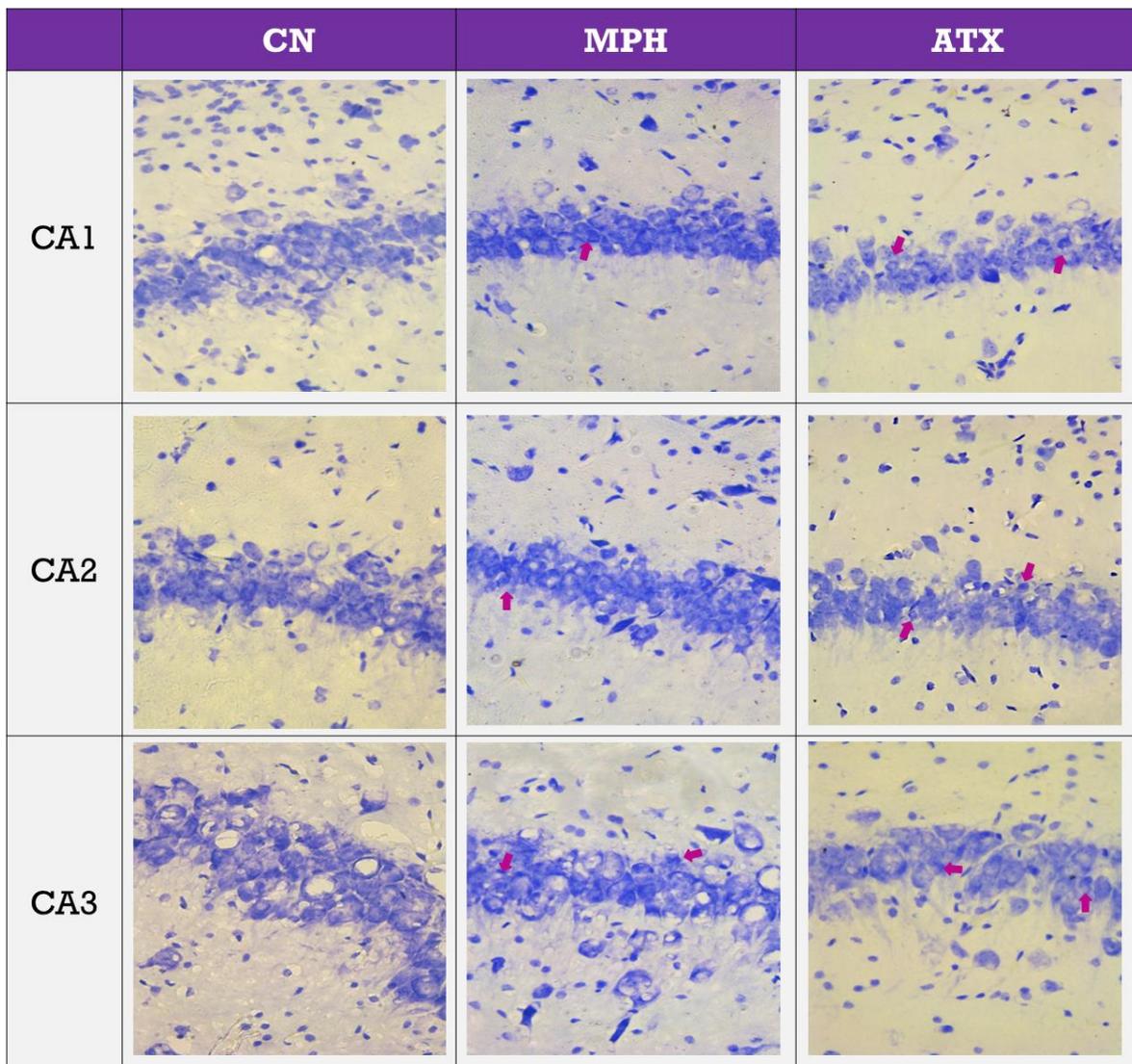
**Figura 15. Imágenes representativas y cuantificación neuronal en cortes de hipocampo teñidos con VC del grupo tratado crónicamente durante 28 días con MPH. (A) Fotomicrografías donde se muestran las subregiones del hipocampo (CA1, CA2 y CA3), del hemisferio derecho (HD) e izquierdo (HI), las flechas amarillas señalan neuronas con la morfología descrita, las flechas rojas señalan células gliales. MPH disminuyó la densidad en la capa de células piramidales en la región CA3 de ambos hemisferios. (B) La cuantificación neuronal se realizó en 18 micrografías por rata para cada región CA1, CA2 y CA3 tanto del HD en rosa como el HI en azul, la barra verde representa el promedio de ambos hemisferios. Aumento 40x, (n=4).**

A

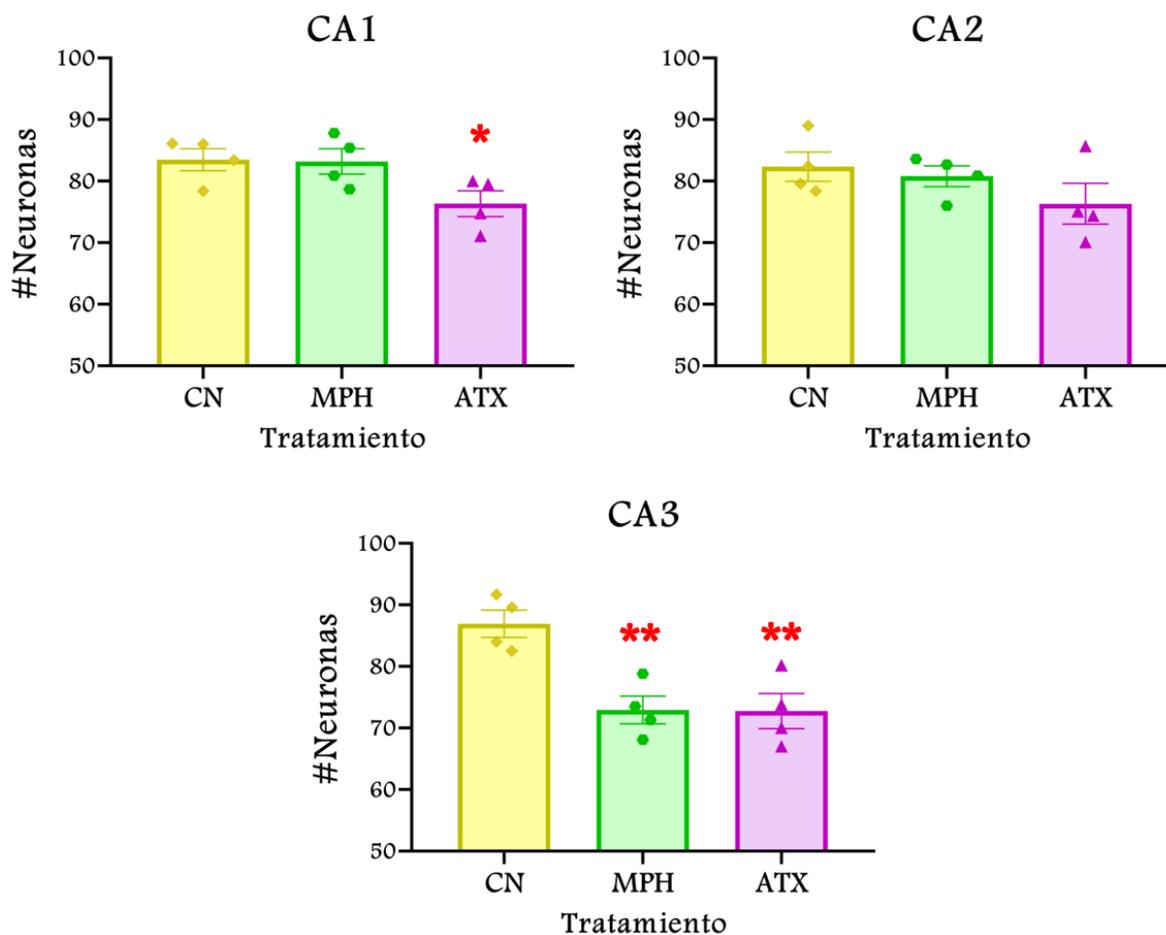
ATX	Izquierdo	Derecho
CA1		
CA2		
CA3		



**Figura 16. Imágenes representativas y cuantificación neuronal en cortes de hipocampo teñidos con VC del grupo tratado crónicamente durante 28 días con ATX. (A) Fotomicrografías donde se muestran las subregiones del hipocampo (CA1, CA2 y CA3), del hemisferio derecho (HD) e izquierdo (HI), las flechas amarillas señalan neuronas con la morfología descrita, las flechas rojas señalan células gliales. El tratamiento con ATX disminuyó la densidad en la capa de células piramidales en las regiones CA1 y CA3 de ambos hemisferios. (B) La cuantificación neuronal se realizó en 18 micrografías por rata para cada región CA1 CA2 y CA3 tanto del HD en rosa como el HI en azul, la barra morada representa el promedio de ambos hemisferios. Aumento 40x, (n=4).**



**Figura 17. Fotomicrografías representativas de la tinción con violeta de cresilo de las 3 regiones hipocampales en donde se puede observar y comparar el daño neuronal inducido por el tratamiento crónico con MPH o ATX con relación al grupo CN. El tratamiento crónico con MPH no produjo alteraciones en la densidad neuronal en las regiones CA1 y CA2, pero sí causó una disminución la densidad en la capa de células piramidales de CA3, mientras que el tratamiento crónico con ATX no produjo cambios notables en la densidad neuronal en la región CA2, pero sí causó una disminución la densidad en la capa de células piramidales de las regiones CA1 y CA3 con respecto al grupo CN. Las flechas rosas señalan alteraciones en la morfología neuronal. Aumento 40x.**

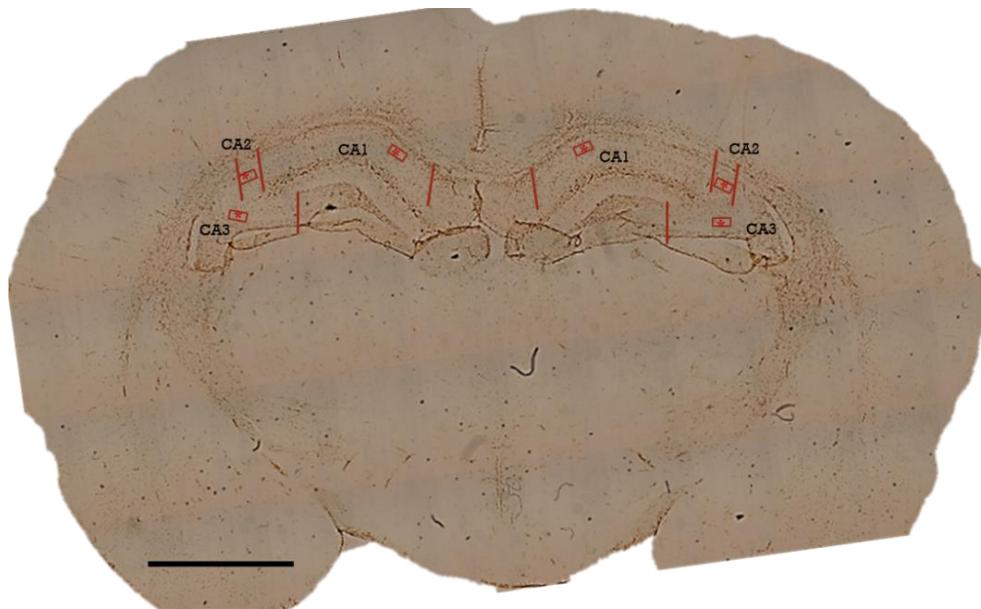


**Figura 18. Cuantificación de neuronas viables (densidad en la capa de células piramidales) en los tres grupos experimentales, en las tres regiones hipocampales (CA1, CA2 y CA3) y análisis estadísticos. Se puede observar que el tratamiento crónico con MPH causó una reducción estadísticamente significativa en la región CA3, mientras que el tratamiento crónico con ATX causó una reducción estadísticamente significativa en las regiones CA1 y CA3 con respecto al grupo CN. Cada punto corresponde al promedio de neuronas cuantificadas en 36 micrografías por rata. Los datos se expresan como la media del número total de neuronas en un área de  $10.8 \mu\text{m}^2 \pm \text{DE}$ ,  $n=4$  por grupo, prueba ANOVA de una vía con prueba post hoc de Bonferroni, intervalo de confianza 95%,  $P$  de 0.05, un asterisco (\*),  $P$  entre 0.01 y 0.05, dos asteriscos (\*\*).**

- CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN ASTROCITOS INMUNORREACTIVOS A GFAP EN EL HIPOCAMPO DE RATAS JÓVENES DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON MPH Y ATX

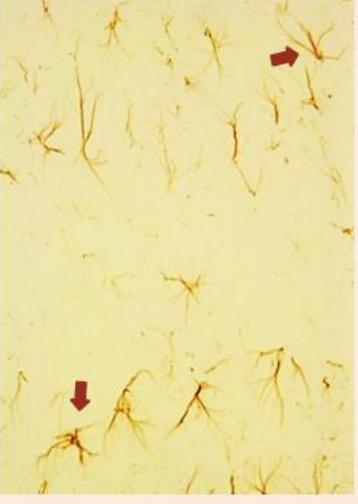
Se estableció una conexión entre la neurodegeneración ocasionada por el tratamiento crónico con MPH y ATX observada, y el proceso de neuroinflamación, que previamente ha sido reportada por varios autores, como una de las consecuencias de la fisiopatología del TDAH (Corona, J. C. 2020; Álvarez, L. et al; 2020; Dunn, G. A. et al., 2019).

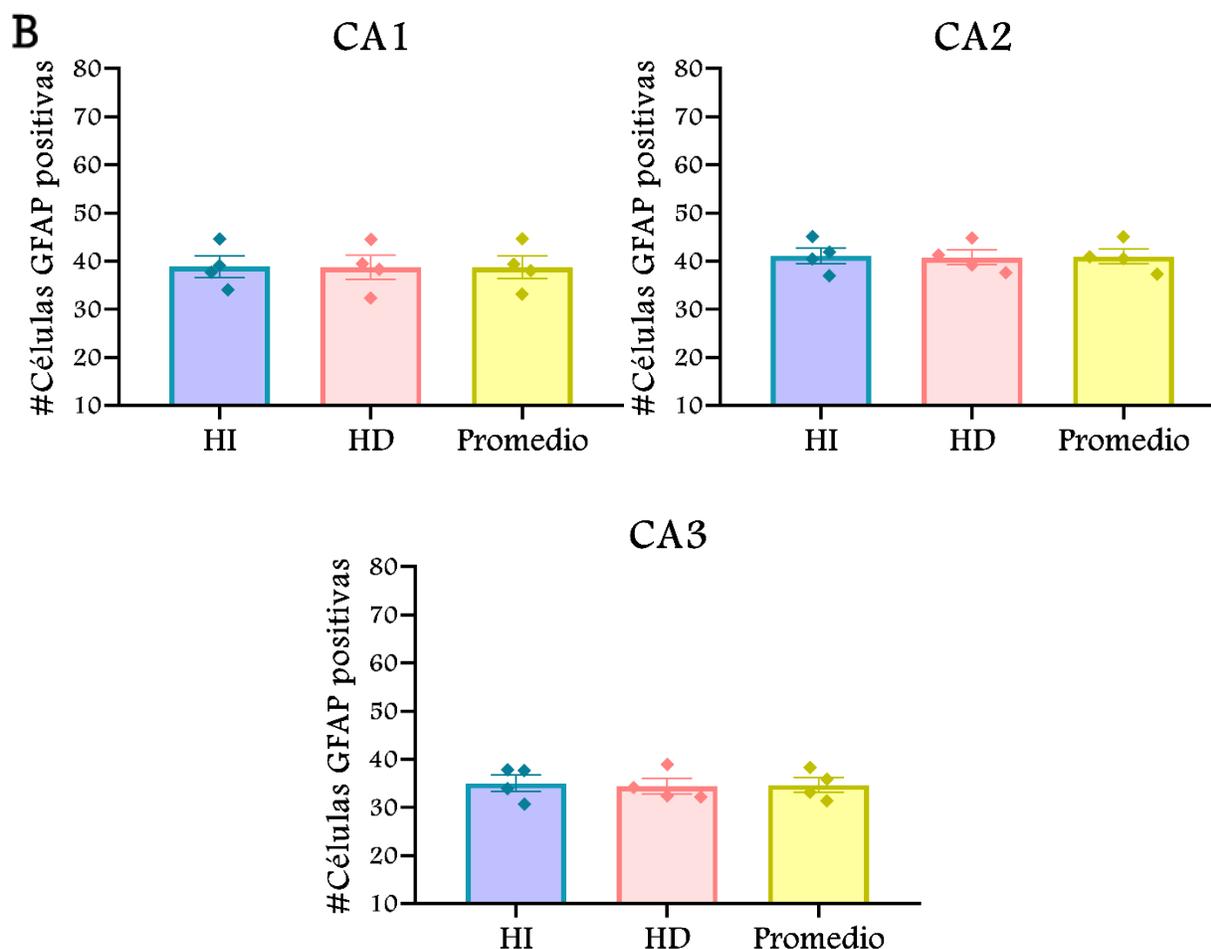
Realizamos el análisis por IHC empleando un anticuerpo dirigido contra la proteína GFAP en cada uno de los grupos experimentales. En la **Figura 19** se muestra una imagen representativa de la IHC contra GFAP en el hipocampo de una rata CN. Los recuadros representan las regiones de interés (CA1, CA2 y CA3) seleccionadas para la toma de fotografías a un aumento de 40X en ambos hemisferios. Los astrocitos se dividen en los tipos protoplásmico y fibroso, los cuales difieren en su morfología y localización anatómica. En el caso del hipocampo la morfología es del tipo protoplásmico con un cuerpo unido a ramificaciones principales que dan lugar a procesos altamente ramificados por lo que para el conteo se consideró que se observara un cuerpo unido al menos a dos proyecciones (Bushong, E. A. et al., 2002).



