



FORMANDO
PROFESIONALES
DE LA QUÍMICA

"UN PILAR DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"



EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON ATOMOXETINA SOBRE PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES EN CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS

Robles Bañuelos Benjamín Alejandro¹, Corona Castillo Juan Carlos².

Unidad de Ciencias Químicas ¹

Laboratorio de investigación en Neurociencias ²

RESUMEN

El trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) es el padecimiento más frecuentemente diagnosticado en la población infantil, uno de los fármacos utilizados para el tratamiento del TDAH es la atomoxetina (ATX). A pesar del uso terapéutico de la ATX, se ha demostrado que tiene mecanismos adicionales que afectan varias vías de transducción de señales, sin embargo, no hay evidencia sobre el papel del estrés oxidativo debido al tratamiento con ATX. Por esta razón, en este estudio se evaluó el efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de ATX sobre proteínas antioxidantes en células SH-SY5Y diferenciadas obtenidas a partir de neuroblastoma humano. Nuestros resultados demostraron una disminución en la expresión de proteínas antioxidantes SOD1 Y Nrf2 por la exposición a dosis de 20 y 50 μM de ATX, estos hallazgos sugieren que existe un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS).

INTRODUCCIÓN

El trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), es un trastorno persistente del neurodesarrollo que afecta al 5% de los niños y adolescentes en todo el mundo, caracterizado por falta de atención, hiperactividad-impulsividad, o ambos¹. Los síntomas del TDAH tienen un gran impacto en el desarrollo del individuo e interfieren en su funcionamiento social, emocional y cognitivo. En estudios relacionados con TDAH, se han encontrado cambios en parámetros oxidantes y antioxidantes, los cuales se cree pueden contribuir al desarrollo de dicho trastorno, ya que, las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden reaccionar con proteínas asociadas a la membrana, alterando la función de receptores de enzimas y neurotransmisores, dando lugar a una predisposición para el trastorno².

Cuando las especies reactivas de oxígeno se producen en cantidades excesivas o los sistemas de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos son ineficaces, algunas reacciones en cadena que causan daño celular o incluso la muerte de las células se activan, por lo tanto, el estrés oxidativo y la cascada de eventos que desencadena, han surgido como una hipótesis de la posible causa en el desarrollo de este trastorno³. Las principales enzimas antioxidantes intracelulares incluyen superóxido



UAZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
ZACATECAS
"Francisco García Salinas"

USCQ



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS

FORMANDO
PROFESIONALES
DE LA QUÍMICA"UN PILAR DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"

dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px); Estos forman un sistema de defensa antioxidante contra el daño mediado por radicales. El estrés oxidativo generado puede evaluarse indirectamente mediante la medición de algunos niveles de enzimas antioxidantes o por productos de peroxidación lipídica y se especula que sus efectos pueden estar asociados con la causa de TDAH. Evidentemente existe una relación entre el estrés oxidativo y el TDAH, ya que se han encontrado niveles elevados de malondialdehído (MDA), que es el producto de degradación de las principales reacciones en cadena que conduce a la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales se han encontrado en niños⁴ y adultos con TDAH².

El tratamiento de primera línea para el TDAH está representado por el metilfenidato (MPH), un psicoestimulante, que actúa inhibiendo el transportador de dopamina (DAT), potenciando así la neurotransmisión dopaminérgica. Sin embargo, las preocupaciones sobre la responsabilidad de abuso de MPH han llevado a los investigadores a desarrollar la atomoxetina (ATX), un inhibidor selectivo de la recaptación de norepinefrina, carente de propiedades estimulantes². A pesar del uso terapéutico de la ATX, se ha demostrado que ésta tiene mecanismos adicionales que afectan varias vías de transducción de señales, por ejemplo, la ATX incrementó la expresión de las subunidades del receptor GABA A, la ubiquinol-citocromo c reductasa complejo nuclear 2 y la proteína asociada a sinaptosomas de 25 kDa⁵; la ATX actuó como bloqueador del receptor NMDA⁶; indujo la expresión de BDNF en la corteza prefrontal, influyendo así en la plasticidad sináptica y la función cognitiva⁷. Sin embargo, no hay evidencia sobre el papel del estrés oxidativo debido al tratamiento con ATX. El objetivo del presente estudio es evaluar el impacto que tiene la ATX sobre algunas proteínas antioxidantes en células SH-SY5Y diferenciadas obtenidas a partir de neuroblastoma humano.

