



UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL:

EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMATORIO CON EL TRATAMIENTO EN PACIENTES CON TDAH PRE PÚBERES Y PÚBERES

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE GRANADA

GRUPO DE INVESTIGACIÓN CTS-101: COMUNICACIÓN
INTERCELULAR, CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA (CIBM)

Laura Garre Morata

Granada 2024

EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMATORIO CON EL TRATAMIENTO EN PACIENTES CON TDAH PRE PÚBERES Y PÚBERES

Memoria que presenta la graduada en Farmacia
D^a. Laura Garre Morata
como aspirante al Grado de Doctor

Fdo. D^a. Laura Garre Morata

V.º B.º de los Directores de la Tesis Doctoral

Dr. Darío Acuña Castroviejo
Doctor en Medicina
Catedrático Emérito de Fisiología
de la UGR

Dr. Antonio Molina Carballo
Doctor en Medicina
Profesor Titular Vinculado de
Pediatria de la Facultad de
Medicina de la UGR

Universidad de Granada
2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Laura Garre Morata
ISBN: 978-84-1195-368-9
URI: <https://hdl.handle.net/10481/92856>

El doctorando **Laura Garre Morata** y los directores de la tesis: **Darío Acuña Castroviejo** y **Antonio Molina Carballo**,

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 20 de marzo de 2024

Directores de la Tesis:

Doctorando:

Firma

Firma

Firma

CERTIFICACIONES

D. Darío Acuña Castroviejo, Catedrático Emérito de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, y Antonio Molina Carballo, Profesor Titular Vinculado de Pediatría de la Facultad de Medicina de la UGR,

CERTIFICAN QUE:

D^a. Laura Garre Morata, Graduada en Farmacia, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada, el trabajo titulado “EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMATORIO CON EL TRATAMIENTO EN PACIENTES CON TDAH PRE PÚBERES Y PÚBERES” reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 20 de marzo de 2024

V.º B.º Directores

El interesado

Darío Acuña Castroviejo

Antonio Molina Carballo

Laura Garre Morata

El trabajo de investigación que se expone en esta Memoria Doctoral ha sido realizado en la Unidad de Gestión Clínica de Laboratorios del Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada y en el Grupo de Investigación CTS-101:"Comunicación Intercelular", en el Centro de Investigación Biomédica (CIBM), bajo la dirección del Dr. Darío Acuña Castroviejo y del Dr. Antonio Molina Carballo.

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el Instituto de Salud Carlos III a través del proyecto CB/10/00238 (cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional/Fondo Social Europeo "Invierte en tu futuro"); la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo, Junta de Andalucía (CTS-101), España, y la UGC de Laboratorios Clínicos, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, España.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral se han publicado en un artículo científico de una revista internacional:

Garre-Morata Laura, de Haro Tomás, González Villén Raquel, Fernández-López María Luisa, Escames Germaine, Molina-Carballo Antonio, Acuña-Castroviejo Darío. Changes in Cortisol and in Oxidative/Nitrosative Stress Indicators after ADHD Treatment. *Antioxidants* **2024**, doi: 10.3390/antiox13010092

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis. Por un lado, al doctor Darío Acuña Castroviejo, por abrirme las puertas de su grupo de investigación y permitirme formar parte de él. Gracias por desentrañar la complejidad de este proceso y convertirlo en un camino mucho más sencillo de recorrer. Gracias al doctor Antonio Molina Carballo, por su entusiasmo, por su valiosa ayuda y por darme la oportunidad de colaborar con el servicio de Neuropediatría.

Gracias a todos los compañeros del CIBM, en especial a la doctoras Ana Guerra y Paola Montes, por enseñarme y ayudarme con las técnicas. Gracias también a los miembros del Servicio de Neuropediatría del Hospital San Cecilio, en especial a Raquel González Villén, por su inestimable ayuda en los inicios de este estudio y en el proceso de captación de niños.

También me gustaría agradecer a todos mis compañeros del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital San Cecilio, por ayudarme, aconsejarme, apoyarme y por ser parte del capítulo más especial de mi vida. Gracias a técnicos, facultativos y residentes, en especial a la Chupipandi, por todo lo anterior y por todo lo que aquí no se puede contar.

Gracias al doctor Tomás de Haro, nuestro jefe de servicio, por ayudarme desde el primer momento con este proyecto, sin su ayuda no habría sido posible. Gracias al doctor Javier García Vilanova, por su ayuda con el LC MS/MS, sus consejos y su interés. Gracias a mi tutora durante los años de residencia, la doctora María del Señor López Vélez, por orientarme al principio de este camino. Y gracias al doctor José Vicente García Lario, por ser un referente para mí, por preocuparte y alegrarte de todos mis logros.

Gracias a mi pequeña familia de Granada, a la Montaña P., por convertir estos años en recuerdos que jamás imaginé formar. Gracias a mis amigas de siempre, las de Águilas, por ser las mejores amigas que podría tener.

Agradecimientos

Y, por último, gracias a mis 4 pilares fundamentales, en esta y todas las etapas de mi vida: mis padres, mi hermana Marta y Javi. Ojalá supiera expresar con palabras todo lo que ronda por mi cabeza. Sin lugar a duda, esto es por y para vosotros. Os quiero.

ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de la varianza

AOPP: Productos proteicos de oxidación avanzada

APA: Asociación Americana de Psiquiatría

ARN: Ácido ribonucleico

AUC: Área bajo la curva

AUC_G: Área bajo la curva con respecto al suelo

AUC_I: Área bajo la curva con respecto al incremento

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BRIEF2: Evaluación conductual de la función ejecutiva

CAR: Respuesta al despertar del cortisol

CAT: Catalasa

CIE: Clasificación internacional de las enfermedades

CRH: Hormona liberadora corticotropina

DA: Dopamina

DAT1: Gen de la proteína transportadora de dopamina 1

DHEA-s: Deshidroepiandrosterona sulfato

DMN: Circuito de activación por defecto

DRD4: Gen del receptor de dopamina D4

DSM: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

Abreviaturas

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

G6P: Glucosa-6-fosfato

G6PDH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GPx: Glutación peroxidasa

GRd: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HB: Hemoglobina

HHS: Hipotálamo-hipofisario-suprarrenal

HNE: Hidroxinonanal

HOO•: Radical hidroperoxilo

HRP: Peroxidasa de rábano

HTR1B: Gen del receptor subtipo 1B de serotonina

IgG: Inmunoglobulina G

IRM: Imágenes por resonancia magnética

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

LDX: Lisdexanfetamina

LPO: Productos de la peroxidación lipídica

MDA: Malondialdehído

MPH: Metilfenidato

NA: Noradrenalina

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (en forma reducida)

NADP+: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (en forma oxidada)

NET: Transportador de norepinefrina

NO•: Óxido nítrico

NO₂•: Radical dióxido de nitrógeno

NOX: Nitritos y nitratos

NRd: Nitrato reductasa

O₂ •-: Anión superóxido

•OH: Radical hidroxilo

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONOO-: Anión peroxinitrito

PBS: Tampón fosfato salino

PET: Tomografía computarizada por emisión de positrones

POST: Post tratamiento

PRET: Pre tratamiento

R-5-P: Ribosa-5-fosfato

Abreviaturas

RL: Radical libre

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPM: Revoluciones por minuto

SEM: Error estándar de la media

SHR: Rata espontáneamente hipertensa

SLC6A4: Gen del transportador de serotonina

SNC: Sistema nervioso central

SOD: Superóxido dismutasa

TDAH: Trastorno por déficit de atención e hiperactividad

TEA: Trastorno del espectro autista

TMB: Tetrametilbencidina

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

UGC: Unidad de gestión clínica

UV: Ultravioleta

VMAT2: Transportador vesicular de monoamina tipo 2

WKY: Wistar Kyoto

A Carmen y Pepe

RESUMEN

El Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad es uno de los trastornos del neurodesarrollo más frecuentes de la infancia. Según la quinta edición del Manual Diagnóstico de Enfermedades, DSM-5, su prevalencia se estima alrededor del 5 %. Sus síntomas nucleares y su elevada comorbilidad hacen que aquellos que la padecen presenten dificultades para el desarrollo pleno de su vida académica, familiar y social.

Sin embargo, a pesar de la importancia en términos de salud pública, aún desconocemos de manera precisa el origen y la etiología del trastorno. Parece tratarse de una entidad multifactorial, donde se describe un importante papel de la interacción entre la herencia genética y la exposición medioambiental.

Las teorías neurotransmisoras que apuntan a desórdenes en los niveles de dopamina y catecolaminas, así como las modificaciones neuroanatómicas observadas en determinadas regiones cerebrales parecen ser los mecanismos fisiopatológicos más estudiados y que presentan mayor evidencia científica. Sin embargo, la participación de otros sistemas biológicos, como el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal, o la influencia del estrés oxidativo y la neuroinflamación conforman las nuevas líneas de investigación que sustentarían la base multifactorial y plural de esta entidad.