**Figura 19.** Fotomicrografía representativa de la inmunohistoquímica (IHC) contra GFAP de la región hipocámpal de una rata control. En los recuadros se señala el área delimitada para cada subregión connus ammonis 1, 2 y 3 (CA1, 2 y 3), las líneas rojas representan el inicio y fin de una región, los recuadros representan el lugar donde se capturo la imagen correspondiente a un aumento 40x. Barra de escala 2 mm.

**A**

<b>CN</b>	<b>Izquierdo</b>	<b>Derecho</b>
<b>CA1</b>		
<b>CA2</b>		
<b>CA3</b>		



**Figura 20.** Evaluación de la expresión de GFAP y morfología de los astrocitos en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo del grupo de ratas CN. (A) Imágenes representativas de la IHC contra GFAP en el hipocampo a un aumento de 40x correspondientes a ambos hemisferios. Con las flechas rojas se señalan los astrocitos inmunorreactivos a GFAP. (B) Cuantificación de células GFAP+ presentes en 18 micrografías por rata para cada región. Hemisferio izquierdo (HI) en azul, derecho (HD) en rosa y promedio de ambas cuantificaciones en amarillo (n=4).

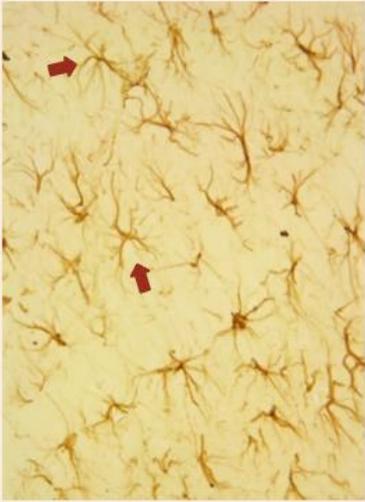
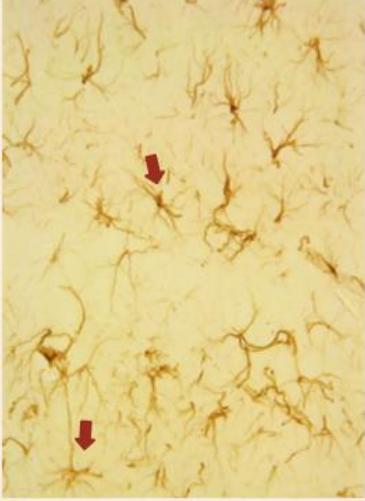
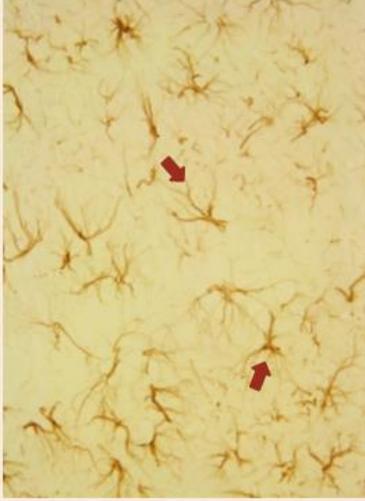
Al realizar el análisis de la morfología de los astrocitos, se observó que los astrocitos de los animales del grupo CN en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo fueron claramente identificables por la coloración café ante la presencia de GFAP, con procesos delgados y dispersos, así como cuerpos celulares pequeños y de poca presencia (**Figura 20 A**). En la **Figura 20 B** se puede observar la cuantificación de astrocitos en cada uno de los hemisferios de las ratas CN inyectadas con solución salina, en donde se representa el promedio del número de astrocitos entre ambos hemisferios en color amarillo, donde se observó una cantidad similar de astrocitos entre ellos. En cada micrografía, se cuantificó el número de células positivas totales, siguiendo lo descrito por Blanco et al., 2015; se realizó el conteo del total de células positivas en el área de la micrografía capturada (10.8  $\mu\text{m}^2$ ).

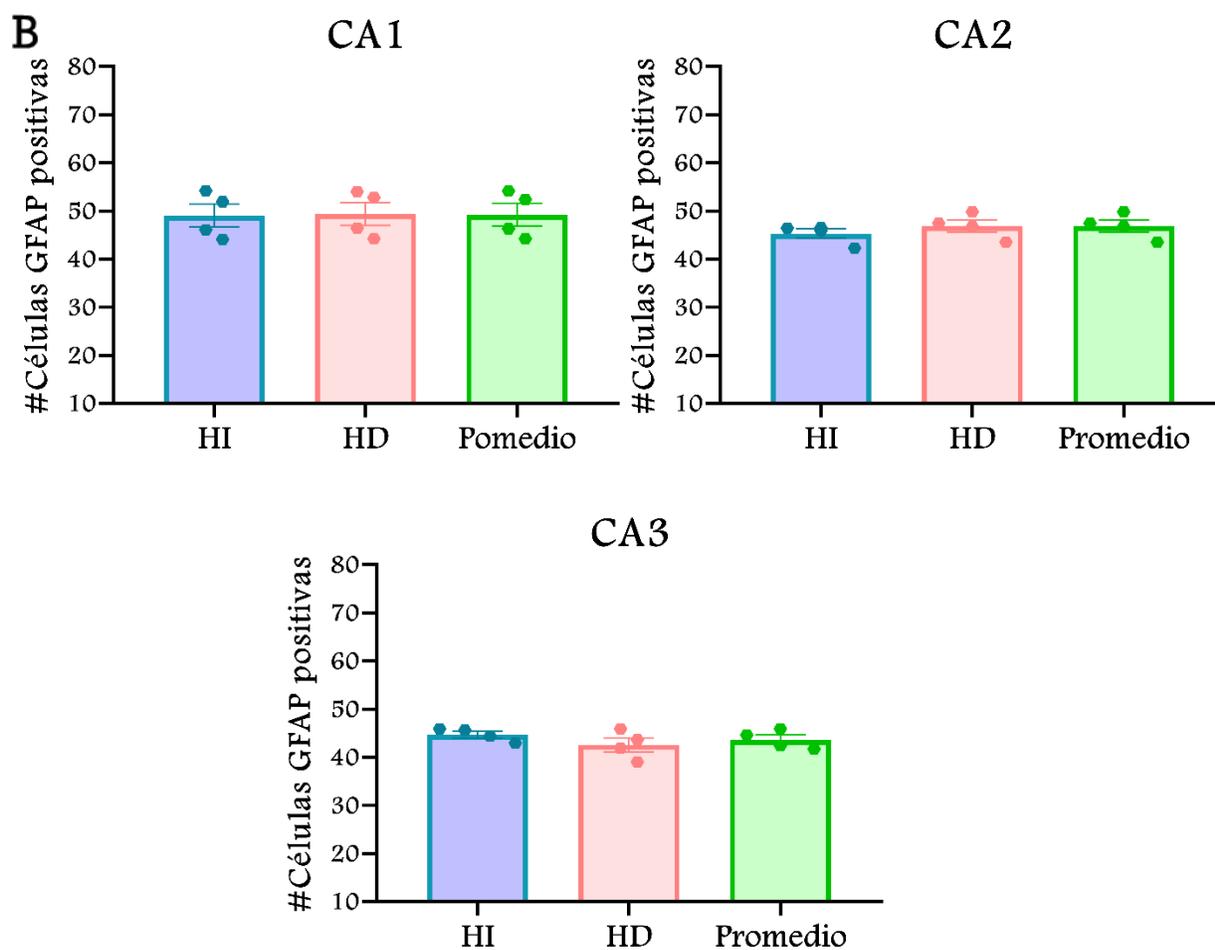
La IHC de los astrocitos positivos a GFAP está presente normalmente en astrocitos, pero permite por el reconocimiento morfológico diferenciar entre astrocitos normales y reactivos ante un daño al SNC, los cuales tienen una hipertrofia del cuerpo celular y las ramificaciones más gruesas después del inicio del proceso inflamatorio (Sofroniew, M. V. 2009). El análisis de las alteraciones morfológicas de astrocitos debido al tratamiento crónico con MPH (10 mg/kg) durante 28 días intraperitonealmente, en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo y en donde se mostraron células inmunorreactivas a GFAP, la cuales mostraron un fenotipo reactivo principalmente en las regiones CA1 y CA3 en donde se pueden observar procesos más gruesos y cuerpos celulares agrandados (**Figura 21 A**) comparado con el grupo CN. El promedio de los astrocitos inmunorreactivos a GFAP se muestran en la (**Figura 21 B**), en cada uno de los hemisferios y también se representa el promedio del número de astrocitos entre ambos hemisferios en color verde.

Finalmente, realizamos el análisis de las alteraciones morfológicas de astrocitos debido al tratamiento crónico con ATX (3 mg/kg), en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, donde se mostraron células inmunorreactivas a GFAP, la cuales tenían un fenotipo reactivo en las 3 regiones del hipocampo y en donde se pueden observar procesos más gruesos y cuerpos celulares agrandados (**Figura 22 A**), comparado con el grupo CN. El promedio de los astrocitos inmunorreactivos a GFAP en cada uno de los hemisferios y el promedio del número de astrocitos entre ambos hemisferios (color morado) se muestran en la (**Figura 22 B**). En la **Figura 23** se pueden observar y comparar las microfotografías de la IHC contra GFAP, en donde se observa el incremento en el número de astrocitos con un fenotipo reactivo debido al tratamiento crónico, tanto con MPH, como con ATX en comparación con el grupo CN.

Al realizar el conteo del número de astrocitos inmunorreactivos a GFAP en los tres grupos y en las tres regiones hipocámpales (**Figura 24**), se puede observar que el tratamiento crónico con MPH incrementó significativamente el número de astrocitos con un fenotipo reactivo principalmente en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo comparado con el grupo CN, mientras que el tratamiento crónico con ATX incremento significativamente el número de astrocitos con un fenotipo reactivo en las 3 regiones del hipocampo con respecto al grupo CN. Finalmente, ambos tratamientos crónicos tuvieron efectos nocivos causando un incremento en el proceso de neuroinflamación en el hipocampo de la rata. Cada punto en las gráficas representa el promedio de células GFAP+ cuantificadas en 36 micrografías por región para cada grupo de ratas.

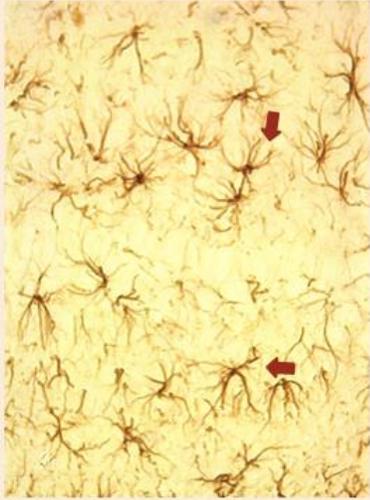
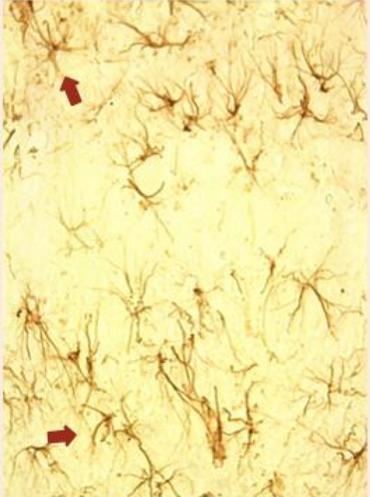
**A**

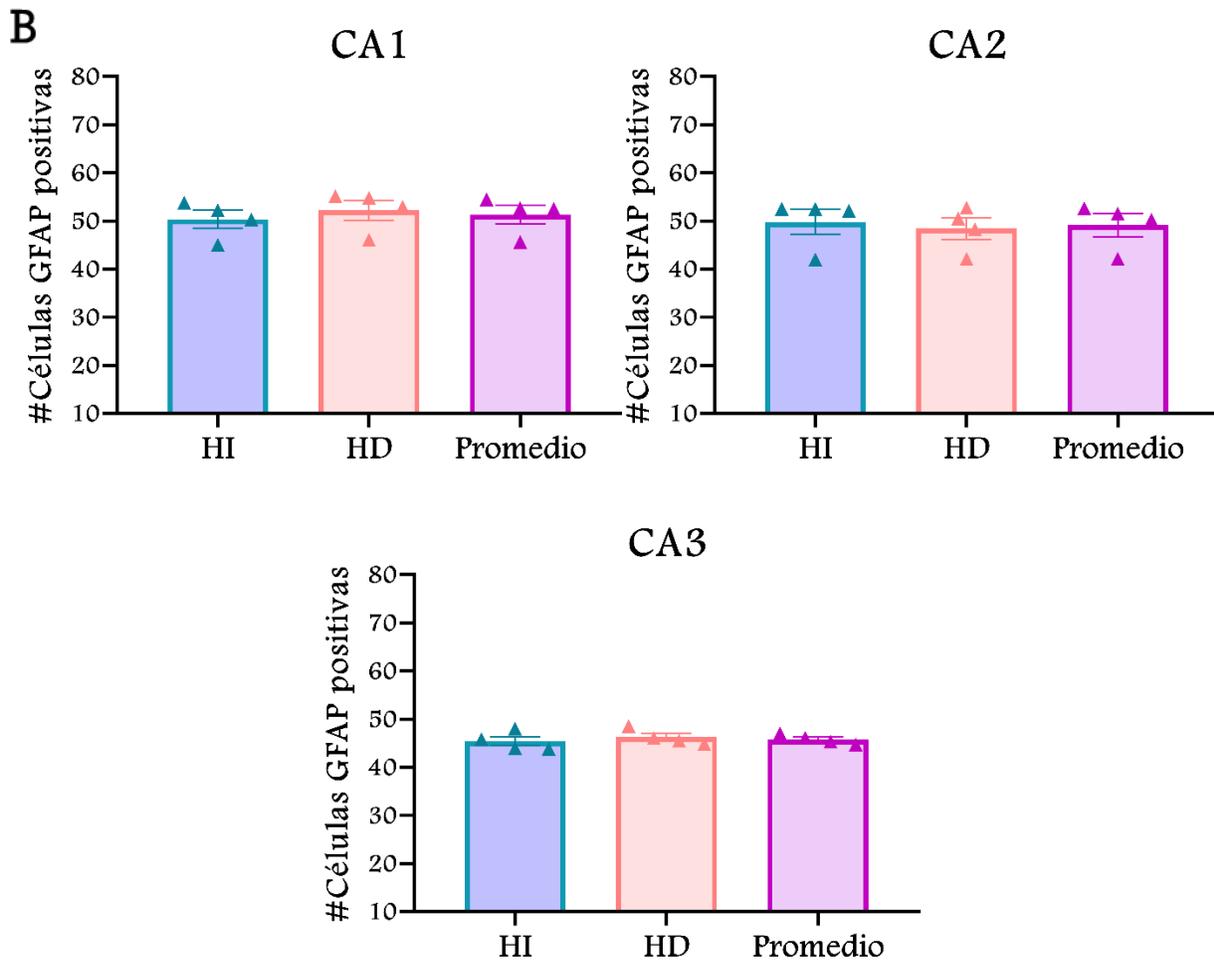
<b>MPH</b>	<b>Izquierdo</b>	<b>Derecho</b>
<b>CA1</b>		
<b>CA2</b>		
<b>CA3</b>		