METODOLOGÍA

Condiciones de cultivo celular

Los experimentos en este estudio se llevaron a cabo utilizando la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y; las células se cultivaron en medio DMEM/F12 suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, aminoácidos no esenciales (NEAA) 1% y penicilina / estreptomina (100 U / ml y 100 µg / ml, respectivamente), se incubaron bajo condiciones estándar a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Todos los experimentos se realizaron utilizando células del pase 31 – 32. Para su diferenciación a un fenotipo similar a neuronas, se sembraron sobre una matriz de membrana basal (Matrigel) a una densidad de 1.2x10⁶ células, el contenido de FBS del medio de cultivo se redujo al 2% y las células se estimularon con ácido retinoico 10 µM. Estas condiciones estándar de cultivo se mantuvieron por 7 días, durante ese tiempo se cambió el medio de cultivo cada 2 días y a la vez se estimularon las células con diferentes concentraciones de ATX (1, 5, 10, 20 y 50 µM).



FORMANDO
PROFESIONALES
DE LA QUÍMICA

"UN PILAR DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"



Western Blot

Se realizó la extracción de proteínas totales para la posterior cuantificación y separación mediante electroforesis. La concentración de proteínas se determinó espectrofotométricamente a 280 nm en un SpectroStar Nano y se utilizó la proteína β -actina como control de carga. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 10% y se transfirieron a membranas de Nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con 10% de leche en polvo sin grasa en PBS-Tween (Tween al 0.05%). Las membranas bloqueadas se incubaron durante la noche con anticuerpos primarios diluidos en solución de albúmina a 4° C. A continuación, las membranas se lavaron tres veces en PBS-Tween y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa fueron detectados por quimioluminiscencia utilizando el sustrato (ECL - BioRad) de acuerdo a las indicaciones del fabricante, las bandas se detectaron con el sistema Fusion-Solo WL (Vilber Lourmat) y se procesaron con el programa Image J.

Análisis estadístico

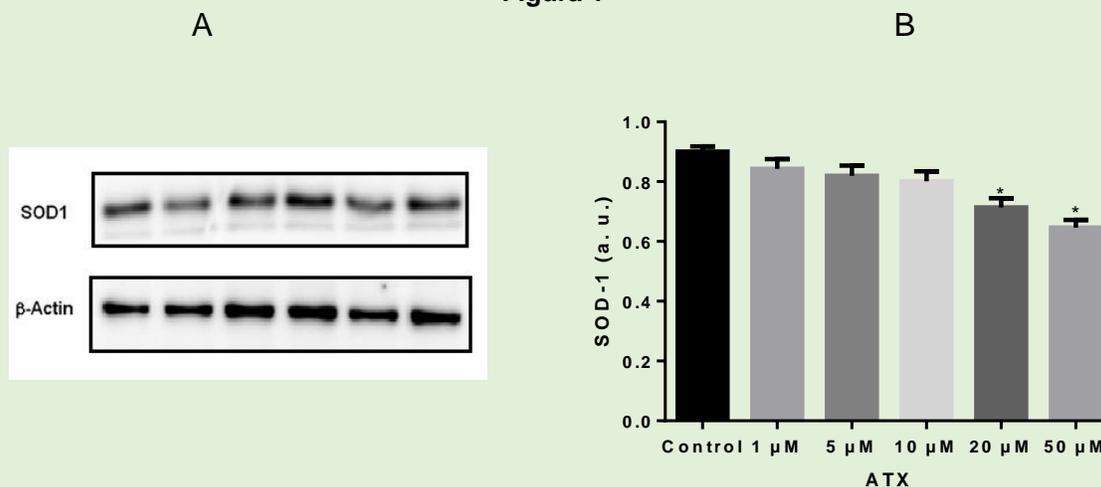
Se muestran los valores de media \pm S.E.M., de al menos tres experimentos independientes. Los datos se compararon mediante la prueba ANOVA de un solo sentido con la prueba post-hoc de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

El tratamiento con ATX disminuye la expresión de SOD1.