En cuanto a su diagnóstico, la falta de un marco teórico que explique con exactitud los mecanismos neurobiológicos que subyacen al trastorno dificulta el desarrollo de biomarcadores cuantificables, que faciliten el proceso diagnóstico, el pronóstico y el seguimiento de los tratamientos. Por ello, el diagnóstico continúa siendo puramente clínico, basado en la evaluación de una serie de síntomas conductuales y cognitivos, y mediante la aplicación de criterios establecidos por los sistemas internacionales de clasificación, DSM y CIE (Sistema de Clasificación Internacional de Enfermedades). Sin embargo, y a pesar de la existencia de éstos, en ocasiones el diagnóstico resulta complejo, ya que la evaluación subjetiva de los síntomas puede

derivar en una variabilidad considerable en la precisión diagnóstica.

En cuanto al tratamiento, desde hace décadas, el metilfenidato se ha consagrado como el principal fármaco empleado en los pacientes diagnosticados de Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad. Su eficacia y seguridad parecen demostradas, pero los efectos sobre determinados marcadores y estructuras que parecen ser relevantes en el trastorno aún no están claros.

El hallazgo de marcadores en sangre periférica relacionados con estas nuevas entidades (estrés oxidativo, neuroinflamación o la reactividad del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal) y su posible modificación con el tratamiento podría brindar información útil sobre la fisiopatología del Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad, proporcionar una mayor objetividad y precisión en el diagnóstico, ayudar a monitorizar y predecir la eficacia de los tratamientos y, en definitiva, permitir un enfoque más personalizado de cada paciente.

Este estudio, en el que participaron 59 pacientes diagnosticados con Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad según los criterios de la quinta edición del Manual Diagnóstico de Enfermedades, tuvo como objetivo principal evaluar los cambios inducidos por el tratamiento en el estado oxidativo/nitrosativo y en los niveles de cortisol.

El estudio se llevó a cabo entre septiembre de 2020 y mayo de 2023, consistió en un estudio prospectivo, cuasi-experimental, de seguimiento longitudinal basado en la práctica clínica diaria. Todos los sujetos del estudio fueron reclutados por el Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Clínico San Cecilio, fueron sometidos a una entrevista clínica estructurada y a un análisis de sangre y saliva antes de iniciar el tratamiento prescrito y tras tres meses del inicio de este. Todos ellos dieron su consentimiento informado por escrito.

Para ello, se utilizaron muestras de sangre periférica antes del inicio del tratamiento habitualmente prescrito en estos casos (metilfenidato) y tres meses después, con el fin de medir una serie de marcadores oxidativos e inflamatorios, así como la actividad antioxidante endógena.

De manera similar, también se recogieron muestras de saliva antes y después del tratamiento para estudiar los cambios en los niveles de cortisol, evaluados mediante la respuesta al despertar del cortisol (del inglés “Cortisol Awakening Response”, CAR). La respuesta al despertar del cortisol se ha consagrado en los últimos tiempos como la medida más apropiada para evaluar la activación del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal en relación con diferentes factores psicosociales, dejando en un segundo plano la medición aislada del cortisol.

Los resultados de nuestro estudio mostraron una mejora relacionada con el tratamiento en el perfil redox mediante la reducción de los niveles de productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP), peroxidación lipídica (LPO) y nitritos y nitratos (NOx). Asimismo, también se observó un aumento de las actividades enzimáticas de glutatión reductasa (GRd) y catalasa (CAT), ambas enzimas del sistema antioxidante endógeno. Además, el área bajo la curva (AUC) de la respuesta al despertar del cortisol aumentó significativamente, indicando una mayor reactividad del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal.

Los resultados obtenidos en este estudio apoyan aún más la hipótesis de que el estrés nitrosativo/oxidativo, la inflamación y el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal, que parecen desempeñar un papel clave en otras afecciones psiquiátricas (como el Trastorno del Espectro Autista), están efectivamente implicados en la fisiopatología de esta entidad y constituyen una base sobre la que seguir investigando para el desarrollo de biomarcadores relacionados con el TDAH.

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
I. TRASTORNO POR DÉFICIT DE ATENCIÓN E HIPERACTIVIDAD (TDAH)	3
1. Evolución histórica del Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH)	3
2. Definición actual del TDAH	4
3. Epidemiología	6
4. Etiología	8
4.1 Factores genéticos.....	9
4.2 Factores ambientales.....	10
5. Fisiopatología	11
5.1 Factores neuroanatómicos	11
5.2 Factores neurobioquímicos	12
5.3 Eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal	13
5.4 Estrés oxidativo e inflamación.....	15
6. Diagnóstico.....	15
7. Tratamiento.....	17
7.1 Tratamiento farmacológico.....	17
7.2 Tratamiento no farmacológico	19
8. Panorama actual del TDAH. Nuevos retos en su investigación.....	19
II. ESTRÉS OXIDATIVO	22
1. Concepto de radical libre (RL).....	22
2. Fuentes endógenas y exógenas de radicales libres.....	23
3. Sistemas de protección frente a radicales libres: mecanismo de defensa antioxidante	24
3.1 Primer nivel de defensa	25
3.2 Segundo nivel de defensa	27
3.3 Tercer nivel de defensa	27
4. Fisiopatología del estrés oxidativo	28
4.1 Lípidos	28
4.2 Proteínas	29
4.3 Ácidos nucleicos	29
5. Biomarcadores de estrés oxidativo.....	31
6. Estrés oxidativo y TDAH.....	32

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	36
1. Hipótesis.....	37
2. Objetivos	37
MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
1. Sujetos del estudio.....	41
2. Diseño de la investigación.....	42
3. Muestras de sangre	44
3.1 Medición de los productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP).....	44
3.2 Medición de los productos de la peroxidación lipídica (LPO).....	45
3.3 Medición de nitrito + nitrato (NOx)	45
3.4 Medición de la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRd) y catalasa (CAT).....	46
3.5 Medición de α -Klotho.....	47
4. Muestras de saliva	47
4.1 Medición del cortisol salival.....	48
5. Análisis de datos.....	49
RESULTADOS.....	51
1. Evaluación del estado oxidativo e inflamatorio en los pacientes antes y después del tratamiento.....	55
2. Evaluación del estado oxidativo e inflamatorio en función del estadio madurativo: grupos de niños prepuberales frente a puberales.....	56
3. Evaluación de los niveles de cortisol salival.....	57
DISCUSIÓN	61
CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFÍA	77
ANEXOS	107

INTRODUCCIÓN

I. TRASTORNO POR DÉFICIT DE ATENCIÓN E HIPERACTIVIDAD (TDAH)

1. Evolución histórica del Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH)

La comprensión y el concepto del trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) han evolucionado a lo largo de la historia, entre otros motivos, por los constantes cambios que ha habido en su definición y por la gran heterogeneidad de los síntomas asociados. “Defecto anormal del control moral en niños” [1], “trastorno hipercinético en la infancia” [2] o “disfunción cerebral mínima” [3] son solo algunos de los ejemplos de las definiciones que han sido empleadas desde comienzos del siglo XX.

No es hasta la década de 1980, con la publicación del Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales, DSM-III [4], cuando se acuña por primera la denominación “Trastorno por Déficit de Atención con o sin Hiperactividad”, la cual no estuvo exenta de polémica por la subdivisión generada y que, finalmente, fue revisada y modificada en la siguiente edición del manual, DSM-3-R [5], al término que utilizamos hoy en día “Trastorno por déficit de atención e hiperactividad”, TDAH.

En cuanto a la Organización Mundial de la Salud (OMS), es en el año 1992 cuando el TDAH se reconoce por primera vez como entidad clínica al ser incluido en la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10), quedando recogido en el grupo de trastornos del comportamiento y de las emociones, de comienzo en la infancia y la adolescencia, dentro del subgrupo de Trastornos Hipercinéticos [6]. Durante esta década se experimentan avances significativos en varias disciplinas relacionadas con la Genética, la Neurología, la Pedagogía y la Psicología, que contribuyeron a un mayor conocimiento del TDAH.

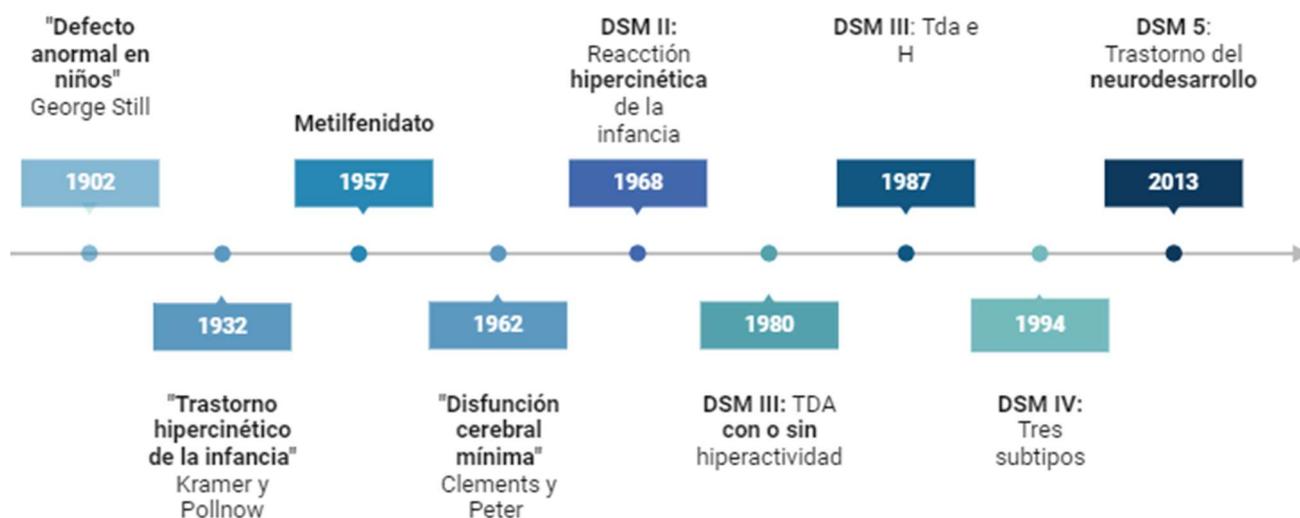


Figura 1. Evolución histórica del concepto de Trastorno por déficit de atención e hiperactividad.