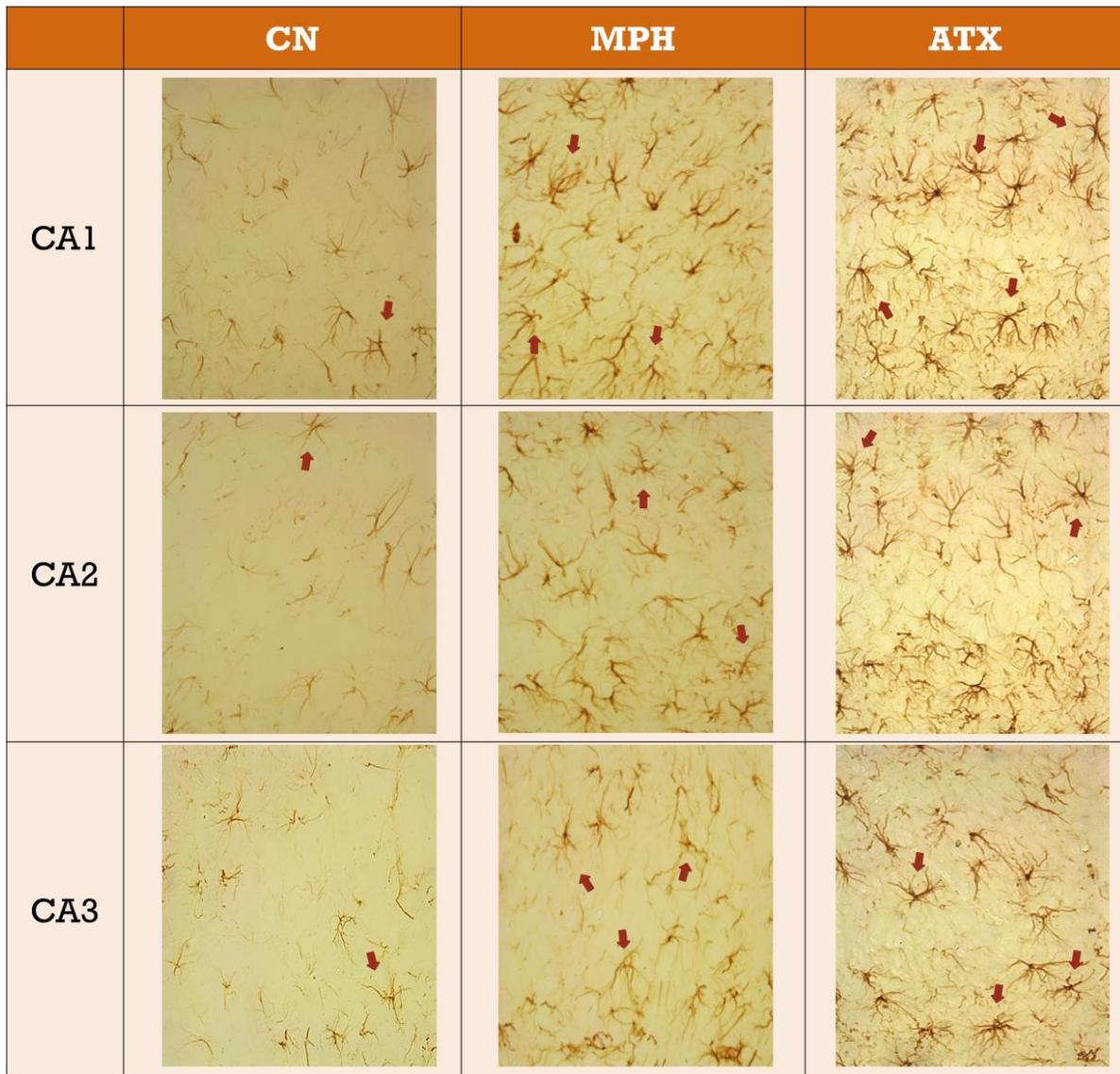
**Figura 21. Evaluación de la expresión de GFAP y morfología de los astrocitos en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo del grupo tratado crónicamente con MPH. (A) Imágenes representativas de la IHC contra GFAP en el hipocampo a un aumento de 40x correspondientes a ambos hemisferios. Con las flechas rojas se señalan los astrocitos con un fenotipo reactivo principalmente en las regiones CA1 y CA3. (B) Cuantificación de células GFAP+ presentes en 18 micrografías por rata para cada región. Hemisferio izquierdo en azul (HI), derecho en rosa (HD) y promedio de ambas cuantificaciones en verde (n=4).**

A

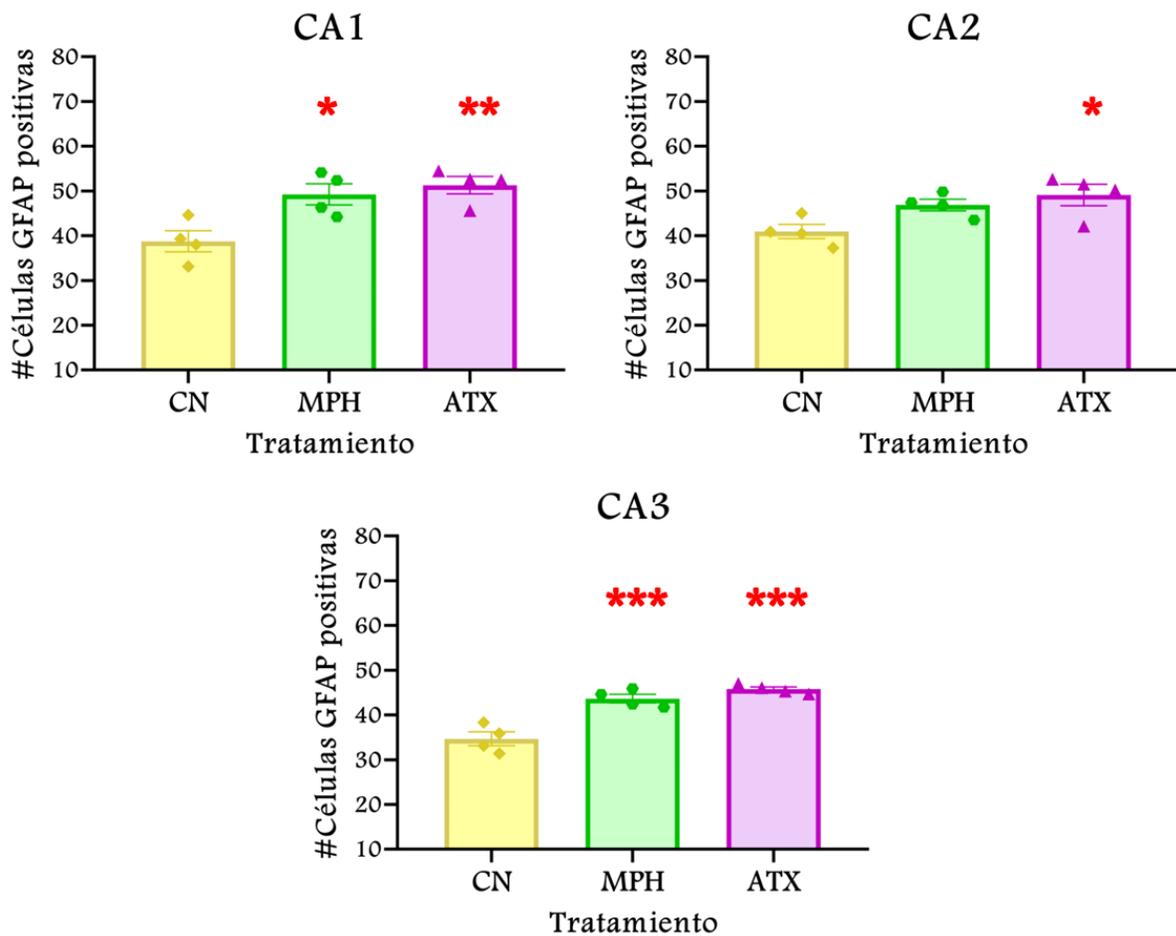
ATX	Izquierdo	Derecho
CA1		
CA2		
CA3		



**Figura 22.** Evaluación de la expresión de GFAP y morfología de los astrocitos en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo del grupo tratado crónicamente con ATX. (A) Imágenes representativas de la IHC contra GFAP en el hipocampo a un aumento de 40x correspondientes a ambos hemisferios. Con las flechas rojas se señalan los astrocitos con un fenotipo reactivo en las 3 regiones del hipocampo. (B) Cuantificación de células GFAP+ presentes en 18 micrografías por rata para cada región. Hemisferio izquierdo en azul (HI), derecho en rosa (HD) y promedio de ambas cuantificaciones en morado (n=4).



**Figura 23. Fotomicrografías representativas de la IHC contra GFAP de las 3 regiones hipocampales en donde se puede observar y comparar la inflamación inducida por el tratamiento crónico con MPH o ATX en relación con el grupo CN. El tratamiento crónico con MPH incrementó el número de astrocitos con un fenotipo reactivo principalmente en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo y el tratamiento crónico con ATX incremento el número de astrocitos con un fenotipo reactivo en las 3 regiones del hipocampo como comparado con el grupo CN. Las flechas rojas señalan los astrocitos con cambios morfológicos evidentes. Aumento 40x.**



**Figura 24. Cuantificación del número de astrocitos inmunorreactivos a GFAP en los tres grupos y en las tres regiones hipocámpales y análisis estadísticos. Se puede observar que el tratamiento crónico con MPH incrementó significativamente el número de astrocitos reactivos en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo y el tratamiento crónico con ATX incrementó significativamente el número de astrocitos reactivos en las 3 regiones del hipocampo con respecto al grupo CN. Cada punto corresponde al promedio de astrocitos cuantificados (72 micrografías por rata). Los datos se expresan como la media del número total de astrocitos GFAP+ en un área de  $10.8 \mu\text{m}^2 \pm \text{DE}$ ,  $n=4$  por grupo, prueba ANOVA de una vía con prueba post hoc de Bonferroni, intervalo de confianza 95%,  $P$  de 0,05, un asterisco (\*),  $P$  entre 0,01 y 0,05, dos asteriscos (\*\*) y  $P$  entre 0,01 y 0,001 tres asteriscos (\*\*\*).**

- EFECTO SOBRE EL NIVEL DE SUPERÓXIDO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON MPH Y ATX

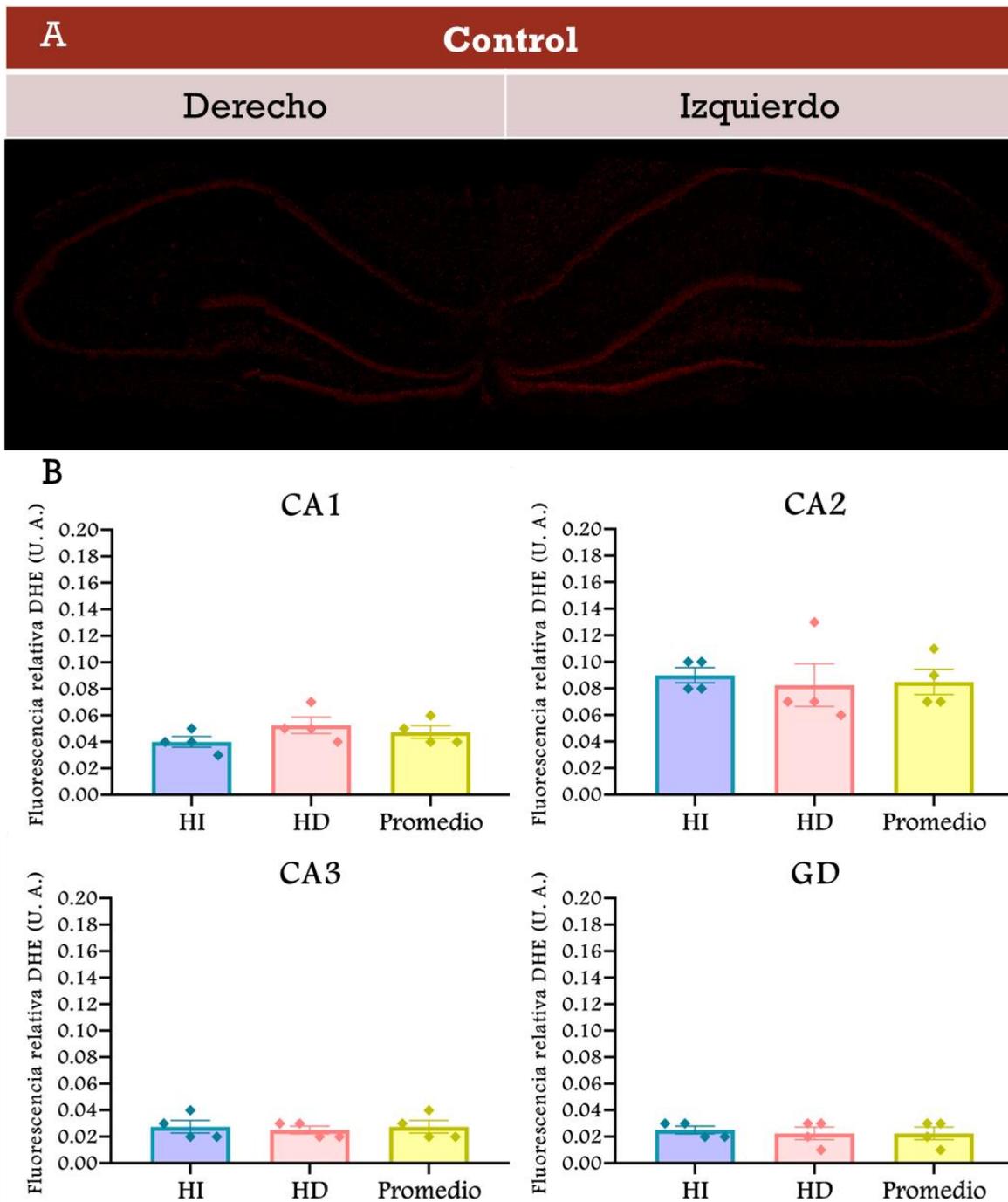
Finalmente, para evaluar la presencia de estrés oxidativo debido al tratamiento crónico con MPH y ATX, se utilizó el indicador del radical superóxido dihidroetidina (DHE). El producto de la oxidación de la DHE se utiliza para la detección del radical superóxido por la presencia de fluorescencia en color rojo.

En la **Figura 25 A** se muestra la reconstrucción de los cortes coronales del hipocampo de una rata CN, la reconstrucción fue generada a partir de cuatro microfotografías tomadas con un microscopio confocal a un aumento de 5x, en las cuales se evaluó la intensidad de fluorescencia en la capa de células piramidales de las regiones CA1, CA2 y CA3, así como en el giro dentado (GD) con el software Fiji ImageJ. En la **Figura 25 B** se puede observar el promedio de la intensidad de fluorescencia en las regiones CA1, CA2, CA3 y GD de cada uno de los hemisferios de las ratas CN inyectadas con solución salina y también se representa el promedio de la intensidad de la fluorescencia entre ambos hemisferios.