En el presente estudio se evaluó el impacto del tratamiento con ATX sobre proteínas antioxidantes a través de western blot, los cuales revelaron que el tratamiento a dosis de 20 y 50 μ M de ATX en células SH-SY5Y diferenciadas disminuyó la expresión del superóxido dismutasa 1 (SOD1), que es un depurador citosólico del radical superóxido y un importante mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo (Figuras 1A y 1B).

Figura 1



El tratamiento con ATX disminuyó la expresión de SOD1. (A) Western blot representativo de la expresión de SOD1. (B) Análisis cuantitativo del tratamiento con ATX. B-actina se utilizó como un control de carga. Los datos son media \pm SEM, y los valores son de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ en comparación con el grupo control.

El tratamiento con ATX disminuyó la expresión de Nrf2.

Nrf2 es un factor de transcripción ascendente fundamental responsable de la regulación del equilibrio redox y está implicado en la regulación de las enzimas de detoxificación. Como se muestra en las figuras 2A y 2B, Nrf2 disminuyó su expresión en células SH-SY5Y diferenciadas expuestas a dosis de 20 y 50 μ M de ATX en comparación con el control.

A

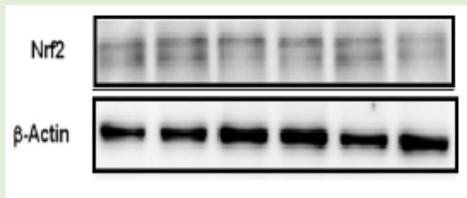
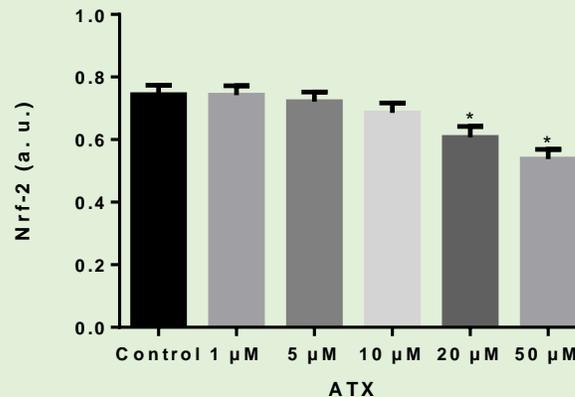


Figura 2

B



El tratamiento con ATX disminuyó la expresión de Nrf2. (A) Western blot representativo de la expresión de Nrf2. (B) Análisis cuantitativo del tratamiento con ATX. β -actina se utilizó como un control de carga. Los datos son media \pm SEM, y los valores son de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ en comparación con el grupo control.

DISCUSIÓN

Las mitocondrias desempeñan un papel clave en la fisiología y patología celular en el SNC, son las principales productoras de ATP en células eucariotas aeróbicas, regulan la homeostasis de los iones y también son productoras de radicales libres y blancos de lesión inducidos por estos⁸. Se ha demostrado que el flujo de electrones a lo largo de la cadena transportadora (CTE) en la mitocondria constituye una fuente importante de ROS, pero la relación causal entre TDAH y el aumento de ROS sigue siendo incierta. Sin embargo, ya se ha estudiado el estado oxidativo de TDAH, pero los efectos del tratamiento con ATX sobre el estrés oxidativo han sido poco estudiados conduciendo a información limitada.