Creada con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

2. Definición actual del TDAH

La definición actual del TDAH se basa en la quinta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5) [7], que fue presentado en mayo de 2013 en el Congreso Anual de la Asociación Americana de Psiquiatría (APA) en San Francisco (Estados Unidos). Esta nueva versión define el TDAH como un trastorno del neurodesarrollo cuyos síntomas principales son la inatención, la hiperactividad y la impulsividad y establece tres presentaciones diferentes en función de la sintomatología presentada durante los últimos seis meses [7]:

- **Presentación predominante con falta de atención:** Si se cumple el criterio A1, pero no se cumple el criterio A2 (hiperactividad-impulsividad).
- **Presentación predominante hiperactiva/impulsiva:** Si se cumple el criterio A2 (hiperactividad-impulsividad) y no se cumple el criterio A1 (inatención).
- **Presentación combinada:** Si se cumplen el criterio A1 (inatención) y el criterio A2 (hiperactividad-impulsividad).

Tabla 1. Criterios A1 y A2 para la clasificación de las diferentes presentaciones clínicas.

Criterio A1	Criterio A2
Patrón persistente de inatención caracterizado por presentar 6 o más de los siguientes síntomas:	Patrón persistente de hiperactividad-impulsividad caracterizado por 6 o más de los siguientes síntomas:
1. Dificultad para la atención a detalles en tareas escolares .	1. Golpear manos y pies o retorcerse en el asiento.
2. Dificultad para mantener la atención en tareas o actividades recreativas .	2. Levantarse en situaciones en que deba permanecer sentado.
3. No parecer escuchar cuando se le habla directamente.	3. Corretear en situaciones en las que no es apropiado.
4. No seguir instrucciones y no completar tareas escolares/domésticas.	4. Incapacidad de jugar o de ocuparse tranquilamente .
5. Dificultad para organizar tareas y actividades.	5. Dificultad para estar quieto en situaciones que lo requieren
6. Evitar o rechazar participar en tareas que requieran un esfuerzo mental prolongado .	6. Hablar excesivamente.
7. Extraviar objetos necesarios para tareas o actividades.	7. Dar respuestas impulsivas antes de que se completen las preguntas.
8. Distraerse con facilidad por estímulos externos .	8. Dificultad para esperar su turno
9. Olvidar hacer actividades cotidianas .	9. Interrumpir conversaciones o actividades de otros.

A diferencia del DSM-IV, donde el TDAH era considerado como un trastorno de la conducta, en esta nueva versión se clasifica dentro del capítulo de “Trastornos del neurodesarrollo”. Además de esto, el manual DSM-5 presenta otra serie de modificaciones e incorporaciones con respecto a la versión anterior [7]:

- Retraso en la edad límite de aparición de síntomas. Se establece una ampliación del período durante el cual los síntomas del TDAH pueden aparecer para establecer el diagnóstico. Anteriormente se consideraba que estos debían

manifestarse antes de los 7 años, sin embargo, con esta nueva versión la edad límite se retrasa hasta los **12 años**, ya que considera que existen síntomas relacionados con el aprendizaje que pueden ponerse de manifiesto a medida que el niño avanza durante la educación primaria.

- Incorporación del diagnóstico de TDAH en **adultos**, ya que se considera que el trastorno no se limita al niño y adolescente, sino que la patología psiquiátrica tiene una continuidad desde la infancia hasta la edad adulta.
- En adolescentes y adultos se considera suficiente el cumplimiento de **5** de los 9 criterios diagnósticos en lugar de los 6 que son necesarios para el diagnóstico en niños.
- Los anteriores subtipos de TDAH son reemplazados por “**presentaciones clínicas**”, para remarcar que los síntomas no son estáticos, y que la relevancia clínica de cada uno de ellos se modifica con el neurodesarrollo.
- Ya no existe una "exclusión mutua" en el diagnóstico entre el TDAH y el **Trastorno del Especto Autista (TEA)**. En se esta nueva versión se reconoce que ambos trastornos pueden coexistir en un mismo individuo, de tal forma que ahora pueden diagnosticarse y tratarse como comorbilidades.

3. Epidemiología

Sabemos que el TDAH es una de las patologías psiquiátricas más frecuente de la infancia [8–10]. No obstante, a pesar de su gran relevancia en términos de salud pública su prevalencia no está bien establecida [11]. El DSM-5 sitúa esta cifra entorno al 5 % en niños y al 2,5 % en adultos [7], sin embargo, los estudios epidemiológicos muestran datos inexactos sobre estos porcentajes debido sobre todo a las diferencias existentes en el tipo de muestra estudiado, los criterios diagnósticos y los instrumentos de evaluación empleados [12].

En una revisión sistemática y en un análisis de meta regresión realizados en el año 2014 donde se incluyeron 154 estudios que habían empleado criterios diagnósticos del DSM o del CIE, se concluyó que la prevalencia mundial del TDAH en menores de 18 años era aproximadamente del 5 % [10].

En cuanto a la prevalencia en España, un metaanálisis realizado en 2012, donde se revisaron 14 estudios epidemiológicos observacionales, concluyó que la prevalencia del TDAH en niños y adolescentes españoles era del 6,8 % [11].

En lo que respecta a la distribución por sexos, la mayoría de los estudios científicos indican una mayor prevalencia en varones [13]. Así lo manifiesta también el DSM-5, donde se establece que el TDAH es más frecuente en hombres que en mujeres, con una proporción de aproximadamente 2:1 en niños y 1,6:1 en adultos [7]. En cualquier caso, esta diferencia, que suele ser más acusada en niños y adolescentes, tiende a disminuir en la edad adulta.

Por otro lado, el TDAH es un ejemplo típico de trastorno que tiene una presentación clínica diferente según el género [7]. Por lo general, las niñas tienden a manifestar predominantemente rasgos de inatención, mientras que los síntomas “más llamativos”, relacionados con la hiperactividad e impulsividad son más característicos en niños y adolescentes varones. Esto posiblemente pueda llevar a diagnosticar más precozmente los casos de los niños en comparación con las niñas [7,14–16]. Posteriormente, con el neurodesarrollo, se hace predominante la presentación inatenta en ambos sexos.

En cuanto a las diferentes presentaciones, la literatura científica establece que la presentación de tipo combinado es la más frecuente, seguida de la presentación

Introducción

predominante con falta de atención y seguida, a su vez, de la presentación predominante hiperactiva/impulsiva [17,18].

En lo que concierne a su evolución, y aunque durante un tiempo se creyó que el TDAH se limitaba a la infancia y a la adolescencia, en la actualidad se estima que hasta dos tercios de los niños afectos continuarán con sintomatología parcial en la edad **adulta** [19–21], lo que se traduce en una prevalencia entorno al 2-3 % de la población adulta [7].

El TDAH afecta de forma significativa a la adaptación académica, familiar, social y laboral de las personas que lo padecen. Por ello es considerado por muchos un importante problema de salud pública, por el impacto a corto y largo plazo para el individuo y la sociedad, tanto en la esfera social como económica [22–26].

4. Etiología

Aunque en las últimas décadas ha habido importantes avances, seguimos sin conocer con precisión la etiología y fisiopatología del TDAH. Parece tratarse de una entidad **multifactorial**, donde se describe un importante papel de la herencia genética y de la interacción medioambiental, neurobiológica y neurotransmisora. Sin embargo, los mecanismos neurobiológicos exactos que subyacen al trastorno siguen sin conocerse [27].

Los factores etiológicos se han dividido en dos grandes grupos: factores **genéticos**, que abarcan una serie de genes candidatos vinculados al TDAH, y los factores **ambientales** que intervienen en su desarrollo. Sin embargo, cabe destacar que, aunque estos se expliquen por separado, muy probablemente sea la **interacción** gen-ambiente el principal mecanismo fisiopatológico en el desarrollo del TDAH [28].

4.1 Factores genéticos

Existen muchas líneas de investigación que justifican la condición **hereditaria** del TDAH [29]. Estudios realizados en familias con hijos adoptivos, gemelos monocigóticos y dicigóticos han estimado una heredabilidad media del TDAH del 76 % y señalan que los familiares de individuos diagnosticados de TDAH tienen un riesgo significativamente mayor de padecer dicho trastorno [30].

Con el desarrollo de la genética molecular, se han identificado varios genes relacionados con las vías de señalización de neurotransmisores (dopamina, noradrenalina y serotonina) como genes candidatos implicados en la susceptibilidad del TDAH [31].

- **Genes del sistema dopaminérgico**

La dopamina es una de las dianas terapéuticas del metilfenidato [31], el principal fármaco empleado en esta patología. Algunos de los genes más estudiados y con una relación aparentemente más sólida con el TDAH son los genes SLC6A3/DAT1, que codifican para el transportador de dopamina, y el gen DRD4, que codifica para el receptor de dopamina D4 [30,32–35].