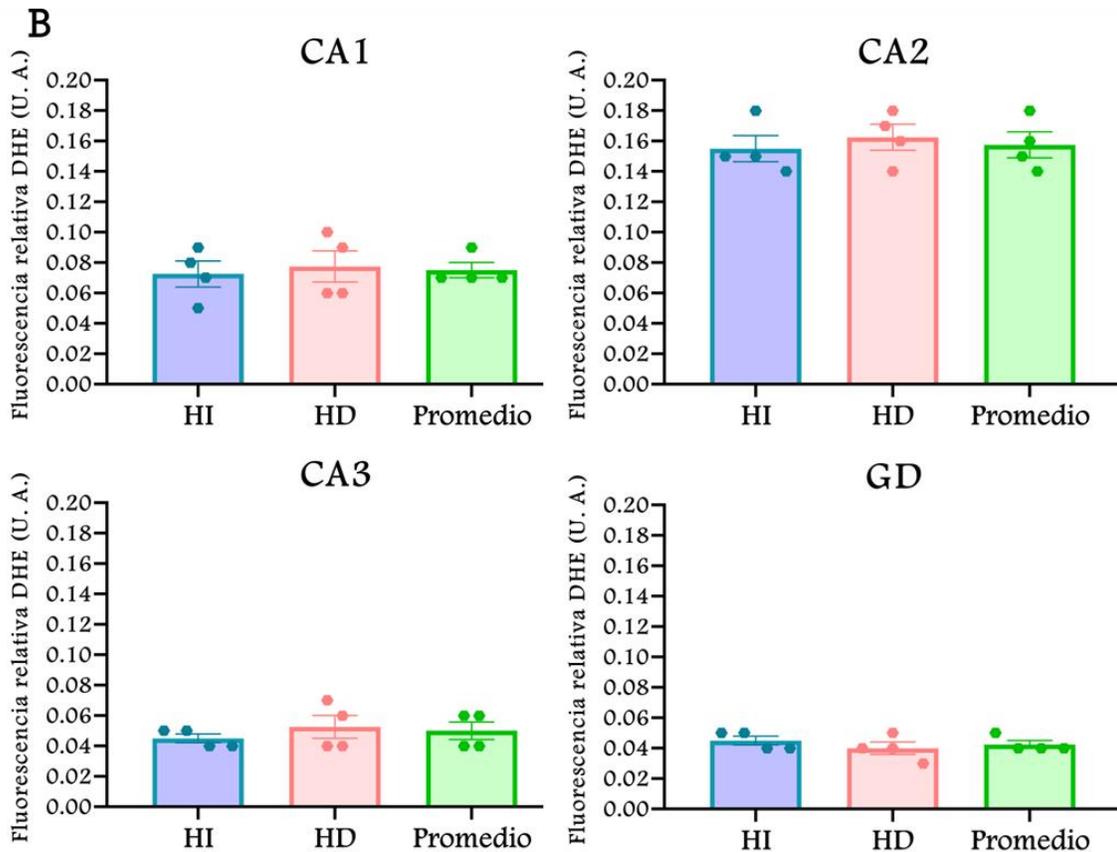
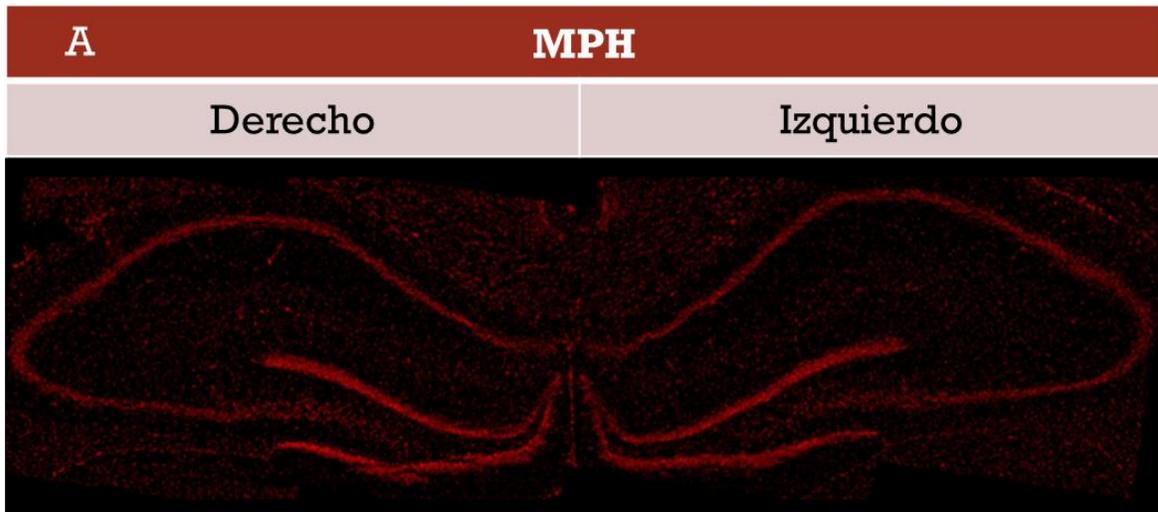
Al realizar el análisis de intensidad de fluorescencia (incremento en la oxidación de la DHE) debido al tratamiento crónico con MPH (10 mg/kg) durante 28 días intraperitonealmente, en las regiones CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo, se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia en la capa de células piramidales de todas las regiones del hipocampo (**Figura 26 A**) comparado con el Grupo CN. El promedio del incremento en la intensidad de fluorescencia se muestra en la **Figura 26 B**, en cada uno de los hemisferios y también se representa el promedio de la intensidad de fluorescencia entre ambos hemisferios (color verde).

Después, realizamos el análisis de intensidad de fluorescencia (incremento en la oxidación de la DHE) debido al tratamiento crónico con ATX (3 mg/kg) durante 28 días intraperitonealmente, en las regiones CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo, se observó un incremento en la intensidad de fluorescencia en la capa de células piramidales principalmente en las regiones CA1 y CA2 del hipocampo (**Figura 27 A**) comparado con el Grupo CN. El promedio del incremento en la intensidad de fluorescencia se muestra en la (**Figura 27 B**), en cada uno de los hemisferios y también se representa el promedio de la intensidad de fluorescencia entre ambos hemisferios en color morado.

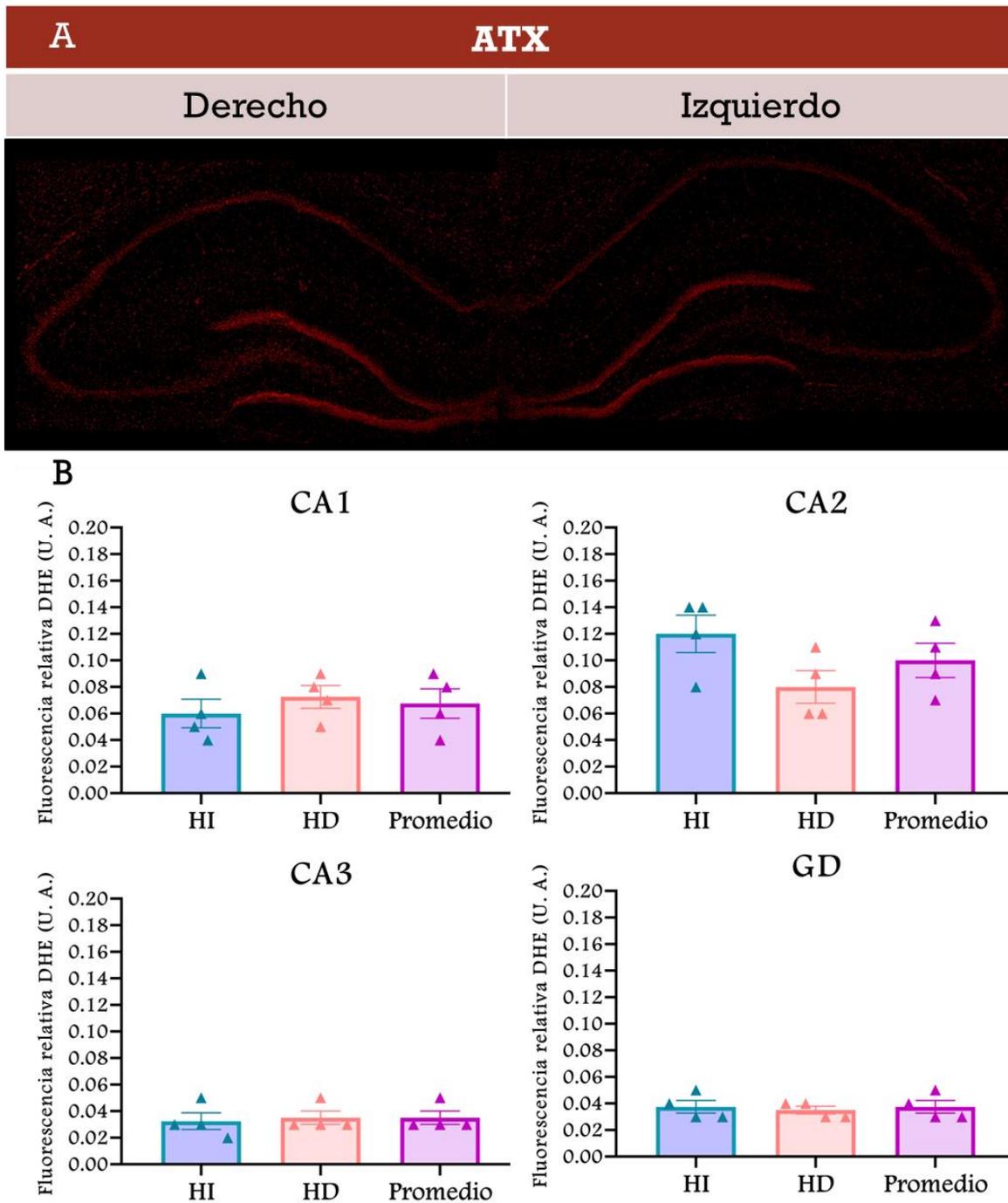
En la **Figura 28** se pueden observar y comparar las microfotografías de la intensidad de fluorescencia en la capa de células piramidales en las distintas regiones el hipocampo, en donde se observa el incremento en la intensidad de fluorescencia debido al tratamiento crónico, tanto con MPH, así como con ATX en comparación con el grupo CN.



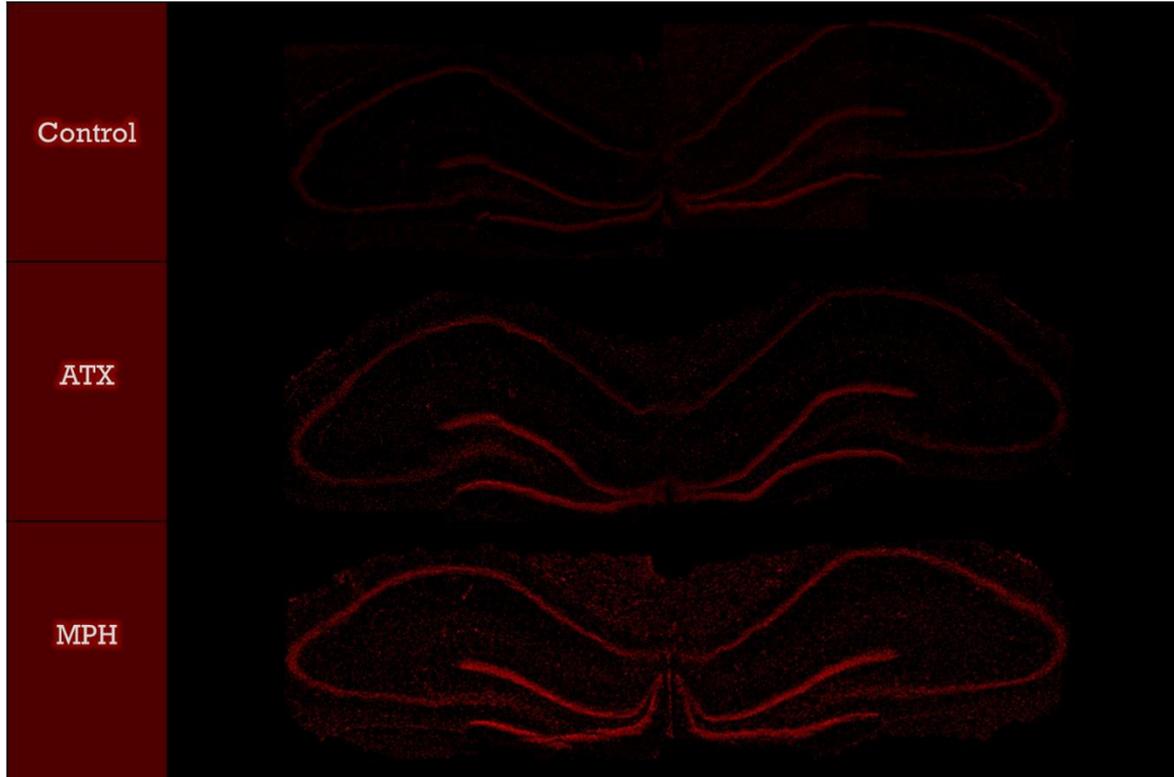
**Figura 25. Evaluación de la oxidación de la DHE en las regiones CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo del grupo CN. A) Reconstrucción generada a partir de cuatro microfotografías tomadas con un microscopio confocal a un aumento de 5x, de la región hipocampal completa. Se evaluó la intensidad de la fluorescencia promedio en 4 micrografías por rata para la región. (B) Promedio de la intensidad de la fluorescencia hemisferio izquierdo (HI) en azul, derecho (HD) en rosa y el promedio de ambas cuantificaciones en amarillo (n=4).**



**Figura 26. Evaluación de la oxidación de la DHE en las regiones CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo del grupo tratado crónicamente con MPH. A) Reconstrucción generada a partir de cuatro microfotografías tomadas con un microscopio confocal a un aumento de 5x, de la región hipocampal completa. Se observó un incremento en la intensidad de fluorescencia en todas las regiones del hipocampo debido al tratamiento con MPH, comparado con el grupo CN. (B) Promedio de la intensidad de la fluorescencia. Hemisferio izquierdo en azul (HI), derecho en rosa (HD) y el promedio de ambas cuantificaciones en verde (n=4).**

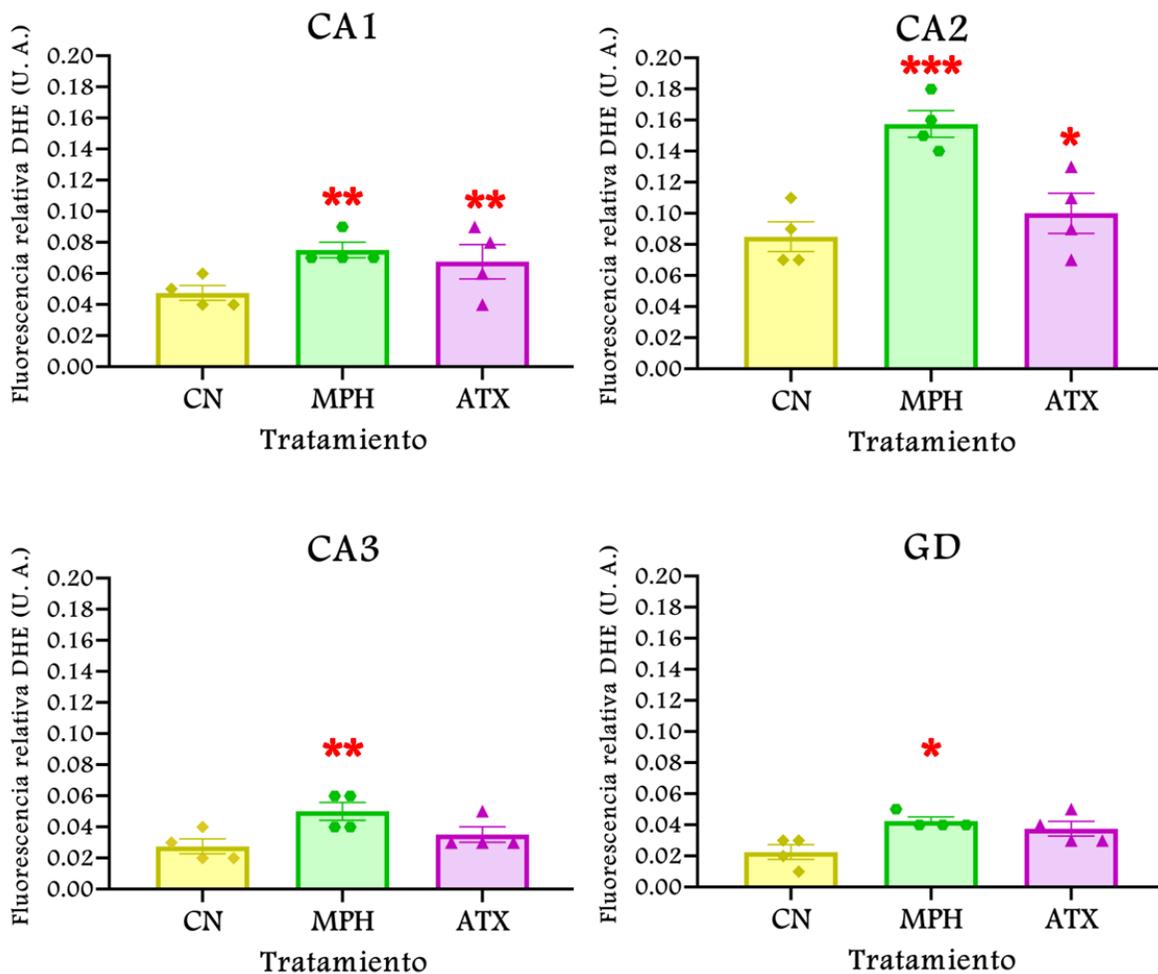


**Figura 27. Evaluación de la oxidación de la DHE en las regiones CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo del grupo tratado crónicamente con ATX. A) Reconstrucción generada a partir de cuatro microfotografías tomadas con un microscopio confocal a un aumento de 5x, de la región hipocámpica completa. Se observó un incremento en la intensidad de fluorescencia en las regiones CA1 y CA2 del hipocampo debido al tratamiento con ATX, comparado con el grupo CN. (B) Promedio de la intensidad de la fluorescencia, hemisferio izquierdo en azul (HI), derecho en rosa (HD) y el promedio de ambas cuantificaciones en morado (n=4).**



**Figura 28.** Niveles de superóxido después del tratamiento crónico con MPH o ATX. Reconstrucción generada a partir de cuatro microfotografías tomadas con un microscopio confocal a un aumento de 5x, en la región del hipocampo. El tratamiento crónico con MPH indujo el incremento en la intensidad de fluorescencia por la oxidación de DHE en la capa de células piramidales de todas las regiones del hipocampo con respecto al grupo CN. El tratamiento crónico con ATX indujo el incremento en la intensidad de fluorescencia por la oxidación de DHE en la capa de células piramidales en las regiones CA1 y CA2 del hipocampo con respecto al grupo CN.