Este estudio demostró que las dosis de 20 y 50 μ M de ATX tiene efectos sobre algunas proteínas antioxidantes. Como demostrado por la disminución en la expresión de SOD1 que es un depurador citosólico bien caracterizado que facilita la dismutación de superóxido al peróxido de hidrógeno. También se encontró una disminución en la expresión de Nrf2 que regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes de fase 2, mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE, que puede ser activada por diversos compuestos oxidantes y/o electrófilos de naturaleza química muy diversa. Nrf2 es normalmente secuestrado en el citoplasma por su inhibidor Keap1. En respuesta al estrés oxidativo, Nrf2 se heterodimeriza con miembros de la familia Jun (c-Jun, JunB y JunD) para activar la expresión génica de enzimas desintoxicantes como NAD(P)H: quinona oxidoreduc-



UAZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
ZACATECAS
"Francisco García Salinas"

USCQ



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS

FORMANDO
PROFESIONALES
DE LA QUÍMICA"UN PILAR DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"JORNADAS DE CIENCIAS
QUÍMICAS
FECHAS 29 al 31 de Agosto 2017

tasa 1 (NQO1), la glutatión transferasa (GST), la γ -glutamil cisteína sintetasa (γ -GCS), entre otras. Una vez activados, estos genes funcionan sinérgicamente para mantener la homeostasis redox intracelular⁹. Los resultados sugieren que existe un aumento en los niveles de ROS, ya que ROS además de genera daño directo en proteínas, incrementa los niveles intracelulares del catión Ca^{2+} produciendo una mayor actividad en proteasas dependientes de calcio ocasionando daño en proteínas³. Además, las células tienen un sistema basal de proteínas antioxidantes y en presencia de un incremento de ROS estas tienen a contrarrestarlas y por ende disminuyen su expresión, lo cual se puede ver reflejado en los análisis cuantitativos realizados.

Por lo tanto, los cambios inducidos por las dosis de 20 y 50 μM de ATX pueden estar contribuyendo al daño del tejido nervioso, lo cual ya se ha demostrado previamente en el laboratorio, ya que se ha encontrado que concentraciones de 20 y 50 μM de ATX generan cambios en la morfología de las células SH-SY5Y diferenciadas, además de producir una disminución en el potencial de la membrana mitocondrial y masa mitocondrial, produciendo alrededor de un 30% de muerte celular.

En conclusión, los resultados mostraron una disminución en la expresión de las proteínas antioxidantes SOD1 Y Nrf2 debido a la exposición a dosis de 20 y 50 μM de ATX, estos hallazgos sugieren que existe un aumento en los niveles de ROS. Actualmente se está trabajando en el laboratorio con una sonda para medir en células SH-SY5Y diferenciadas con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos.



UAZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
ZACATECAS
"Francisco García Salinas"

USCQ



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS

FORMANDO
PROFESIONALES
DE LA QUÍMICA"UN PILAR DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"

REFERENCIAS

1. Faraone, S. V. *et al.* Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Nat. Rev. Dis. Primer* 15020 (2015). doi:10.1038/nrdp.2015.20
2. Bulut, M. *et al.* Malondialdehyde levels in adult attention-deficit hyperactivity disorder. *J. Psychiatry Neurosci. JPN* 32, 435 (2007).
3. Stadtman, E. R. & Levine, R. L. Protein Oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899, 191–208 (2006).
4. Ceylan, M., Sener, S., Bayraktar, A. C. & Kavutcu, M. Oxidative imbalance in child and adolescent patients with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34, 1491–1494 (2010).
5. Lempp, T. *et al.* Altered gene expression in the prefrontal cortex of young rats induced by the ADHD drug atomoxetine. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 40, 221–228 (2013).
6. Ludolph, A. G. *et al.* Atomoxetine acts as an NMDA receptor blocker in clinically relevant concentrations: Atomoxetine acts as an NMDA receptor blocker. *Br. J. Pharmacol.* 160, 283–291 (2010).
7. Fumagalli, F. *et al.* Sub-chronic exposure to atomoxetine up-regulates BDNF expression and signalling in the brain of adolescent spontaneously hypertensive rats: Comparison with methylphenidate. *Pharmacol. Res.* 62, 523–529 (2010).
8. Corona, J. C. & Duchon, M. R. Mitochondrial Bioenergetics Assessed by Functional Fluorescence Dyes. in *Brain Energy Metabolism* (eds. Hirrlinger, J. & Waagepetersen, H. S.) 90, 161–176 (Springer New York, 2014).
9. Fainstein, M. K. Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *REB* 26, 18–25 (2007).