- **Genes del sistema noradrenérgico**

La noradrenalina también actúa como diana farmacológica del metilfenidato y, sobre todo, de la atomoxetina y de la guanfacina, otros fármacos de uso habitual en esta entidad [36]. Además, también ejerce un papel modulador en determinadas funciones corticales como la atención, la vigilancia y las funciones ejecutivas [37].

Los principales genes estudiados son el gen NET (SLC6A2), que codifica el transportador de norepinefrina (NET), y el gen ADRA2A, que codifica el receptor adrenérgico α 2A [35].

▪ Genes del sistema serotoninérgico

El sistema serotoninérgico se considera un firme candidato a contribuir a la etiología del TDAH por su implicación tanto en las conductas agresivas e impulsivas, como por su papel en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) [31]. Destacan los genes HTR1B y SLC6A4 [30,35,38,39].

En cualquier caso, el conocimiento actual parece indicar que no existe ningún gen necesario o suficiente para la aparición del trastorno, sino que se postula una herencia poligénica multifactorial [40].

4.2 Factores ambientales

Los factores hereditarios no son la única explicación del TDAH. El ambiente también constituye una fuerte influencia en la entidad del TDAH ya que éste puede interactuar con la herencia genética, modular su expresión y resultar determinante en el desarrollo del trastorno y sus síntomas [41].

Se estima que entre el 10 y el 40 % de los casos de TDAH estén relacionados con los factores ambientales [42]. Algunos de los más estudiados son la prematuridad extrema, el bajo peso al nacer, el síndrome de alcoholismo fetal, la exposición a metales pesados, la preeclampsia y la meningitis vírica [43–45]. Estos casos se suelen describir como TDAH secundario, para diferenciarlos del primario o genético.

El análisis independiente de cada uno de estos factores de riesgo pone en evidencia que, si el hecho de tener un progenitor con diagnóstico de TDAH multiplica por 7,4 el riesgo de padecerlo, el bajo peso al nacer lo multiplica por 3,1 y el consumo materno de alcohol y de tabaco durante el embarazo lo multiplica por 2,2 en ambos casos [46,47].

5. Fisiopatología

Existe evidencia sólida de que los factores neuroanatómicos y neuroquímicos, así como las alteraciones en determinados sistemas biológicos constituyen una base sobre la que se asienta el desarrollo del TDAH.

5.1 Factores neuroanatómicos

Las técnicas de imagen como la tomografía computarizada por emisión de positrones (PET) o las imágenes por resonancia magnética (IRM) han permitido estudiar de forma no invasiva a pacientes y sujetos sanos y así poder realizar comparaciones de las diferentes estructuras cerebrales. Algunas de las conclusiones observadas son las siguientes [48]:

- **Reducción del volumen cerebral:** Los pacientes con TDAH presentan, en comparación con los controles, un volumen cerebral entorno al 3-5 % más pequeño, siendo esta reducción más acusada en regiones prefrontales [49,50].
- **Diferencias en el grosor cortical:** El grosor de la corteza cerebral parece ser menor en ciertas áreas en individuos con TDAH. Esto puede estar relacionado con problemas en la regulación de la atención y la inhibición de impulsos [51].
- **Maduración más lenta de lo normal:** Parece existir un enlentecimiento del proceso de maduración funcional en determinadas zonas intercomunicadas por redes neuronales, como la corteza prefrontal o el cerebelo, lo que tiene como consecuencia una actividad neuronal reducida en zonas responsables de funciones como la atención, el pensamiento o el comportamiento [52,53].
- **Alteración de circuitos neuronales:** Parece existir una conectividad alterada en algunas redes neuronales relacionadas con la motivación, la atención y el control inhibitorio. Entre estas redes se encuentran el circuito de activación por defecto

(DMN, Default Mode Network) y los circuitos mesocorticolímbicos, donde la dopamina es el neurotransmisor predominante [54,55].

5.2 Factores neurobioquímicos

El papel modulador que se atribuye a dopamina y noradrenalina en diversas funciones corticales (como la atención, la vigilancia, las funciones ejecutivas y el comportamiento motor), junto a su distribución anatómica, coincidente con aquellas regiones que han demostrado estar relacionadas con el TDAH, así como la efectividad terapéutica de los fármacos psicoestimulantes, han puesto de manifiesto el papel que estos neurotransmisiones desempeñan en este trastorno.

En el TDAH existe una desregulación en los neurotransmisores que explicaría la aparición de los síntomas nucleares del trastorno [56]. Los estudios realizados con modelos animales sugieren la participación de los sistemas dopaminérgicos y noradrenérgicos y también, aunque de forma menos consistente, de los sistemas serotoninérgicos en la fisiopatología del TDAH [57–59]. De hecho, la alteración del sistema de neurotransmisión catecolaminérgico es considerado por algunos autores como el principal factor fisiopatológico del TDAH [60,61].

También cabe mencionar el papel del glutamato y su posible relación con el TDAH, por ser el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central y ejercer un papel clave en algunas tareas relacionadas con la memoria o el aprendizaje [62].

5.3 Eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal

A pesar del amplio reconocimiento de las teorías catecolaminérgicas, en los últimos tiempos ha habido una mayor investigación en otros mecanismos biológicos que también pudieran estar asociados con el TDAH. Así pues, cada vez existe más bibliografía

que sugiere que varios sistemas biológicos relacionados con el estrés, como el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal (HHS), desempeñan un papel crucial en este trastorno, así como en otras enfermedades del neurodesarrollo como el TEA [63].

El eje HHS es un sistema formado por la hormona liberadora corticotropina (CRH) en el hipotálamo, la hormona adrenocorticotropa hipofisaria (ACTH) y el **cortisol** de la glándula suprarrenal [64]. El eje HHS participa en la regulación de los neurotransmisores y es el principal sistema encargado de la respuesta al estrés. Su activación tiene como punto final la liberación del glucocorticoide cortisol [65].

El conocimiento que se tiene sobre la relación entre el eje HHS y el TDAH no es un aspecto estrictamente novedoso. Ya en el año 1993, en un estudio realizado en 30 niños diagnosticados de TDAH en el Hospital Universitario de Fukushima, se observó la existencia de un ritmo anormal de secreción de cortisol y se señaló que el eje HHS podría verse alterado en algunos tipos de TDAH debido a un trastorno en la regulación del metabolismo de la serotonina [66].

Posteriormente, varias investigaciones han establecido que los pacientes con TDAH presentan una baja reactividad del eje HHS cuando se exponen a situaciones de estrés [67]. La existencia de una relación entre el TDAH y la regulación a la baja del eje HHS encajaría con aquellas teorías que sugieren que el TDAH se produce como consecuencia de la falta de excitación [68,69].

Se ha argumentado que la inhibición deficiente de la respuesta, ligada a la función hipoactiva del eje HHS es una característica central en el TDAH. Sin embargo, los estudios que miden la función HHS en niños con diagnóstico clínico de TDAH han obtenido resultados inconsistentes: algunos autores encuentran una asociación entre los

Introducción

niveles bajos de cortisol y los síntomas del TDAH [70–72], mientras que otros, no han logrado demostrar dicha relación [73,74].

Un aspecto fundamental que podría aclarar el porqué de la variedad de los resultados es que el cortisol, además de presentar un ritmo circadiano (caracterizado por niveles elevados al despertar y una disminución gradual a lo largo del día hasta alcanzar su mínima concentración a la medianoche [75], también experimenta un pico agudo en los primeros momentos del despertar. Esto se conoce como **“Respuesta al Despertar del Cortisol”** (Cortisol Awakening Response, CAR).

El CAR es un fenómeno dinámico desencadenado por el propio proceso del despertar matutino. Consiste en un aumento del 50-75 % en los niveles de cortisol dentro de los 30-45 minutos después del despertar [76–80] y se observa aproximadamente en el 75 % de los individuos sanos. Desviaciones de un patrón CAR típico o normal orientan hacia procesos neuroendocrinos desadaptativos [78].

Es importante destacar que el CAR no es una mera continuación del aumento de cortisol previo al despertar, sino que comprende una respuesta superpuesta al despertar [81]. Combina aspectos tanto de reactividad (respuesta al despertar) como de regulación circadiana [82]. Según indican diversos estudios, el CAR se ha convertido actualmente en la medida más apropiada para evaluar la activación del eje HHS en relación con diferentes factores psicosociales, dejando en un segundo plano la medición aislada del cortisol y que, hasta no hace mucho, era la empleada en la mayoría de los estudios realizados [76,83]. Asimismo, la variedad de los resultados también podría deberse a la gran variedad de trastornos comórbidos, los tamaño de la muestra y las técnicas de medición hormonal [84].

5.4 Estrés oxidativo e inflamación

En los últimos años ha habido un creciente interés en cómo el estrés oxidativo/nitrosativo y la neuroinflamación podrían contribuir en la fisiopatología del TDAH. Este apartado se desarrollará con mayor profundidad más adelante.