Al realizar el análisis estadístico del incremento en la oxidación de la DHE (intensidad de la fluorescencia) en los tres grupos y en las 4 regiones hipocámpales, como se muestra en la **Figura 29**, se puede observar que el tratamiento crónico con MPH incremento significativamente la intensidad de fluorescencia en la capa de células piramidales en todas las regiones del hipocampo comparado con el grupo CN y el tratamiento crónico con ATX incremento significativamente la intensidad de fluorescencia en la capa de células piramidales principalmente en las regiones CA1 y CA2 del hipocampo con respecto al grupo CN. Cada punto en las gráficas representa el promedio de la intensidad de la fluorescencia cuantificada en 8 microfotografías por región para cada grupo de ratas. Finalmente, ambos tratamientos crónicos tuvieron efectos nocivos causando un incremento en oxidación de la DHE en el hipocampo de la rata, lo cual es un indicativo de incremento en los niveles de estrés oxidativo como se resume en la **Figura 30**.



**Figura 29.** Cuantificación de la oxidación de la DHE en los tres grupos y en las cuatro regiones hipocámpales y análisis estadístico. Donde se puede observar que el tratamiento crónico con MPH incrementó significativamente la intensidad de la fluorescencia por la oxidación de la DHE en todas las regiones del hipocampo como comparado al grupo CN y el tratamiento crónico con ATX incrementó significativamente la intensidad de fluorescencia por la oxidación de DHE en las regiones CA1 y CA2 del hipocampo como comparado al grupo CN. Cada barra corresponde al promedio del nivel de la intensidad de la fluorescencia de la región por rata en un total de 8 micrografías tomadas a un aumento de 5x. Los valores indican la media  $\pm$  DE, prueba ANOVA de una vía con prueba post hoc de Bonferroni, intervalo de confianza 95%, P de 0,05, un asterisco (\*), P entre 0,01 y 0,05, dos asteriscos (\*\*) P entre 0,01 y 0,001, tres asteriscos (\*\*\*). n=4 por grupo.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS							
	Metilfenidato (MPH)				Atomoxetina (ATX)		
Densidad neuronal con VC	CA1 =	CA2 =	CA3 ↓	CA1 ↓	CA2 =	CA3 ↓	
Células positivas a GFAP	CA1 ↑	CA2 =	CA3 ↑	CA1 ↑	CA2 ↑	CA3 ↑	
Nivel de superóxido con DHE	CA1 ↑	CA2 ↑	CA3 ↑	GD ↑	CA1 ↑	CA2 ↑	CA3 = GD =

*Figura 30. Resumen de los resultados obtenidos. Se presenta el resumen para cada procedimiento experimental realizado después de los tratamientos crónicos con MPH y ATX en la rata, en las subregiones hipocampales donde fueron evaluados. Las flechas rojas indican un incremento ↑ o disminución ↓ en comparación al grupo control y en las regiones donde no se encontraron cambios significativos se indican con un signo =.*

## VII. DISCUSIÓN

El hipocampo está directamente relacionado con la sintomatología en pacientes con TDAH, que incluye un aumento de la inatención e impulsividad debidas a la disfunción de redes neuronales moduladas por esta región cerebral. Pacientes con el trastorno presentan atrofia generalizada en la región del hipocampo, pero con mayor impacto en las subregiones, CA1, CA2, CA3 y CA4 (Hoogman et al., 2017; Al-Amin et al., 2018). Esta región del sistema límbico asociada a la memoria es modulada por el sistema dopaminérgico durante la transmisión sináptica, mediante la entrada de fibras dopaminérgicas con origen en el área tegmental ventral (VTA), núcleo accumbens NAc, locus coeruleus LC o sustancia nigra pars compacta SNpc (Duszkiewicz, A. J. et al., 2019; Palacios-Filardo & Mellor, 2019; Edelman & Lessmann, 2018).

Aun cuando se tiene evidencia de que los tratamientos con MPH y ATX son eficaces en la regulación de mecanismos cerebrales relacionados con la vía catecolaminérgica, para la disminución de los síntomas del TDAH (Wu, C. S. et al., 2021; Wolraich, M. L. et al., 2019). El mecanismo de acción de estos medicamentos que incrementan los niveles de DA y NA en el espacio sináptico (Kowalczyk, O. S. et al., 2019; Wu, C. S. et al., 2021) podría tener efectos adversos en la actividad fisiológica del cerebro de los pacientes. El mecanismo de acción de la ATX y el MPH produce acumulación de catecolaminas resultante de inhibir los transportadores de NA y DA a nivel presináptico, lo que podría propiciar la autooxidación de éstas, generando especies como DA o-quinonas, aminocromo y 5,6-indolequinona, además de subproductos como el anión superóxido y radical de oxígeno (Goldstein & Kopin, 2017; Cai, Y. et al., 2021; Herrera, A. et al., 2017).

Además, la fisiopatología del TDAH sigue siendo aun desconocida, pero cada vez hay más evidencia que sugiere que el TDAH es atribuible a la neurotransmisión dopaminérgica disfuncional (Corona, J. C. 2018; Del Campo, N. et al., 2011; Prince, J. B. 2008) y también, el estrés oxidativo y la neuroinflamación podrían estar participando en la fisiopatología (Lopresti, A. L. 2015; Joseph, N. et al., 2013; Corona, J. C. 2020) y posiblemente el tratamiento con MPH y ATX podrían estar agravando dichos factores.

Por lo tanto, nosotros quisimos evaluar el efecto del tratamiento crónico con los fármacos utilizados comúnmente para el tratamiento del TDAH y el impacto que tienen, sobre el daño celular, sobre el estrés oxidativo y sobre la neuroinflamación en el hipocampo de la rata joven, ya que no hay muchos estudios que describan tal efecto. Considerando la edad de inicio del tratamiento en pacientes con el trastorno y como en el ámbito clínico es necesario un uso prolongado del medicamento; en el presente trabajo se planteó evaluar el posible daño celular ocasionado durante la etapa prepuberal en la rata.

Primero evaluamos si el tratamiento crónico con MPH y ATX desencadenaba un proceso de daño neuronal en las regiones Cornu Ammonis del hipocampo. Mediante la tinción con VC se encontró que el tratamiento crónico con MPH (10 mg/kg) en la rata durante 28 días, produjo una pérdida de neuronas piramidales, la cual fue estadísticamente significativa en la región CA3 del hipocampo de la rata en comparación con el grupo CN (**Figura 18**), estos datos nos estarían indicando que el tratamiento crónico con MPH está generando ROS a partir de la

autooxidación de catecolaminas en el espacio sináptico incrementando el estrés oxidativo (Goldstein & Kopin, 2017; Herrera et al., 2017), ya que cuando nosotros medimos la oxidación de la DHE después del tratamiento crónico con MPH, se observó un incremento estadísticamente significativo en la intensidad de la fluorescencia en la capa de células piramidales de todas las regiones del hipocampo comparado al grupo CN (**Figura 29**).

Previamente, se ha demostrado que el tratamiento crónico con MPH a dosis de 1, 2 y 10 mg/kg en la rata joven (DPN 25) induce la formación de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS, la cual mide los productos de peroxidación de lípidos (estrés oxidativo) en células y tejidos) y la oxidación o carbonilación de proteínas, lo cual fue atribuido al estrés oxidativo producido en regiones como el hipocampo, la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el cerebelo de la rata Wistar; en el mismo modelo se reportó el aumento en la actividad de SOD dentro del hipocampo y la corteza cerebral y disminución en el cuerpo estriado (Martins, M. A. F. et al., 2006; Gomes, K. M. et al., 2007). También, se han demostrado alteraciones en la actividad de enzimas antioxidantes debido al tratamiento crónico con dosis de 2, 5, 10 y 20 mg/kg de MPH en rata Wistar adulta, la actividad de enzimas como la SOD, GSH, GPx y GSH se han visto disminuidas en regiones como la corteza cerebral y el hipocampo, en este último se encontró disminución de la cantidad de neuronas cuantificadas en las regiones CA1 y GD para las dosis más altas (Motaghinejad, M. et al, 2016). Mientras que en rata SHR adulta (DPN60) el tratamiento crónico con MPH (2 mg/kg) mostró un incremento de TBARS en cerebelo, corteza prefrontal, hipocampo, y cuerpo estriado, así como una reducción en la actividad de SOD y CAT (Comim, C. M. et al, 2014). Así mismo, se ha demostrado que la administración crónica de MPH (1, 2 o 10 mg/kg, por vía intraperitoneal) a ratas adultas de 60 días, altera el metabolismo energético, ya que puede inhibir la función mitocondrial al disminuir la actividad del complejo I, II, III y IV en el hipocampo, la corteza prefrontal, y el cuerpo estriado, lo cual incrementa aún más las ROS y disminuye la producción de ATP (Fagundes, A. I. et al., 2010); el mismo tratamiento con MPH en ratas Wistar jóvenes (DPN25) y adultas (DPN60) mostró daño en el DNA, en el cuerpo estriado y el hipocampo (Andreazza, A. C. et al., 2007).

En la evaluación de superóxido se incluyó a la región del GD (**Figura 29**), esta región hipocampal se ha relacionado con la presencia de células progenitoras neurales y gliales, aunque la mayoría de las células generadas en GD se diferencian a neuronas que posteriormente migran (Cameron, H. A. et al., 1993; Kohman & Rhodes, 2013). Previamente, se evaluó el efecto del MPH y la ATX sobre la proliferación celular y la diferenciación neuronal en el GD del ratón y el tratamiento crónico con MPH, pero no la ATX, mejoró la proliferación celular y la diferenciación de neuroblastos a través del aumento en los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Lee, T. H. et al., 2012). Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo de estrés oxidativo en el GD de la rata debido al tratamiento con MPH, así como tendencia a incrementar debido al tratamiento con ATX. Por lo que, se ha propuesto que el aumento persistente del estrés oxidativo conduce a la reducción en la producción de neuronas en el hipocampo, no solo por falla en la proliferación de células progenitoras y la diferenciación neuronal reducida, también por la falta de supervivencia de estas (Huang, T. et al., 2015). Todo lo anterior estaría indicando que el daño neuronal

hipocampal observado debido al tratamiento crónico con MPH en la rata parece estar asociado a un incremento del estrés oxidativo debido al daño de diferentes componentes celulares.

Por otra parte, el tratamiento crónico con ATX (3 mg/kg) en la rata durante 28 días, también produjo una pérdida de neuronas en la capa de células piramidales, la cual fue estadísticamente significativa en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo de la rata tratada con respecto al grupo CN (**Figura 18**) de igual manera estos resultados nos estarían indicando que el tratamiento crónico con ATX generó ROS a partir de la oxidación de catecolaminas en el espacio sináptico incrementando el estrés oxidativo (Swanson, C. M. et al., 2006; Hussain, L. S. et al., 2022; Goldstein & Kopin, 2017). Lo cual se confirmó al medir la oxidación de la DHE después del tratamiento crónico con ATX donde se observó un incremento estadísticamente significativo en la intensidad de fluorescencia por la oxidación de DHE en las regiones CA1 y CA2 del hipocampo comparado al grupo CN (**Figura 29**). Actualmente hay muy pocos datos de los efectos neurotóxicos debido al tratamiento con ATX; así, previamente un estudio in vitro del equipo del laboratorio demostró que el tratamiento con concentraciones altas de ATX en células SH-SY5Y diferenciadas a un fenotipo parecido a neuronas incrementa la tasa de ROS citosólicas y mitocondriales, lo que produjo daño celular y alteraciones en la función mitocondrial (Corona, J. C. et al., 2019, Carreón-Trujillo, S. et al., 2022).

Un estudio in vivo, evaluó la generación de ROS debido al tratamiento crónico con ATX (0.5, 1 y 2 mg/ml) en cerebro de rata Wistar, encontrando diferencia significativa en la cantidad de astrocitos y oligodendrocitos presentes en putamen - caudado, así como inducción de la producción de NF- $\kappa$ B un factor de transcripción que se activa en respuesta al estrés oxidativo, por lo que asocia el uso de ATX al aumento en la producción de ROS (Gür, F. et al., 2021). Mientras que en rata Sprague–Dawley el tratamiento oral de 0,05 g/kg de atomoxetina, administrado de forma crónica durante 21 días, mostró aumento en la expresión de las subunidades del receptor GABA A, en Uqcrc2 (proteína del complejo ubiquinol-citocromo c reductasa 2) y SNAP-25 (proteína asociada a sinaptosomas de 25 kDa), un gen candidato en la fisiopatología del TDAH, implicado en el crecimiento axonal, la plasticidad sináptica y la regulación de la liberación de neurotransmisores (Lempp, T. et al., 2013). Nuevamente nuestros resultados nos estarían indicando que el daño de las células piramidales en las distintas regiones del hipocampo debido al tratamiento crónico con ATX en la rata parece estar asociado con un incremento en el estrés oxidativo.

Se ha demostrado que las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo son más susceptibles o vulnerables a la degeneración por daño oxidativo que las regiones CA2 y CA3 (Sarnowska, A. 2002). Así, la región CA1 del hipocampo hubo un mayor efecto tras el tratamiento crónico con ATX, Sin embargo, el tratamiento crónico con MPH no disminuyó significativamente la cantidad de células presentes en la región CA1, por lo que se puede atribuir un mayor daño celular al uso crónico de ATX. Además, se ha demostrado que hay una mayor susceptibilidad a la pérdida neuronal en las regiones CA1 y CA3 debido a la exposición crónica al frío como modelo de estrés crónico (Xu, B. et al. 2019), lo que corrobora los datos obtenidos debido al tratamiento crónico con ambos fármacos, disminuyendo la cantidad de

neuronas presentes en la región CA3 de forma sustancial (**Figura 18**). Estos resultados se correlacionan con lo observado previamente por Schmitz y colaboradores en donde se demostró un decremento en la cantidad de neuronas de la región hipocampal debido al tratamiento crónico de 30 días con MPH (2 mg/kg) en ratas jóvenes (DPN15) aunque no incluyeron una diferenciación de las subregiones de este (Schmitz, F. et al., 2016). Previamente, Fotopoulos y su equipo de trabajo evaluaron por resonancia magnética estructural, como la exposición acumulada medicamentos utilizados en el tratamiento del TDAH (según el historial farmacológico de pacientes con el trastorno) se relacionan con volúmenes más pequeños en la región CA1 del hipocampo, sin un análisis por tipo de medicamento ya que se consideró en un solo grupo psicoestimulantes y no psicoestimulantes. (Fotopoulos, N. H. et al., 2021).

Es relevante comentar que la inervación de las fibras noradrenérgicas al hipocampo provienen principalmente de la SNpc, VTA y LC (Hussain, L. S. et al., 2022; Rho, H. J. et al., 2018; Chen, A. P. et al., 2021); además, se evaluó esta inervación en el desarrollo del cerebro de rata y se encontró que en el DPN4 la principal cantidad de fibras inmunorreactivas a la tirosina hidroxilasa (TH) y a la dopamina-beta-hidroxilasa (DBH), se encuentran en la región CA1, pero en el DPN55 la región CA3 es la que contiene una mayor cantidad de TH y DBH, por lo que se sugiere que la función noradrenérgica en el hipocampo puede cambiar a medida que la rata madura (Moudy, A. M. et al., 1993, Edelman & Lessmann, 2018). Debido a esto la actividad del MPH y ATX podría afectar de forma predominante la región CA1 al inicio del tratamiento DPN23 y posteriormente la región CA3 ya que el tratamiento finalizó en el DPN51, y así la inervación noradrenérgica se encontraría en mayor cantidad en esta región.

Por otro lado, en la región CA2 el tratamiento con ambos fármacos no mostró un decremento significativo de neuronas con respecto al grupo CN (**Figura 18**). La cantidad de fibras noradrenérgicas en esta región es baja en comparación con las otras (Moudy, A. M. et al., 1993), por lo que el efecto farmacológico del MPH y ATX no afectaría gravemente la región CA2. Además, se ha demostrado en modelos de isquemia y epilepsia una mayor conservación de las células piramidales de CA2 en comparación con CA1 y CA3, debido posiblemente a una menor exposición estructural a daño excitotóxico y por su capacidad de disipar estímulos sin presencia de inhibidores, ya que presentan una mayor expresión de las proteínas parvalbúmina y calbindina-128D (proteínas de unión a  $Ca^{2+}$ ) que le confieren protección (Williamson & Spencer, 1994; Tzakis & Holahan, 2019), siguiendo con el anterior razonamiento lo encontrado para la región CA2 demuestra una mayor resistencia al daño con respecto a las regiones CA1 y CA3.