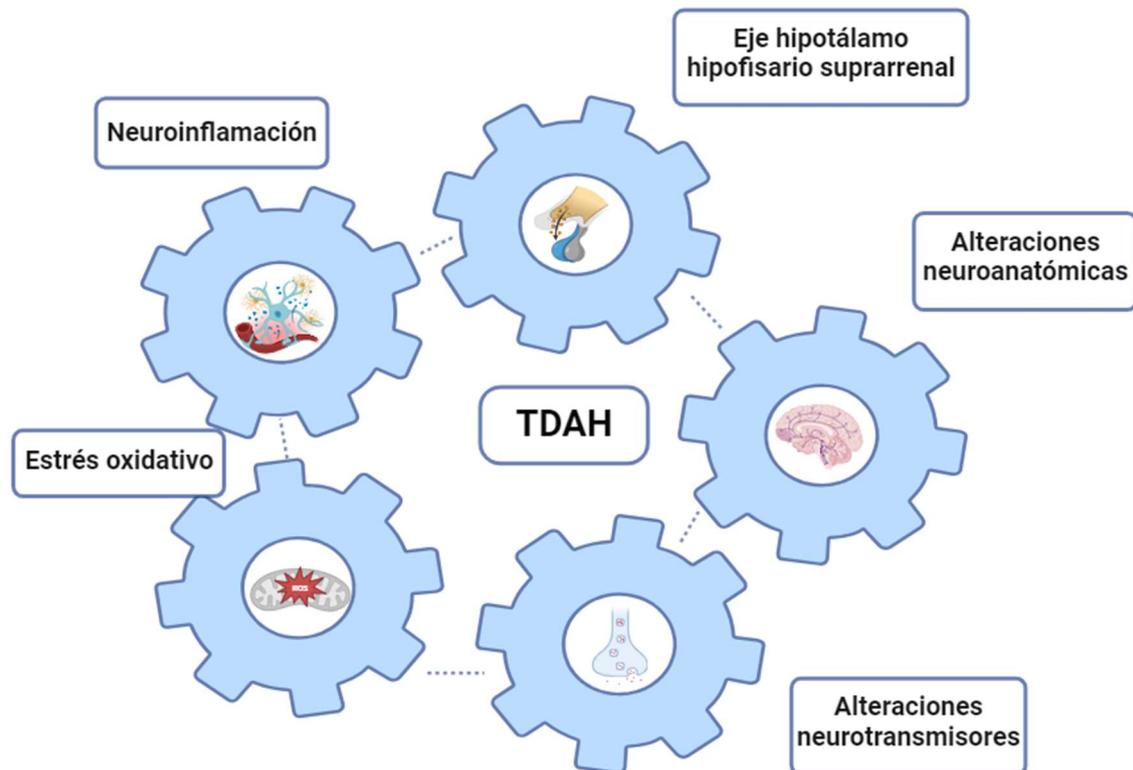


Figura 2: Contribución de los diferentes factores fisiopatológicos en el desarrollo del TDAH. Creada con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

6. Diagnóstico

El diagnóstico del TDAH continúa siendo puramente **clínico**, ya que no existe ningún marcador o prueba con la suficiente sensibilidad y especificidad como para ser considerada diagnóstica por sí misma [85].

En la esfera de la patología psiquiátrica existen dos sistemas de clasificación reconocidos por la comunidad científica: el “Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales” (DSM), desarrollado por la Asociación Americana de Psiquiatría (APA), y la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE), elaborado por la

Introducción

Organización Mundial de la Salud (OMS). Las últimas versiones de estas clasificaciones son el DSM-5 [7], publicado en el año 2013, y la CIE-11 [86], que entró en vigor en enero del 2022.

En lo que respecta al TDAH, pese a que persisten algunas diferencias, ambos sistemas de clasificación buscan seguir una senda común y converger en una misma dirección [87]. Tanto DSM-5 como el CIE 11 dictaminan que, para llegar al diagnóstico, los síntomas deben persistir durante al menos seis meses y manifestarse antes de los 12 años. Sin embargo, mientras que el DSM-5 considera que para un diagnóstico positivo de TDAH el paciente debe presentar un mínimo de 6 de los 9 síntomas para cada uno de los subtipos, el CIE 11 no considera que deba existir un mínimo de síntomas. Además, estos síntomas deben estar presentes y ser cuantificados en varios entornos diferentes (hogar, escuela etc) [7,86,88].

En el diagnóstico diferencial se deben descartar otras patologías y trastornos comórbidos. Para ello es necesario llevar a cabo una entrevista clínica estructurada con el paciente y sus progenitores, una exploración física, y en ocasiones una valoración neuropsicológica. También se suele recurrir a cuestionarios y escalas de evaluación de los síntomas que son cumplimentados tanto por los padres/tutores como por los profesores. Las escalas de evaluación son herramientas empleadas tanto para el diagnóstico clínico del trastorno como para la distinción de los subtipos y están diseñadas sobre la base de los criterios del Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales.

Algunas de las escalas más empleadas son la Escala de Conners, que se usa para medir los principales rasgos del TDAH y de los trastornos de conducta que puedan coexistir [89]; la escala BRIEF2 (Behavior Rating Inventory of Executive Function), que se emplea para evaluar las funciones ejecutivas en niños y jóvenes de entre 5 y 18 años, a través de

un listado de conductas relacionadas con el control de las respuestas emocionales, la memoria de trabajo o la planificación, entre otras [90]; y la escala Vanderbilt, que se emplea para la evaluación psicométrica y permite, además de evaluar los síntomas nucleares del TDAH, el despistaje de otras comorbilidades asociadas [91].

7. Tratamiento

Debido a la heterogeneidad de los síntomas y la variabilidad existente tanto en la etiología como en el diagnóstico, el tratamiento del TDAH ha de ser individualizado y multimodal, teniendo en cuenta las características del paciente y su entorno familiar. Éste debe abarcar tanto el tratamiento farmacológico propiamente dicho, como el tratamiento conductual y psicoeducativo [92].

En su aplicación deben participar padres, profesores y los diferentes profesionales con formación en este trastorno: pediatras, psiquiatras, psicólogos y pedagogos, entre otros [93]. El objetivo de esta terapia combinada es reducir los síntomas nucleares del TDAH, facilitar estrategias y herramientas para su control y mejorar el rendimiento académico, logrando así una mayor calidad de vida [94]. Por estos motivos, la estrategia multimodal ha demostrado ser la alternativa más eficaz en el tratamiento del TDAH [95].

7.1 *Tratamiento farmacológico*

El tratamiento farmacológico ha demostrado una gran eficacia en la reducción de la sintomatología y en el aumento de la atención, de hecho, con los tratamientos disponibles en la actualidad, se consigue mejorar la sintomatología del 80-90 % de los pacientes [94].

Los principales fármacos empleados para el tratamiento del TDAH pueden dividirse en dos grandes grupos: **psicoestimulantes** (derivados del metilfenidato y las

Introducción

anfetaminas) y **no estimulantes** (atomoxetina, guanfacina y clonidina, aunque esta última se usa poco por sus mayores efectos secundarios) [96].

En cuanto a los **fármacos psicoestimulantes**, estos se conocen también como fármacos simpaticomiméticos por su similitud estructural con las catecolaminas. El mecanismo de acción del **metilfenidato** consiste en inhibir la recaptación de dopamina y noradrenalina en la unión sináptica, con la consecuente elevación de ambos neurotransmisores a nivel central. Las **anfetaminas**, además de utilizar este mecanismo, aumentan también la liberación de dopamina al espacio sináptico [94,96,97]. La elevación de dopamina en áreas basales (núcleos accumbens y estriados) y en mucha menor medida en el córtex prefrontal produce una mejora de los síntomas motores (relacionados con la hiperactividad e impulsividad), de la atención y de la memoria, respectivamente [98,99].

Los simpaticomiméticos son los medicamentos más empleados en el tratamiento del TDAH. En nuestro país, disponemos de dos fármacos aprobados para el tratamiento del TDAH [97]:

- **Metilfenidato (MPH):** Desde su comercialización en los años 50, es considerado el fármaco de primera línea en el tratamiento del TDAH. Mejora la atención y concentración, potencia la memoria a corto plazo, reduce los síntomas de hiperactividad e impulsividad y mejora el rendimiento escolar y el comportamiento social [100].
- **Lisdexanfetamina (LDX):** Es una dextroanfetamina aprobada en Europa en 2013 en niños mayores de seis años como terapia de segunda línea al Metilfenidato.

Aunque los fármacos psicoestimulantes son seguros y eficaces, un 10-30 % de los pacientes con TDAH no responden a ellos o no toleran algunos de sus efectos secundarios

(insomnio, disminución del apetito, cefalea...). Es entonces cuando se recurre a los **fármacos no psicoestimulantes** [98]. Entre ellos cabe destacar la **atomoxetina**, cuyo principal mecanismo de acción es inhibir de forma muy selectiva el transportador presináptico de NA, inhibiendo así su recaptación a nivel frontal [36] y la **guanfacina** y **clonidina**, que son agonistas del receptor de NA y actúan estimulando los receptores postsinápticos [96]. También encontramos en este grupo **antidepresivos** como el bupropión, los antidepresivos tricíclicos, los inhibidores de la aminooxidasa y la viloxazina, un modulador de la actividad serotoninérgica generalmente prescrito como antidepresivo y aprobado por la FDA para el tratamiento del TDAH [94,101].

7.2 Tratamiento no farmacológico

El tratamiento farmacológico no debe ser el único abordaje de este trastorno. Entre las principales medidas no farmacológicas podemos destacar la Terapia Cognitivo-Conductual (que ayuda a desarrollar habilidades de autocontrol, organización, planificación y gestión del tiempo), los tratamientos de modificación de la conducta, la terapia psicológica y el ejercicio físico, entre otros [102,103].