Por otra parte, en este trabajo nosotros investigamos los efectos del tratamiento crónico con MPH y ATX sobre la neuroinflamación en el hipocampo de la rata, debido a que la neuroinflamación es un proceso íntimamente relacionado con el estrés oxidativo y la neurodegeneración (Vázquez-González et al., 2023). Durante la respuesta inflamatoria del SNC, se observa una presencia importante de astrocitos tipo A1 reactivos, cuya actividad incluye la formación de cicatrices, proporción de nutrientes a los axones en regeneración y

regulación positiva de genes responsables de la formación de sinapsis. Los astrocitos A1 están presentes en distintas enfermedades neurodegenerativas por lo que se ha propuesto que la neuroinflamación pudiera estar impulsando la neurodegeneración (Liddelow, S.A. et al., 2017).

Para evaluar la neuroinflamación producida por ATX y MPH se realizó una IHC contra GFAP, con lo cual se pudo observar el cambio en la cantidad de astrocitos reactivos presentes en las regiones CA1, CA2 y CA3, así como zonas circundantes a las mismas (**Figuras 20-24**). Ante lo observado con la tinción con VC se esperaba un aumento en la cantidad de células GFAP positivas principalmente en las regiones CA1 y CA3 con respecto al grupo CN, este efecto fue confirmado para ambos tratamientos crónicos donde se encontró un número significativamente mayor de astrocitos reactivos (**Figura 24**), siendo más evidente el efecto producido por el tratamiento con ATX. Mientras que el con el tratamiento con MPH en la región CA2 (**Figura 24**) se observó una tendencia a incrementar sin ser estadísticamente significativo, pero sí para el tratamiento con ATX, indicado que el tratamiento crónico con ATX indujo un mayor impacto sobre la cantidad de astrocitos reactivos en todo el hipocampo.

Se ha descrito el impacto de la astrogliosis excesiva sobre la excitotoxicidad por glutamato, la cual conduce a la neurodegeneración, lo que podría explicar la relación entre los resultados obtenidos con la tinción de VC en las áreas donde se encontró mayor cantidad de astrocitos GFAP positivos (Schousboe & Waagepetersen, 2005). Al iniciar un proceso de neuroinflamación debido al tratamiento crónico con ATX y MPH, aumentaron la cantidad de astrocitos reactivos en las regiones descritas por lo que tal vez el metabolismo de glutamato no se llevó a cabo correctamente. Además, previamente se demostró que el tratamiento crónico de 30 días con MPH (2 mg/Kg) disminuyó la absorción de glutamato en el hipocampo de ratas jóvenes provocando excitotoxicidad (Schmitz, F. et al., 2016). El metabolismo del glutamato depende en gran medida de los astrocitos por la cantidad de transportadores de glutamato que poseen (Schousboe & Waagepetersen, 2005). Previamente se mencionó la importancia del glutamato en la actividad fisiológica del hipocampo, así como el papel de GABA en los síntomas conductuales del TDAH, lo que sugiere que hay concentraciones extracelulares de GABA disminuidas en el hipocampo (Sterley, T. et al., 2013). Además de su papel regulador en la transmisión glutamatérgica los astrocitos y la microglía generan ROS durante el proceso de neuroinflamación, que si sobrepasan la capacidad de defensa antioxidante posteriormente pueden ocasionar estrés oxidativo, propiciando la neurodegeneración y convirtiéndose en un ciclo de inflamación, oxidación y pérdida neuronal (Vázquez-González et al., 2023; Sheng, W. S. et al., 2013; Chen, Y. et al., 2020).

Hay diversos estudios que reportan como el tratamiento con MPH induce neuroinflamación; Motaghinejad y su equipo de investigación evaluaron el efecto sobre la inflamación y el estrés oxidativo en rata Wistar adulta (DPN56) tras el tratamiento agudo con dosis de 2, 5, 10 y 20 mg/kg de MPH, encontrando un incremento en la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en el hipocampo y la corteza cerebral (Motaghinejad, M. et al 2017). En ratón Swiss Webster de 28 días, tratado con 1 o 10 mg/kg de MPH de forma crónica (durante 12 semanas) o aguda (una sola dosis), se encontró un aumento en la expresión de genes en el

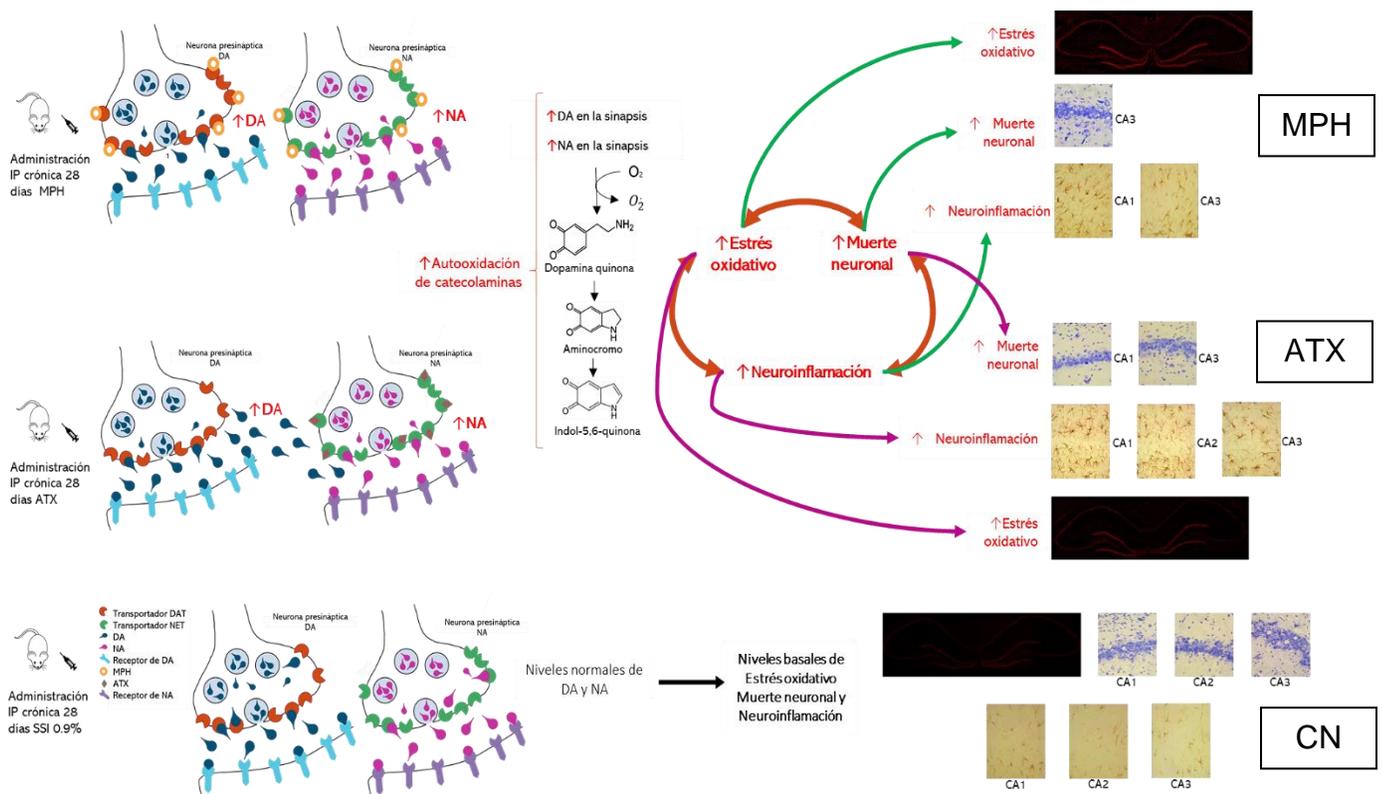
cuerpo estriado los cuales incluyen genes proinflamatorios como TNF $\alpha$  e IL-6, también se observó un incremento del número de células microgliales totales y activadas en SNpc así como una reducción del 20 % en las neuronas de dopamina en esta misma región (Sadasivan, S. et al., 2012). Mientras que en ratas Sprague Dawley jóvenes (DPN 14) administradas vía oral con soluciones de 4, 10, 30 y 60 mg/kg de MPH durante tres meses, se encontró una mayor unión a [ $^3$ H] PK 11195 (isoquinolina carboxamida con unión selectiva al receptor periférico de benzodiazepinas) que tiene sitios de unión principalmente en las células gliales, incluidas la microglía y los astrocitos, por lo que en dicho estudio fue indicador de aumento en la activación microglial en cortezas somatosensoriales primarias y secundarias, las cortezas motoras primarias y secundarias, la corteza insular, hipocampo, tálamo, globo pálido y SNpc (Carias, E. et al., 2018). También se ha demostrado que el tratamiento con MPH induce la activación de los astrocitos en co-cultivos de neuronas, sin embargo, esta activación fue reversible después de dos días de cultivo con medio normal (Narita, M. et al, 2009).

Los estudios del tratamiento con ATX sobre la neuroinflamación son limitados, así, se ha demostrado que la NA provoca que el fenotipo de la microglía cambie y libere citosinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , lo que sugiere que provoca neuroinflamación (Cao, S. et al, 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 $\beta$ , TNF $\alpha$  e iNOS así como los marcadores de activación microglial como CD11b y CD40 después del tratamiento sistémico con LPS en la corteza cerebral de la rata (O'Sullivan, J. B. et al., 2008). Además, en jerbos sometidos a isquemia cerebral, se realizaron un pre y postratamiento con ATX a concentraciones de 15 y 30 mg/kg, tres días antes o después de la isquemia, encontraron que el pretratamiento con 30 mg/kg de ATX mostro un efecto neuroprotector sobre las neuronas piramidales de la región CA1, además de atenuar la activación de astrocitos y microglía (Park, J. O. et al., 2015). Por tal motivo se necesita ampliar la investigación sobre los efectos crónicos del tratamiento con la ATX en el cerebro, con relación al proceso de inflamación.

Los niveles incrementados de superóxido (DHE) fueron en las áreas donde se presentó una mayor inflamación y pérdida neuronal. Los procesos de inflamación, oxidación y neurodegeneración se dan de manera consecutiva, en este caso el tratamiento crónico con MPH y ATX son un factor desencadenante del proceso, ya que pueden generar un exceso de catecolaminas (DA y NA) lo cual, posiblemente genere la autooxidación y el subsecuente daño oxidativo producido por las ROS, el estrés oxidativo a su vez puede tener efectos en el proceso inflamatorio y finalmente producirse daño neuronal. Sin embargo, su participación no es necesariamente igual, ya que mientras el tratamiento con ATX muestra un proceso avanzado de inflamación y neurodegeneración en el DPN52, el nivel de oxidación para la región CA3 no es significativamente mayor que en el grupo CN. Pero el tratamiento con MPH presenta niveles elevados de estrés oxidativo, sin mostrar una neurodegeneración significativa para la región CA1.

Es importante considerar que en el presente estudio se utilizó la rata Wistar que no presenta alteraciones en la vía catecolaminérgica, ni un fenotipo similar al TDAH, sin embargo, previamente se ha reportado que en pacientes con el trastorno existe una respuesta al estrés oxidativo insuficiente así como un estado inflamatorio incrementado (Lopresti, A. L. 2015; Joseph, N. et al., 2013), por lo que el incremento en los niveles de estrés oxidativo en cerebro sano ocasionado por los fármacos aunado a un estado deficiente de respuesta contribuiría al daño celular y la neuroinflamación.

Finalmente, hacen falta estudios exhaustivos con distintas dosis tanto de MPH como de ATX, sobre el proceso de muerte neuronal, sobre estrés oxidativo y sobre la neuroinflamación en el hipocampo y en otras regiones cerebrales implicadas en el TDAH, así como una distinción entre machos y hembras. Dichos estudios nos podrán ayudar a comprobar los efectos de diferentes dosis de dichos fármacos y poder confirmar nuestros hallazgos, para así explorar más a fondo los distintos mecanismos subyacentes.



**Figura 31. Principales hallazgos del presente estudio. En el esquema se puede observar que el tratamiento crónico con MPH incremento significativamente la intensidad de la fluorescencia debido a la oxidación de la DHE en todas las regiones del hipocampo, así como la muerte neuronal en la región CA3 y la neuroinflamación en las regiones CA1 y CA3. Mientras que el tratamiento crónico con ATX incremento significativamente la intensidad de fluorescencia debido a la oxidación de la DHE en las regiones CA1 y CA2 del hipocampo, muerte neuronal en las regiones CA1 y CA3 y la neuroinflamación en las tres regiones evaluadas del hipocampo. También se muestra la representación de los niveles basales de la oxidación de la DHE y la densidad neuronal e inflamación en el grupo control.**

## **VIII. CONCLUSIONES**

En conclusión, los hallazgos presentados demuestran que el tratamiento crónico con MPH y ATX en la rata producen daño disminuyendo de forma significativa la densidad neuronal en subregiones del hipocampo, y la acumulación de superóxido, así como un incremento en el número de astrocitos reactivos (neuroinflamación) en el hipocampo. En resumen, el tratamiento crónico con los medicamentos utilizados actualmente para el TDAH (MPH y ATX), ocasionaron efectos nocivos en el cerebro de la rata, más allá de la inhibición de los transportadores de dopamina y norepinefrina respectivamente.

## **IX. PERSPECTIVAS**

Se requieren realizar más experimentos sobre el tratamiento crónico con MPH y ATX con relación al daño producido sobre el hipocampo, como se observó en la densidad neuronal, la neuroinflamación y la acumulación de especies reactivas. Así mismo, hacen falta más estudios para evaluar el efecto de los medicamentos en diferentes dosis y sobre otras regiones de importancia en la fisiopatología del TDAH.

## X. REFERENCIAS

- Al-Amin, M., Zinchenko, A., & Geyer, T. (2018). Hippocampal subfield volume changes in subtypes of attention deficit hyperactivity disorder. *Brain Research*, 1685, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.02.007>
- Altunkaynak, B. Z., Önger, M. E., Türkmen, A. P., Yurt, K. K., Altun, G., Yuce, M., & Kaplan, S. (2016). Effects of Methylphenidate and Atomoxetine on Development of the Brain. Springer eBooks, 825-845. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2803-5\\_48](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2803-5_48)
- Álvarez-Arellano, L., González-García, N., Salazar-García, M., & Corona, J. C. (2020). Antioxidants as a Potential Target against Inflammation and Oxidative Stress in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Antioxidants*, 9(2), 176. <https://doi.org/10.3390/antiox9020176>
- American Psychiatric Association. (2013). *Guía de Consulta de Los Criterios Diagnósticos del Dsm-5(r): Spanish Edition of the Desk Reference to the Diagnostic Criteria from Dsm-5(r)*. American Psychiatric Publishing.
- Andreazza, A. C., Frey, B. N., Valvassori, S. S., Zanotto, C., Gomes, K. M., Comim, C. M., Cassini, C., Stertz, L., Ribeiro, L., Quevedo, J., Kapczinski, F., Berk, M., & Gonçalves, C. A. (2007). DNA damage in rats after treatment with methylphenidate. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 31(6), 1282-1288. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.05.012>
- Anttila, V., Bulik-Sullivan, B., Finucane, H. K., Walters, R. K., Bras, J., Duncan, L., Escott-Price, V., Falcone, G. J., Gormley, P., Malik, R., Patsopoulos, N. A., Ripke, S., Wei, Z., Yu, D., Lee, P. H., Turley, P., Grenier-Boley, B., Chouraki, V., Kamatani, Y., . . . Neale, B. M. (2018). Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. *Science*, 360(6395). <https://doi.org/10.1126/science.aap8757>
- Ball, G., Malpas, C. B., Genc, S., Efron, D., Sciberras, E., Anderson, V., Nicholson, J. M. & Silk, T. J. (2019). Multimodal Structural Neuroimaging Markers of Brain Development and ADHD Symptoms. *American Journal of Psychiatry*, 176(1), 57-66. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2018.18010034>
- Barrios, O., Matute, E., Ramírez-Dueñas, M. D. L., Chamorro, Y., Trejo, S., & Bolaños, L. (2016). Características del trastorno por déficit de atención e hiperactividad en escolares mexicanos de acuerdo con la percepción de los padres. *Suma Psicológica*, 23(2), 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.sumpsi.2016.05.001>
- Bayassi-Jakowicka, M., Lietzau, G., Czuba, E., Steliga, A., Waśkow, M., & Kowiański, P. (2021). Neuroplasticity and Multilevel System of Connections Determine the Integrative Role of Nucleus Accumbens in the Brain Reward System. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9806. <https://doi.org/10.3390/ijms22189806>
- Bélanger, S. A., Andrews, D., Gray, C. & Korczak, D. (2018). ADHD in children and youth: Part 1—Etiology, diagnosis, and comorbidity. *Paediatrics & Child Health*, 23(7), 447-453. <https://doi.org/10.1093/pch/pxy109>
- Biederman, J., & Faraone, S. V. (2005). Attention-deficit hyperactivity disorder. *The Lancet*, 366(9481), 237-248. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)66915-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)66915-2)
- Bölte, S., Lawson, W. B., Marschik, P. B. & Girdler, S. (2021). Reconciling the seemingly irreconcilable: The WHO's ICF system integrates biological and psychosocial environmental determinants of autism and ADHD. *BioEssays*, 43(9), 2000254. <https://doi.org/10.1002/bies.202000254>
- Bouyeure, A., & Noulhiane, M. (2021). Episodic memory development in normal and adverse environments. *Factors Affecting Neurodevelopment*, 517-527. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817986-4.00044-4>
- Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y., & Ellisman, M. H. (2002). Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains. *The Journal of Neuroscience*, 22(1), 183-192. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-01-00183.2002>
- Cai, Y., Xing, L., Yang, T., Chai, R., Wang, J., Bao, J., Shen, W., Ding, S., & Chen, G. (2021). The neurodevelopmental role of dopaminergic signaling in neurological disorders. *Neuroscience Letters*, 741, 135540. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135540>
- Callahan, P. M., Plagenhoef, M. R., Blake, D. T., & Terry, A. V. (2019). Atomoxetine improves memory and other components of executive function in young-adult rats and aged rhesus monkeys. *Neuropharmacology*, 155, 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.05.016>
- Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S., & Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, 56(2), 337-344. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90335-d](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90335-d)
- Campa, V. M. (2017). Analisis de imagenes de microscopia con ImageJ. Createspace Independent Publishing Platform. ISBN-13: 978-1542671309
- Carias, E., Hamilton, J. A., Robison, L. S., Delis, F., Eiden, R. D., Quattrin, T., Hadjiargyrou, M., Komatsu, D. E., & Thanos, P. K. (2018). Chronic oral methylphenidate treatment increases microglial activation in rats. *Journal of Neural Transmission*, 125(12), 1867-1875. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1931-z>