8. Panorama actual del TDAH. Nuevos retos en su investigación

El TDAH no es una entidad de reciente aparición. En 1902, el pediatra británico George Still, hizo la primera definición del trastorno en un artículo publicado en la revista *The Lancet*, al describir a un grupo de niños que tenían problemas para mantener la atención y controlar su conducta, cuadro clínico que hoy encajaríamos en la definición del TDAH [1]. Desde entonces, tanto el término como la propia definición han evolucionado mucho hasta llegar a la actual descripción del trastorno.

Según el manual DSM-5, el TDAH es un trastorno del neurodesarrollo con una altísima prevalencia a nivel mundial (5 %) [7]. Sus síntomas nucleares

Introducción

y su elevada comorbilidad hacen que aquellos que lo padecen presenten dificultades para el desarrollo pleno de su vida académica, familiar y social.

Aunque no podemos considerar que se hayan invertido pocos recursos en su estudio [104], la realidad es que, a pesar de varias décadas de investigación, la etiología y los mecanismos fisiopatológicos del TDAH siguen siendo prácticamente desconocidos. Esto dificulta el desarrollo de herramientas que utilicen variables cuantificables y que facilitarían considerablemente el proceso diagnóstico, el pronóstico y el seguimiento de los tratamientos.

El diagnóstico del TDAH es clínico y se basa en la evaluación subjetiva de una serie de síntomas conductuales y cognitivos, mediante la aplicación de los criterios establecidos por los sistemas internacionales de clasificación diagnósticos DSM y CIE [93]. Sin embargo, y a pesar de la existencia de éstos, en ocasiones el diagnóstico resulta complejo, ya que la evaluación subjetiva de los síntomas puede derivar en una variabilidad considerable en la precisión diagnóstica.

De hecho, algunos especialistas consideran que las pautas establecidas por la última versión del DSM-5 son tan amplias que, en ocasiones, resulta complejo diferenciar entre los comportamientos normales y los patológicos, al no existir unas fronteras claramente definidas entre ambos [105,106]. La falta de marcadores bioquímicos específicos contribuye a esta variabilidad y dificulta la diferenciación entre el TDAH y otras condiciones psiquiátricas que presentan síntomas similares.

Además, la ausencia de biomarcadores que nos permitan evaluar la respuesta al tratamiento y predecir el curso clínico del trastorno, hacen que el seguimiento del TDAH se base únicamente en el relato de los pacientes y sus familiares y en la observación de los especialistas, lo que en ocasiones puede resultar subjetivo y sesgado.

Por ello, uno de los principales retos que se nos presenta en la actualidad es identificar marcadores bioquímicos que nos permitan comprender los mecanismos fisiopatológicos que subyacen al trastorno. Las nuevas líneas de investigación parecen señalar que, además de las teorías catecolaminérgicas, y debido al carácter multifactorial del TDAH, el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal como estructura responsable de la respuesta a los estímulos estresantes, así como el estrés oxidativo y la inflamación podrían desempeñar un papel crucial en la fisiopatología de esta entidad.

El metilfenidato, fármaco de primera línea para el tratamiento del TDAH, ejerce sus efectos terapéuticos a través de la modificación de neurotransmisores. Además, múltiples estudios han investigado su efecto en la modificación de otros parámetros como los niveles séricos de S100B [107], los metabolitos del triptófano [108] o las concentraciones de neuroesteroides como la alopregnanolona y la DHEA-s [109]. Sin embargo, seguimos sin conocer con precisión los efectos que éste podría tener sobre otros sistemas biológicos [110], como el eje HHS o sobre el estrés oxidativo e inflamación, que como indicábamos anteriormente, podrían estar involucrados en la enfermedad.

El hallazgo de marcadores en sangre periférica relacionados con estas entidades y su posible modificación con el tratamiento podría proporcionar información útil sobre la fisiopatología del TDAH, proporcionar una mayor objetividad y precisión en el diagnóstico, ayudar a monitorizar y predecir la eficacia de los tratamientos y permitir, en definitiva, un enfoque más personalizado de cada paciente.

II. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es un estado caracterizado por un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad del sistema antioxidante endógeno para neutralizarlos, generando así un importante daño a nivel celular, tisular y sistémico [111].

El estrés oxidativo se ha relacionado con la fisiopatología de más de 100 enfermedades, no solo del neurodesarrollo, sino también de otras entidades diferentes como el cáncer, la EPOC o la diabetes mellitus [111–113].

1. Concepto de radical libre (RL)

Los radicales libres (RL) son especies químicas que presentan uno o más electrones desapareados en su orbital más externo, lo que los convierte en moléculas muy inestables y extraordinariamente reactivas [114]. Es por ello por lo que tienden a reaccionar con otras moléculas cercanas para completar este orbital incompleto, desestabilizando con ello la configuración electrónica de las moléculas con las que reaccionan, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas e iniciando así reacciones en cadena [115].

Existen una gran cantidad de radicales libres, pero los más dañinos son aquellos que se originan a partir del oxígeno y del nitrógeno. Se conocen como “especies reactivas de oxígeno” (Reactive Oxygen Species, ROS) y “especies reactivas de nitrógeno” (Reactive Nitrosative Species, RNS)”.

Entre ellos destacan fundamentalmente: el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), que es el radical libre más agresivo, al que se atribuye la mayoría de los efectos negativos del estrés oxidativo, ya que es capaz de reaccionar de manera inespecífica con cualquier molécula próxima a sí misma [116]; el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$), que aunque es poco reactivo es potencialmente tóxico [117]; el radical hidropéroxilo (HOO^{\bullet}); y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que, aunque no es un radical libre como tal, en presencia de catalizadores

metálicos como el hierro o el cobre, da lugar a la formación del radical OH^\bullet mediante la reacción de Fenton [117].

También destacan el radical dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet) y el radical óxido nítrico (NO^\bullet), que reacciona con el anión $\text{O}_2^{\bullet-}$ y produce el anión peroxinitrito (ONOO^-), un oxidante muy potente que puede producir a su vez OH^\bullet [118]. En la **figura 3** se muestra el proceso de formación de algunas de estas especies.

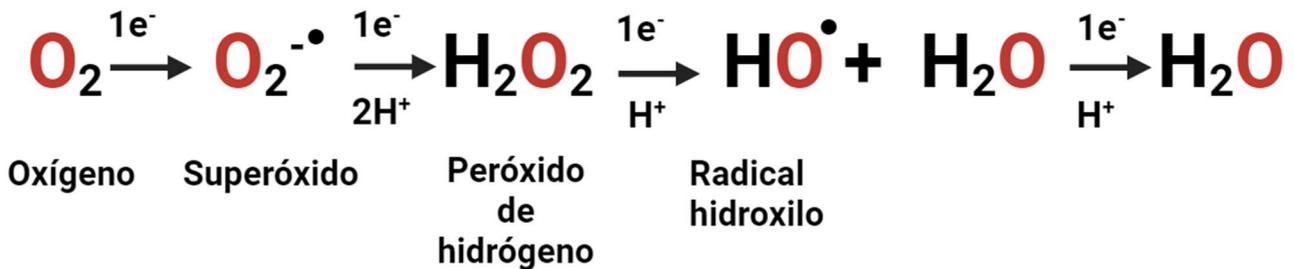


Figura 3. Esquema de formación del anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.

2. Fuentes endógenas y exógenas de radicales libres

Los radicales libres proceden de fuentes endógenas y exógenas. En cuanto a las **fuentes endógenas**, la formación de radicales libres en el organismo es inevitable, ya que se producen de manera constante en todos los órganos y tejidos como subproductos de procesos fisiológicos normales, como la respiración celular aeróbica [119–121]; las cascadas de señalización celular [121]; la actividad de sistemas enzimáticos como el citocromo P450, NADPH oxidasas y xantina oxidasa [121]; los procesos de fagocitosis llevados a cabo por los neutrófilos, monocitos y macrófagos [122]; y la muerte celular programada (apoptosis) [121,123].

Además de las fuentes endógenas, existen múltiples desencadenantes externos que actúan como **fuentes exógenas** de radicales libres. Estos provienen principalmente de las radiaciones ionizantes y no ionizantes; la contaminación del aire; el tabaquismo; el consumo de alcohol y drogas; la dieta (aditivos químicos y pesticidas, así como el

consumo elevado de carnes rojas) y la exposición a algunos fármacos y agentes antineoplásicos como la ciclosporina, bleomicina, daunorrubicina, doxorubicina y cisplatino) [124,125].

3. Sistemas de protección frente a radicales libres: mecanismo de defensa antioxidante

La formación de radicales libres en nuestro organismo es inherente al propio metabolismo aeróbico celular y a otras reacciones celulares esenciales para la vida. Sin embargo, a pesar de su capacidad para ocasionar daños celulares, en condiciones normales el daño oxidativo que realmente generan es mínimo, ya que su formación está estrictamente regulada por un efectivo sistema antioxidante [126].

Los sistemas antioxidantes son moléculas “electrónicamente estables” que reaccionan con los radicales libres para cederles un electrón, neutralizarlos y disminuir así el potencial tóxico de éstos al finalizar las reacciones en cadena que producen. Los antioxidantes pueden ser enzimáticos o no enzimáticos y pueden tener un origen endógeno u exógeno.

Los sistemas de defensa antioxidante se dividen en tres niveles en función de su mecanismo de acción: prevención, eliminación y reparación de daños inducidos por radicales libres [127].

3.1 Primer nivel de defensa

Representa la primera línea de defensa frente al estrés oxidativo. Su mecanismo de acción consiste en **prevenir** la formación de radicales libres mediante su transformación en moléculas menos perjudiciales para el entorno celular. En este grupo encontramos las enzimas superóxido la dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRd) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Esta categoría también incluye a transferrina y ceruloplasmina, que tienen

como función quelar el hierro y cobre para disminuir su disponibilidad en la formación de radicales libres [127].

- **Superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1)**

Es considerada como la primera línea de defensa enzimática que presenta la célula para hacer frente a la producción del radical $O_2^{\cdot-}$. La SOD cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ con la consiguiente formación de peróxido de hidrógeno y oxígeno (1). Su mecanismo de acción se acopla con el de las enzimas CAT o GPx para evitar el acúmulo de H_2O_2 [128].



En función de su localización y del metal empleado como cofactor, se distinguen tres isoformas: la superóxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD) que es intramitocondrial; la cobre-zinc superóxido dismutasa (CuZn-SOD) que es citoplasmática; y la superóxido dismutasa extracelular (Ec-SOD) que se encuentra en el espacio extracelular [129].

- **Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6)**

La catalasa es una enzima antioxidante compuesta por 4 subunidades, que desarrolla aproximadamente el 80 % de su actividad en los peroxisomas y el 20 % en el citosol. No está presente en la mitocondria. Cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua (2) [130].



- **Glutatión peroxidasa (GPX, EC 1.11.1.9)**

La GPx es una enzima tetramérica que contiene en cada una de sus cuatro subunidades un residuo de selenio-cisteína, esencial para el desarrollo de su actividad

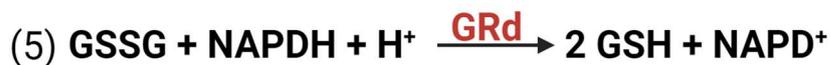
[131]. Se encuentra mayoritariamente en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial.

Al igual que la enzima CAT, cataliza la reacción de transformación peróxido de hidrógeno a agua (3). Asimismo, la enzima GPx también cataliza la descomposición de los hidroxiperóxidos orgánicos a alcoholes estables y agua (4). Ambas reacciones se llevan a cabo a expensas de glutatión reducido (GSH), que se convierte en glutatión oxidado (GSSG) [132].



- **Glutation reductasa (GRd, EC 1.8.1.7)**

La enzima GRd previene el estrés oxidativo al mantener adecuadamente el ratio GSSG/GSH. El acúmulo de GSSG en la célula, como producto de reacciones llevadas a cabo por otras enzimas, es reciclado a su forma reducida por la enzima glutatión reductasa (5), con el fin de que pueda ser reutilizado como sustrato en reacciones antioxidantes esenciales, como la catalizada por la GPx [133].



- **Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49)**

Esta enzima cataliza la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato, produciendo así el NADPH necesario para la actividad de la GRd. Es, por tanto, una enzima fundamental en los sistemas de defensa antioxidante al mantener el pool de glutatión reducido.

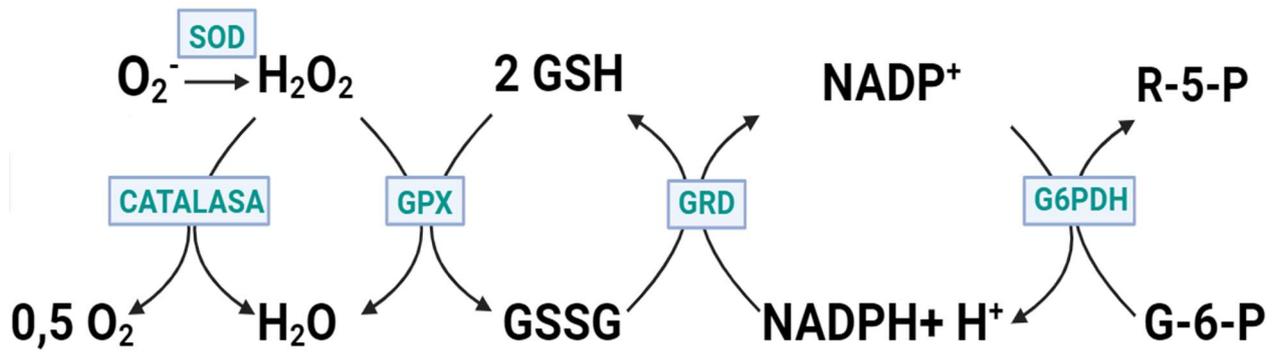


Figura 4: Relación de las enzimas del sistema antioxidante endógeno. Creada con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

3.2 Segundo nivel de defensa

Su mecanismo de acción consiste en **eliminar** los radicales libres ya formados mediante su neutralización, con el fin de impedir el inicio y/o propagación de las reacciones en cadena. En este grupo destaca fundamentalmente la melatonina, por su capacidad, directa e indirecta, para eliminar y neutralizar radicales libres a cualquier nivel celular, gracias a su elevada capacidad de difusión y lipofilia [128]. Otras moléculas antioxidantes no enzimáticas son la vitamina E y vitamina C, la albúmina, la bilirrubina, y el ácido úrico [127].

3.3 Tercer nivel de defensa

Este nivel involucra respuestas adaptativas y de **reparación** celular ante un daño oxidativo que ya está instaurado. Engloba a un conjunto de enzimas que reparan los daños causados por los radicales libres y eliminan proteínas y otras moléculas oxidadas con el fin de evitar su acúmulo [127]. Por ejemplo, la enzima 8-oxoguanina-glicosilasa 1, se encarga de evitar la acumulación del metabolito 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG), uno de los productos tóxicos resultantes de la oxidación de la base nitrogenada guanina [134].

4. Fisiopatología del estrés oxidativo

Los mecanismos antioxidantes no poseen una eficacia absoluta. Por ello, cuando se produce un **desequilibrio** entre las especies oxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, el resultado es la aparición del daño oxidativo, que constituye la base sobre la que descansa la definición del estrés oxidativo y su implicación con diversas enfermedades [135].

Debido a su elevada reactividad, las ROS/RNS reaccionan con casi cualquier molécula (especialmente sobre los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos), alterando su integridad estructural y modulando su función biológica [136].

4.1 Lípidos

Los lípidos son, junto a las proteínas, los principales componentes de las membranas celulares. Son las biomoléculas más susceptibles al proceso de oxidación, que ocurre principalmente en los ácidos grasos poliinsaturados presentes en dichas membranas [136]. De hecho, la membrana plasmática es la primera estructura celular que se ve afectada en situaciones de estrés oxidativo, lo que conlleva a una modificación de su estructura, fluidez y permeabilidad y, por tanto, una alteración en su correcta funcionalidad [137,138].

La peroxidación lipídica consiste en una reacción en cadena que incluye las etapas de inicio, propagación y terminación [139]. Se inicia por el ataque de radicales hidroxilo sobre los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana plasmática, lo que conduce a la formación de isoprostanos y aldehídos reactivos, como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (HNE) [140], que a su vez pueden interaccionar y dañar diferentes estructuras proteicas y al ADN [141].

Tanto los niveles de MDA como los de HNE reflejan con precisión el estrés oxidativo, lo que los convierte en marcadores útiles de la peroxidación lipídica, y por tanto, del estrés oxidativo [142,143].

4.2 Proteínas

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas son susceptibles de ser atacados por los radicales libres, si bien metionina y cisteína son los más fácilmente oxidables [136]. La oxidación puede producirse por el ataque directo de los radicales libres, en especial el radical OH° por ser el más reactivo, o bien ser atacadas por los productos generados en los procesos de peroxidación lipídica [139].

El fenómeno de oxidación proteica desencadena una serie de transformaciones complejas, entre las que destacan fundamentalmente la fragmentación de cadenas polipeptídicas; modificaciones y entrecruzamientos de las cadenas laterales de aminoácidos; variaciones en la hidrofobicidad de la molécula; cambios en la conformación estructural; aumento en la susceptibilidad a la acción de enzimas proteolíticas; y la formación de nuevos grupos reactivos como los grupos carbonilos e hidroperóxido [144]. Todos estos cambios van a ocasionar graves alteraciones en la función biológica de dichas proteínas.

4.3 Ácidos nucleicos

Tanto el ácido desoxirribonucleico (ADN) como el ácido ribonucleico (ARN) son altamente susceptibles al daño oxidativo [117,145].

La oxidación de las bases nitrogenadas es la forma más habitual de daño oxidativo al ADN, mediante el ataque directo de radicales libres sobre sus bases nitrogenadas, siendo la guanina la más susceptible de todas ellas [135]. La unión del radical OH a la posición C8 de la guanina, da lugar a la formación de la molécula 8-oxo-dG (8-oxo-2'-

Introducción

desoxiguanosina), que se empareja con la adenina en lugar de con la citosina y genera mutaciones de transversión tras la replicación [134].

Los aldehídos endógenos producidos durante el proceso de peroxidación lipídica (MDA, HNE) también pueden generar mutaciones en el ADN al formar aductos exocíclicos con la doble hélice [146].