- Carlsson, T., Molander, F., Taylor, M. J., Jonsson, U. & Bölte, S. (2020). Early environmental risk factors for neurodevelopmental disorders – a systematic review of twin and sibling studies. *Development and Psychopathology*, 33(4), 1448-1495. <https://doi.org/10.1017/s0954579420000620>
- Carreón-Trujillo, S., Vázquez-González, D., & Corona, J. C. (2022). Atomoxetine Decreases Mitochondrial Biogenesis, Fission and Fusion In Human Neuron-like Cells But Does Not Alter Antioxidant Defences. *Cell Biochemistry and Biophysics*. <https://doi.org/10.1007/s12013-022-01116-x>
- Carucci, S., Balia, C., Gagliano, A., Lampis, A., Buitelaar, J. K., Danckaerts, M., Dittmann, R. W., Garas, P., Hollis, C., Inglis, S. K., Konrad, K., Kovshoff, H., Liddle, E. B., McCarthy, S., Nagy, P., Panei, P., Romaniello, R., Usala, T., Wong, I. C. K., . . . Zuddas, A. (2021). Long term methylphenidate exposure and growth in children and adolescents with ADHD. A systematic review and meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 120, 509-525. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.09.031>
- Case, A. J., Tian, J., & Zimmerman, M. C. (2017). Increased mitochondrial superoxide in the brain, but not periphery, sensitizes mice to angiotensin II-mediated hypertension. *Redox biology*, 11, 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.11.011>
- Ceylan, M. F., Sener, S., Bayraktar, A. C., & Kavutcu, M. (2012). Changes in oxidative stress and cellular immunity serum markers in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 66(3), 220-226. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2012.02330.x>
- Chang, J. P. C., Mondelli, V., Satyanarayanan, S. K., Chiang, Y. J., Chen, H. T., Su, K. P., & Pariante, C. M. (2020). Cortisol, inflammatory biomarkers and neurotrophins in children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in Taiwan. *Brain, Behavior, and Immunity*, 88, 105-113. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.017>
- Chasaide, C. N., & Lynch, M. A. (2020). The role of the immune system in driving neuroinflammation. *Brain and neuroscience advances*, 4, 239821281990108. <https://doi.org/10.1177/2398212819901082>
- Chen, A. P., Chen, L., Kim, T. A., & Xiong, Q. (2021). Integrating the Roles of Midbrain Dopamine Circuits in Behavior and Neuropsychiatric Disease. *Biomedicines*, 9(6), 647. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060647>
- Chen, S., He, L., Huang, A. J. Y., Boehringer, R., Robert, V., Wintzer, M. E., Polygalov, D., Weitemier, A. Z., Tao, Y., Gu, M., Middleton, S. J., Namiki, K., Hama, H., Therreau, L., Chevaleyre, V., Hioki, H., Miyawaki, A., Piskorowski, R. A., & McHugh, T. J. (2020). A hypothalamic novelty signal modulates hippocampal memory. *Nature*, 586(7828), 270-274. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2771-1>
- Chen, Y., Qin, C., Huang, J., Tang, X., Liu, C., Huang, K., Xu, J., Guo, G., Tong, A., & Zhou, L. (2020). The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell Proliferation*, 53(3). <https://doi.org/10.1111/cpr.12781>
- Cobley, J. N., Fiorello, M. L., & Bailey, D. M. (2018). 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biology*, 15, 490-503. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.008>
- Comim, C. M., Gomes, K. M., Réus, G. Z., Petronilho, F., Ferreira, G. K., Streck, E. L., Dal-Pizzol, F., & Quevedo, J. (2014). Methylphenidate treatment causes oxidative stress and alters energetic metabolism in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder. *Acta Neuropsychiatrica*, 26(2), 96-103. <https://doi.org/10.1017/neu.2013.35>
- Consejo Mexicano de Neurociencias A. C. (2020). EL SISTEMA RETICULAR Y EL SISTEMA LÍMBICO. Instituto Superior de Neurociencias. Recuperado 11 de febrero de 2023, de <https://www.institutosuperiordeneurociencias.org/unidad-8-neuroanatomia>
- Corona, J. C. (2018). Natural Compounds for the Management of Parkinson's Disease and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *BioMed Research International*, 2018, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2018/4067597>
- Corona, J. C. (2020). Role of Oxidative Stress and Neuroinflammation in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Antioxidants*, 9(11), 1039. <https://doi.org/10.3390/antiox9111039>
- Corona, J. C., Carreón-Trujillo, S., González-Pérez, R., Gómez-Bautista, D., Vázquez-González, D., & Salazar-García, M. (2019). Atomoxetine produces oxidative stress and alters mitochondrial function in human neuron-like cells. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49609-9>
- Cruz-Sánchez, F. F., Gironès, X., Ortega, A., Alameda, F., & Lafuente, J. (2010). Oxidative stress in Alzheimer's disease hippocampus: A topographical study. *Journal of the Neurological Sciences*, 299(1-2), 163-167. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2010.08.029>
- Darwish, A. H., Elgohary, T. M., & Nosair, N. A. (2018). Serum Interleukin-6 Level in Children With Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). *Journal of Child Neurology*, 34(2), 61-67. <https://doi.org/10.1177/0883073818809831>

- 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. *Biological Psychiatry*, 69(12), e145-e157. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.02.036>
- Demontis, D., Walters, G. B., Athanasiadis, G., Walters, R., Therrien, K., Nielsen, T. T., Farajzadeh, L., Voloudakis, G., Bendl, J., Zeng, B., Zhang, W., Grove, J., Als, T. D., Duan, J., Satterstrom, F. K., Bybjerg-Grauholm, J., Bækved-Hansen, M., Gudmundsson, O. O., Magnusson, S. H., . . . Børghlum, A. D. (2023). Genome-wide analyses of ADHD identify 27 risk loci, refine the genetic architecture and implicate several cognitive domains. *Nature Genetics*, 55(2), 198-208. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01285-8>
- Dunn, G. A., Nigg, J. T., & Sullivan, E. L. (2019). Neuroinflammation as a risk factor for attention deficit hyperactivity disorder. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 182, 22-34. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.05.005>
- Duszkiewicz, A. J., McNamara, C. G., Takeuchi, T., & Genzel, L. (2019). Novelty and Dopaminergic Modulation of Memory Persistence: A Tale of Two Systems. *Trends in Neurosciences*, 42(2), 102-114. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.10.002>
- Dutt, M., Dharavath, R. N., Kaur, T., Chopra, K., & Sharma, S. (2020). Differential effects of alprazolam against methylphenidate-induced neurobehavioral alterations. *Physiology & Behavior*, 222, 112935. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.112935>
- Edelmann, E., & Lessmann, V. (2018). Dopaminergic innervation and modulation of hippocampal networks. *Cell and Tissue Research*, 373(3), 711-727. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2800-7>
- El Adham, E. K., Hassan, A. I., & El Aziz El-Mahdy, A. A. (2011). Nutritional and metabolic disturbances in attention deficit hyperactivity disease. *Res J Med Med Sci*, 6(1), 10-6.
- Fagundes, A. I., Scaini, G., Santos, P., Sachet, M. U., Bernhardt, N. M., Rezin, G. T., Valvassori, S. S., Schuck, P. F., Quevedo, J., & Streck, E. L. (2010). Inhibition of Mitochondrial Respiratory Chain in the Brain of Adult Rats After Acute and Chronic Administration of Methylphenidate. *Neurochemical Research*, 35(3), 405-411. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-0069-7>
- Faraone, S. V. & Larsson, H. (2018). Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Molecular Psychiatry*, 24(4), 562-575. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0070-0>
- Faraone, S. V. (2018). The pharmacology of amphetamine and methylphenidate: Relevance to the neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder and other psychiatric comorbidities. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 87, 255-270. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.02.001>
- 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. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.20>
- Faraone, S. V., Banaschewski, T., Coghill, D., Zheng, Y., Biederman, J., Bellgrove, M. A., Newcorn, J. H., Gignac, M., Al Saud, N. M., Manor, I., Rohde, L. A., Yang, L., Cortese, S., Almagor, D., Stein, M. A., Albatti, T. H., Aljoudi, H. F., Alqahani, M. M., Asherson, P., . . . Wang, Y. (2021). The World Federation of ADHD International Consensus Statement: 208 Evidence-based conclusions about the disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 128, 789-818. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.01.022>
- Fotopoulos, N. H., Devenyi, G. A., Guay, S., Sengupta, S. M., Chakravarty, M. M., Grizenko, N., Karama, S., & Joober, R. (2021b). Cumulative exposure to ADHD medication is inversely related to hippocampus subregional volume in children. *NeuroImage: Clinical*, 31, 102695. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2021.102695>
- Freund, T. F., & Buzsáki, G. (1998). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6(4), 347-470. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1063\(1996\)6:4](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1063(1996)6:4)
- 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. *Pharmacological Research*, 62(6), 523-529. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.07.009>
- Gnanavel, S., Sharma, P., Kaushal, P. & Hussain, S. (2019). Attention deficit hyperactivity disorder and comorbidity: A review of literature. *World Journal of Clinical Cases*, 7(17), 2420-2426. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v7.i17.2420>
- Goldstein, D. S., & Kopin, I. J. (2017). Linking Stress, Catecholamine Autotoxicity, and Allostatic Load with Neurodegenerative Diseases: A Focused Review in Memory of Richard Kvetnansky. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(1), 13-24. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0497-x>
- Gomes, K. M., Petronilho, F., Mantovani, M., De Almeida 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. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9544-1>
- Griffiths, K. R., Leikauf, J. E., Tsang, T. W., Clarke, S., Hermens, D. F., Efron, D., Williams, L. M., & Kohn, M. R. (2018). Response inhibition and emotional cognition improved by atomoxetine in children and adolescents

- with ADHD: The ACTION randomized controlled trial. *Journal of Psychiatric Research*, 102, 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.03.009>
- Guillamon-Vivancos, T., Barcia, J. A., & J, M. (2015). Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *Neurología*, 30(2), 119-129. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.12.007>
- Gür, F., Cengiz, M., & Gür, B. (2021). Alternations in nuclear factor kappa beta activity (NF- $\kappa$ 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*, 534, 927-932. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.072>
- Herrera, A., Muñoz, P., Steinbusch, H. W. M., & Segura-Aguilar, J. (2017). Are Dopamine Oxidation Metabolites Involved in the Loss of Dopaminergic Neurons in the Nigrostriatal System in Parkinson's Disease? *ACS Chemical Neuroscience*, 8(4), 702-711. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00034>
- Hoogman, M., Bralten, J., Hibar, D. P., Mennes, M., Zwiers, M. P., Schweren, L. S. J., van Hulzen, K. J. E., Medland, S. E., Shumskaya, E., Jahanshad, N., Zeeuw, P. D., Szekely, E., Sudre, G., Wolfers, T., Onnink, A. M. H., Dammers, J. T., Mostert, J. C., Vives-Gilabert, Y., Kohls, G., . . . Franke, B. (2017). Subcortical brain volume differences in participants with attention deficit hyperactivity disorder in children and adults: a cross-sectional mega-analysis. *The Lancet Psychiatry*, 4(4), 310-319. [https://doi.org/10.1016/s2215-0366\(17\)30049-4](https://doi.org/10.1016/s2215-0366(17)30049-4)
- Huang, T., Leu, D., & Zou, Y. (2015). Oxidative stress and redox regulation on hippocampal-dependent cognitive functions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 576, 2-7. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.03.014>
- Hussain, L. S., Reddy, V., & Maani, C. V. (2022, 8 mayo). Fisiología, Sinapsis Noradrenérgica. National Library of Medicine. Recuperado 7 de noviembre de 2022, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540977/>
- Joseph, N., Zhang-James, Y., Perl, A., & Faraone, S. V. (2013). Oxidative Stress and ADHD. *Journal of Attention Disorders*, 19(11), 915-924. <https://doi.org/10.1177/1087054713510354>
- Kasai, S., Shimizu, S., Tatara, Y., Mimura, J., & Itoh, K. (2020). Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. *Biomolecules*, 10(2), 320. <https://doi.org/10.3390/biom10020320>
- Kitaoka, T., Morimoto, M., Hashimoto, T., Tsuda, Y., Nakatsu, T., & Kyotani, S. (2020). Evaluation of the efficacy of drug treatment based on measurement of the oxidative stress, using reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential, in children with autism spectrum disorder and attention deficit hyperactivity disorder. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40780-020-00164-w>
- Kohman, R. A., & Rhodes, J. S. (2013). Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain Behavior and Immunity*, 27, 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.09.003>
- Kowalczyk, O. S., Cubillo, A. I., Smith, A., Barrett, N., Giampietro, V., Brammer, M., Simmons, A. & Rubia, K. (2019). Methylphenidate and atomoxetine normalise fronto-parietal underactivation during sustained attention in ADHD adolescents. *European Neuropsychopharmacology*, 29(10), 1102-1116. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2019.07.139>
- Kozłowska, A., Wojtacha, P., Równiak, M., Kolenkiewicz, M., & Huang, A. C. W. (2019). ADHD pathogenesis in the immune, endocrine and nervous systems of juvenile and maturing SHR and WKY rats. *Psychopharmacology*, 236(10), 2937-2958. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-5180-0>
- Kul, M., Unal, F., Kandemir, H., Sarkarati, B., Kilinc, K., & Kandemir, S. B. (2015). Evaluation of Oxidative Metabolism in Child and Adolescent Patients with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Psychiatry Investigation*, 12(3), 361. <https://doi.org/10.4306/pi.2015.12.3.361>
- Kurhan, F., & Alp, H. H. (2021). Dynamic Thiol/Disulfide Homeostasis and Oxidative DNA Damage in Adult Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 19(4), 731-738. <https://doi.org/10.9758/cpn.2021.19.4.731>
- Lee, T. H., Lee, C. H., Kim, I. Y., Yan, B., Park, J. O., Kwon, S., Park, O. K., Ahn, J. Y., Cho, J. H., Won, M. H., & Kim, S. (2012). Effects of ADHD therapeutic agents, methylphenidate and atomoxetine, on hippocampal neurogenesis in the adolescent mouse dentate gyrus. *Neuroscience Letters*, 524(2), 84-88. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.07.029>
- Leffa, D. T., Bellaver, B., de Oliveira, C., de Macedo, I. C., de Freitas, J. S., Grevet, E. H., Caumo, W., Rohde, L. A., Quincozes-Santos, A., & Torres, I. L. S. (2017). Increased Oxidative Parameters and Decreased Cytokine Levels in an Animal Model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Neurochemical Research*, 42(11), 3084-3092. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2341-6>
- Leisman, G. & Melillo, R. (2022). Front and center: Maturational dysregulation of frontal lobe functional neuroanatomic connections in attention deficit hyperactivity disorder. *Frontiers in Neuroanatomy*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnana.2022.936025>
- 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. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 40, 221-228. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.08.012>
- Leroy, F., Park, J., Asok, A., Brann, D. H., Meira, T., Boyle, L. M., Buss, E. W., Kandel, E. R., & Siegelbaum, S. A. (2018). A circuit from hippocampal CA2 to lateral septum disinhibits social aggression. *Nature*, 564(7735), 213-218. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0772-0>
- Liddelow, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, 46(6), 957-967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
- Lopresti, A. L. (2015). Oxidative and nitrosative stress in ADHD: possible causes and the potential of antioxidant-targeted therapies. *ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders*, 7(4), 237-247. <https://doi.org/10.1007/s12402-015-0170-5>
- MacKenzie, K. R., Zhao, M., Barzi, M., Wang, J., Bissig, K. D., Maletic-Savatic, M., Jung, S. Y., & Li, F. (2020). Metabolic profiling of norepinephrine reuptake inhibitor atomoxetine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 153, 105488. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105488>
- Martella, D., Aldunate, N., Fuentes, L. J., & Sánchez-Pérez, N. (2020). Arousal and Executive Alterations in Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). *Frontiers in Psychology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.01991>
- Martins, M. A. F., Reinke, A., Petronilho, F., Gomes, K. M., Dal-Pizzol, F., & Quevedo, J. (2006). Methylphenidate treatment induces oxidative stress in young rat brain. *Brain Research*, 1078(1), 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.01.004>
- Mattei, D., Ivanov, A., Ferrai, C., Jordan, P., Guneykaya, D., Buonfiglioli, A., Schaafsma, W., Przanowski, P., Deuther-Conrad, W., Brust, P., Hesse, S., Patt, M., Sabri, O., Ross, T. L., Eggen, B. J. L., Boddeke, E. W. G. M., Kaminska, B., Beule, D., Pombo, A., . . . Wolf, S. A. (2017). Maternal immune activation results in complex microglial transcriptome signature in the adult offspring that is reversed by minocycline treatment. *Translational Psychiatry*, 7(5), e1120-e1120. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.80>
- Mecanismo de acción - Datos acerca del uso del metilfenidato para el tratamiento del TDAH. (s. f.). <https://sites.google.com/a/uabc.edu.mx/metilfenidato/farmacodinamia/mecanismo-de-accion>
- Mechler, K., Banaschewski, T., Hohmann, S. & Häge, A. (2022). Evidence-based pharmacological treatment options for ADHD in children and adolescents. *Pharmacology & Therapeutics*, 230, 107940. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107940>
- Medin, T., Rinholm, J., Owe, S., Sagvolden, T., Gjedde, A., Storm-Mathisen, J., & Bergersen, L. (2013). Low dopamine D5 receptor density in hippocampus in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Neuroscience*, 242, 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.03.036>
- Miyazaki, C., Koyama, M., Ota, E., Swa, T., Mlunde, L. B., Amiya, R. M., Tachibana, Y., Yamamoto-Hanada, K., & Mori, R. (2017). Allergic diseases in children with attention deficit hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis. *BMC Psychiatry*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12888-017-1281-7>
- Mohammadi, M. R., Zarafshan, H., Khaleghi, A., Ahmadi, N., Hooshyari, Z., Mostafavi, S. A., Ahmadi, A., Alavi, S. S., Shakiba, A. & Salmanian, M. (2019). Prevalence of ADHD and Its Comorbidities in a Population-Based Sample. *Journal of Attention Disorders*, 25(8), 1058-1067. <https://doi.org/10.1177/1087054719886372>
- Motaghinejad, M., Motevalian, M., & Shabab, B. (2016). Effects of chronic treatment with methylphenidate on oxidative stress and inflammation in hippocampus of adult rats. *Neuroscience Letters*, 619, 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.12.015>
- Motaghinejad, M., Motevalian, M., Fatima, S., Beiranvand, T., & Mozaffari, S. (2017). Topiramate via NMDA, AMPA/kainate, GABAA and Alpha2 receptors and by modulation of CREB/BDNF and Akt/GSK3 signaling pathway exerts neuroprotective effects against methylphenidate-induced neurotoxicity in rats. *Journal of Neural Transmission*, 124(11), 1369-1387. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1771-2>
- Motaghinejad, M., Motevalian, M., Shabab, B., & Fatima, S. (2017). Effects of acute doses of methylphenidate on inflammation and oxidative stress in isolated hippocampus and cerebral cortex of adult rats. *Journal of Neural Transmission*, 124(1), 121-131. <https://doi.org/10.1007/s00702-016-1623-5>
- Moudy, A. M., Kunkel, D. D., & Schwartzkroin, P. A. (1993). Development of dopamine-beta hydroxylase-positive fiber innervation of the rat hippocampus. *Synapse*, 15(4), 307-318. <https://doi.org/10.1002/syn.890150407>
- Mowlem, F. D., Rosenqvist, M. A., Martin, J., Lichtenstein, P., Asherson, P., & Larsson, H. (2018). Sex differences in predicting ADHD clinical diagnosis and pharmacological treatment. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 28(4), 481-489. <https://doi.org/10.1007/s00787-018-1211-3>
- Muñuzuri Nájera, G. P., & Yepiz Lachica, M. A. (2015). Mecanismo de acción. Datos acerca del uso del metilfenidato para el tratamiento del TDAH. Recuperado 18 de noviembre de 2022, de <https://sites.google.com/a/uabc.edu.mx/metilfenidato/farmacodinamia/mecanismo-de-accion>

- Namjoo, I., Alavi Naeini, A., Najafi, M., Aghaye Ghazvini, M. R., & Hasanzadeh, A. (2020). The Relationship Between Antioxidants and Inflammation in Children With Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Basic and Clinical Neuroscience Journal*, 313-322. <https://doi.org/10.32598/bcn.11.2.1489.1>
- 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 = Japanese Journal of Psychopharmacology*. 2009 Jun;29(3):115-120. PMID: 19663261.
- Nasim, S., Naeini, A. A., Najafi, M., Ghazvini, M., & Hassanzadeh, A. (2019). Relationship between antioxidant status and attention deficit hyperactivity disorder among children. *International Journal of Preventive Medicine*, 10(1), 41. [https://doi.org/10.4103/ijpvm.ijpvm\\_80\\_18](https://doi.org/10.4103/ijpvm.ijpvm_80_18)
- Nosi, D., Lana, D., Giovannini, M. G., Delfino, G., & Zecchi-Orlandini, S. (2021). Neuroinflammation: Integrated Nervous Tissue Response through Intercellular Interactions at the “Whole System” Scale. *Cells*, 10(5), 1195. <https://doi.org/10.3390/cells10051195>
- O’Sullivan, J. B., Ryan, K., Curtin, N. M., McLoughlin, D. M., & Connor, T. R. (2008). Noradrenaline reuptake inhibitors limit neuroinflammation in rat cortex following a systemic inflammatory challenge: implications for depression and neurodegeneration. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 12(05), 687. <https://doi.org/10.1017/s146114570800967x>
- Oakes, H. V., Ketchum, S., Hall, A. N., Ensley, T., Archibald, K. M., & Pond, B. B. (2019). Chronic methylphenidate induces increased quinone production and subsequent depletion of the antioxidant glutathione in the striatum. *Pharmacological Reports*, 71(6), 1289-1292. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.08.003>
- Palacios-Filardo, J., & Mellor, J. R. (2019). Neuromodulation of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 54, 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.08.009>
- Park, J. O., Shin, B. N., Chen, B., Kim, I. Y., Ahn, J. Y., Cho, J. G., Tae, H., Lee, J. S., Lee, C. H., Kim, Y., Lee, D. Y., Kim, S., & Won, M. H. (2015b). Neuroprotection and reduced gliosis by atomoxetine pretreatment in a gerbil model of transient cerebral ischemia. *Journal of the Neurological Sciences*, 359(1-2), 373-380. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.11.028>
- Polanczyk, G. V., De Lima, M. A., Hallal, P. C., Biederman, J., & Rohde, L. A. (2007). The Worldwide Prevalence of ADHD: A Systematic Review and Meta-regression Analysis. *American Journal of Psychiatry*, 164(6), 942-948. <https://doi.org/10.1176/ajp.2007.164.6.942>
- Posner, J., Polanczyk, G. V. & Sonuga-Barke, E. (2020). Attention-deficit hyperactivity disorder. *The Lancet*, 395(10222), 450-462. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)33004-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)33004-1)
- Prince, J. B. (2008). Catecholamine Dysfunction in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 28(3), S39-S45. <https://doi.org/10.1097/jcp.0b013e318174f92a>
- Purper-Ouakil, D., Ramoz, N., Lepagnol-Bestel, A. M., Gorwood, P., & Simonneau, M. (2011). Neurobiology of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. *Pediatric Research*, 69(5 Part 2), 69R-76R. <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e318212b40f>
- Quintero, J., Gutiérrez-Casares, J. R., & Álamo, C. (2022). Molecular Characterisation of the Mechanism of Action of Stimulant Drugs Lisdexamfetamine and Methylphenidate on ADHD Neurobiology: A Review. *Neurology and Therapy*, 1-29.
- Réus, G. Z., Fries, G. R., Stertz, L., Badawy, M. E. I., Passos, I. C., Barichello, T., Kapczinski, F., & Quevedo, J. (2015). The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience*, 300, 141-154. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.018>
- Rho, H. J., Kim, J. H., & Lee, S. H. (2018). Function of Selective Neuromodulatory Projections in the Mammalian Cerebral Cortex: Comparison Between Cholinergic and Noradrenergic Systems. *Frontiers in Neural Circuits*, 12. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00047>
- RITALIN - PLM. (s. f.). [https://www.medicamentosplm.com/Home/productos/ritalin\\_comprimidos/122/101/9596/25](https://www.medicamentosplm.com/Home/productos/ritalin_comprimidos/122/101/9596/25)
- Roshannia, S., Maleki-Karamolah, S., Akhlaghi, Z. & Kordestani-Moghadam, P. (2021). A Review of Cognitive Disorders in Attention Deficit Hyperactivity Disorder with Emphasis on Executive Functions and Brain Structures. *International Clinical Neuroscience Journal*, 8(2), 60-66. <https://doi.org/10.34172/icnj.2021.14>
- Sadasivan, S., Pond, B. B., Pani, A. K., Qu, C., Jiao, Y., & Smeyne, R. J. (2012). Methylphenidate Exposure Induces Dopamine Neuron Loss and Activation of Microglia in the Basal Ganglia of Mice. *PLOS ONE*, 7(3), e33693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033693>
- 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>
- Sarnowska, A. (2002). Application of organotypic hippocampal culture for study of selective neuronal death. *Folia neuropathologica*, 40(2), 101-106.

- Sayal, K., Prasad, V., Daley, D., Ford, T., & Coghill, D. (2018). ADHD in children and young people: prevalence, care pathways, and service provision. *The Lancet Psychiatry*, 5(2), 175-186. [https://doi.org/10.1016/s2215-0366\(17\)30167-0](https://doi.org/10.1016/s2215-0366(17)30167-0)
- 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. *Journal of Neural Transmission*, 117(6), 793-797. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0408-5>
- Schmitz, F., Scherer, E. B. S., Machado, F. S., Da Cunha, A. A., Tagliari, B., Netto, C. A., & Wyse, A. T. S. (2012). Methylphenidate induces lipid and protein damage in prefrontal cortex, but not in cerebellum, striatum and hippocampus of juvenile rats. *Metabolic Brain Disease*, 27(4), 605-612. <https://doi.org/10.1007/s11011-012-9335-5>
- Sengupta, P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International Journal of Preventive Medicine*, 4, 624 - 630.
- Sezen, H., Kandemir, H., Savik, E., Basmacı Kandemir, S., Kilicaslan, F., Bilinc, H., & Aksoy, N. (2016). Increased oxidative stress in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Redox Report*, 21(6), 248-253. <https://doi.org/10.1080/13510002.2015.1116729>
- Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., & Mohan, G. (2016). Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience*, 127(7), 624-633. <https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1212854>
- Sheng, W. S., Hu, S., Feng, A., & Rock, R. B. (2013). Reactive Oxygen Species from Human Astrocytes Induced Functional Impairment and Oxidative Damage. *Neurochemical Research*, 38(10), 2148-2159. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1123-z>
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 32(12), 638-647. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>
- Stephenson, J., Nutma, E., Van Der Valk, P., & Amor, S. (2018). Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology*, 154(2), 204-219. <https://doi.org/10.1111/imm.12922>
- Sterley, T. L., Howells, F. M., & Russell, V. A. (2013). Evidence for reduced tonic levels of GABA in the hippocampus of an animal model of ADHD, the spontaneously hypertensive rat. *Brain Research*, 1541, 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.10.023>
- Swanson, C. M., Perry, K. W., Koch-Krueger, S., Katner, J., Svensson, K., & Bymaster, F. P. (2006). Effect of the attention deficit/hyperactivity disorder drug atomoxetine on extracellular concentrations of norepinephrine and dopamine in several brain regions of the rat. *Neuropharmacology*, 50(6), 755-760. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.11.022>
- Thermo Fisher Scientific [Invitrogen]. (s. f.). Anti-GFAP Antibodies. Thermo Fisher Scientific. Recuperado 4 de enero de 2023, de <https://www.thermofisher.com/antibody/primary/target/gfap#>
- Tzakis, N., & Holahan, M. R. (2019). Social Memory and the Role of the Hippocampal CA2 Region. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00233>
- Vázquez-González, D., Carreón-Trujillo, S., Álvarez-Arellano, L., Abarca-Merlin, D. M., Domínguez-López, P., Salazar-García, M., & Corona, J. C. (2023). A Potential Role for Neuroinflammation in ADHD. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 327-356. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-7376-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-981-19-7376-5_15)
- Verghese, C., & Abdijadid, S. (2022). Methylphenidate. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Verlaet, A. A. J., Breynaert, A., Ceulemans, B., De Bruyne, T., Franssen, E., Pieters, L., Savelkoul, H. F. J., & Hermans, N. (2018). Oxidative stress and immune aberrancies in attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): a case-control comparison. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 28(5), 719-729. <https://doi.org/10.1007/s00787-018-1239-4>
- Willcutt, E. G. (2012, 15 agosto). *The Prevalence of DSM-IV Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Meta-Analytic Review*. SpringerLink. [https://link.springer.com/article/10.1007/s13311-012-0135-8?error=cookies\\_not\\_supported&code=479027f6-b37a-4985-8acf-40badfdd3682](https://link.springer.com/article/10.1007/s13311-012-0135-8?error=cookies_not_supported&code=479027f6-b37a-4985-8acf-40badfdd3682)
- Williamson, A., & Spencer, D. D. (1994). Electrophysiological characterization of CA2 pyramidal cells from epileptic humans. *Hippocampus*, 4(2), 226-237. <https://doi.org/10.1002/hipo.450040213>
- Wolraich, M. L., Chan, E., Froehlich, T., Lynch, R. L., Bax, A., Redwine, S. T., Iyemba, D., & Hagan, J. F. (2019). ADHD Diagnosis and Treatment Guidelines: A Historical Perspective. *Pediatrics*, 144(4). <https://doi.org/10.1542/peds.2019-1682>
- Wu, C. S., Shang, C. Y., Lin, H. Y., & Gau, S. S. F. (2021). Differential Treatment Effects of Methylphenidate and Atomoxetine on Executive Functions in Children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, 31(3), 187-196. <https://doi.org/10.1089/cap.2020.0146>
- Wu, J., Xiao, H., Sun, H., Zou, L., & Zhu, L. (2012). Role of Dopamine Receptors in ADHD: A Systematic Meta-analysis. *Molecular Neurobiology*, 45(3), 605-620. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8278-5>

- Xu, B., Lang, L., Lian, S., Guo, J., Wang, J., Yang, H., & Li, S. (2019). Oxidation Stress-Mediated MAPK Signaling Pathway Activation Induces Neuronal Loss in the CA1 and CA3 Regions of the Hippocampus of Mice Following Chronic Cold Exposure. *Brain Sciences*, 9(10), 273. <https://doi.org/10.3390/brainsci9100273>
- Yang, C. F., Yang, C. C., & Wang, I. J. (2018). Association between allergic diseases, allergic sensitization and attention-deficit/hyperactivity disorder in children: A large-scale, population-based study. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(3), 277-283. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.016>
- Zhu, Y., Liu, F., Zou, X., & Torbey, M. T. (2015). Comparison of unbiased estimation of neuronal number in the rat hippocampus with different staining methods. *Journal of Neuroscience Methods*, 254, 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.07.022>