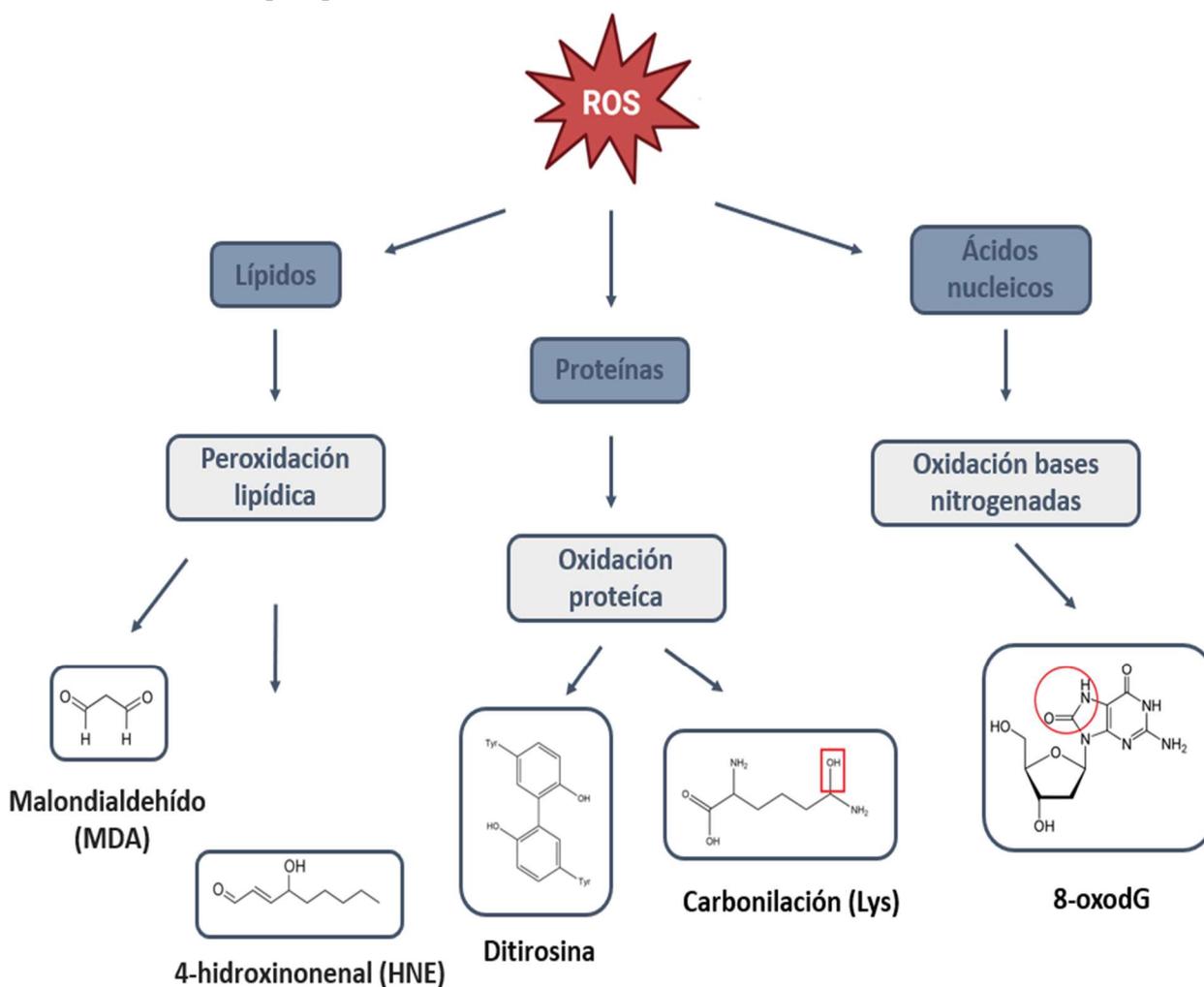


Figura 5. Principales modificaciones de las ROS sobre diferentes biomoléculas. Creada con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

5. Biomarcadores de estrés oxidativo

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido como biomarcador a cualquier sustancia, estructura o proceso que pueda ser medida en el cuerpo e influir o predecir la incidencia de un resultado o enfermedad [147].

En lo que respecta al estrés oxidativo/nitrosativo, aunque se han propuesto una gran cantidad de biomarcadores, muchos de ellos no correlacionan bien entre sí, no reflejan con exactitud el estado de estrés oxidativo o no son realmente específicos. Por ello, solamente unos pocos pueden considerarse verdaderamente útiles en el estudio del daño oxidativo [148].

Estos marcadores pueden clasificarse en directos o indirectos. Los **directos** se corresponden con aquellos capaces de cuantificar las ROS/RNS, lo que en la práctica resulta muy complejo por su elevada reactividad y su vida media muy corta.

En cuanto a los métodos **indirectos**, encontramos por un lado aquellos que se basan en la determinación de antioxidantes endógenos no enzimáticos como el glutatión, la coenzima Q, la bilirrubina y la ferritina [149], o bien, los que se fundamentan en la medición de las actividades enzimáticas que conforman los sistemas de defensa antioxidante, como las enzimas CAT, SOD, GPx y GRd. Por otro lado, también existen biomarcadores indirectos que evidencian la acción oxidante sobre las estructuras de sistemas biológicos como los lípidos, las proteínas y ácidos nucleicos.

Con respecto a los biomarcadores de oxidación lipídica, resaltan fundamentalmente los prostanoïdes y los aldehídos MDA y HNE, siendo estos dos últimos los más estudiados y empleados [148].

En cuanto a las proteínas, destaca la medición de los productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP) [150], un marcador que refleja la formación de ditirosina, puentes disulfuro y grupos carbonilo durante los procesos de estrés oxidativo [151] y que ha demostrado ser un marcador temprano de daño tisular oxidativo, además de actuar como mediador activo de la inflamación [152,153].

En lo que respecta al ADN, el 8-oxo-2'-desoxiguanosina, un derivado de la oxidación de bases de guanina es uno de los productos de daño oxidativo al ADN más

estudiados y es considerado como uno de los biomarcadores más útiles de estrés oxidativo celular [154].

Por último, en cuanto a marcadores de estrés nitrosativo, debido al carácter tan inestable del óxido nítrico (NO) y a su rápida degradación a nitritos y nitratos, la determinación de nitritos y nitratos (NOx) resulta un buen estimador del índice de producción de NO* y, por tanto, del estrés nitrosativo [155–157].

6. Estrés oxidativo y TDAH

El cerebro es un órgano particularmente vulnerable al estrés oxidativo. Esto se debe principalmente a la elevada cantidad de oxígeno que consume (un 20 % del total del inspirado), a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados y a su baja concentración de enzimas antioxidantes [158,159].

Los estudios realizados sobre el impacto del estrés oxidativo en las estructuras cerebrales señalan que los radicales libres tienen efectos perjudiciales en el desarrollo cerebral al interferir con los procesos de migración neuronal [160] y al disminuir la disponibilidad de factores neuroprotectores, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) [159,161].

Además, el daño oxidativo a nivel cerebral también provoca mutaciones en genes cruciales en la regulación de los neurotransmisores. Estos cambios van a modificar la estructura y función de los neurotransmisores y van a reducir la afinidad de éstos por sus receptores [162–164].

En este contexto, en los últimos tiempos ha habido un creciente interés en el estudio de la influencia del estrés oxidativo en los trastornos del neurodesarrollo. La evidencia científica actual señala que el estrés oxidativo predispone a una amplia gama de afecciones psiquiátricas como el autismo, la esquizofrenia, la depresión, la ansiedad y el trastorno bipolar [165–168].

Dado que el TDAH comparte bases genéticas con todos estos trastornos [169–172], cabría esperar que parte de esta diátesis compartida esté mediada por anomalías en las vías de respuesta al estrés oxidativo [173].

Los estudios realizados hasta el momento señalan que los pacientes con TDAH presentan un mayor nivel de daño oxidativo y una disminución en la actividad de diversas enzimas antioxidantes, lo cual reafirma la idea de que el estrés oxidativo podría ser considerado como un factor fisiopatológico más en este trastorno [173–179].

El estrés oxidativo conduce a la oxidación de diferentes biomoléculas esenciales para el organismo, lo que provoca una potente respuesta neurotóxica e inflamatoria. El estrés oxidativo modifica las vías de señalización que modulan el sistema inmunológico y provoca un entorno inflamatorio al activar la secreción de quimiocinas y citocinas proinflamatorias [175,180,181].

Además, el estrés oxidativo y la neuroinflamación son mecanismos que están relacionados bidireccionalmente: la neuroinflamación provocada por el daño oxidativo va a mediar, a su vez, la activación de células gliales. La microglía, los oligodendrocitos y los astrocitos van a secretar mediadores inflamatorios (citocinas, quimiocinas, ROS, RNS, prostaglandinas etc), aumentando de esta forma el estrés oxidativo y provocando cambios en el desarrollo neurológico y pérdida de la función neuronal [28,175,176].

Por otro lado, durante el período prenatal, la exposición a determinados factores ambientales (los contaminantes, el tabaquismo o las infecciones) conduce a un estado inflamatorio en el entorno intrauterino [178] que puede asociarse con cambios en el desarrollo cerebral del feto como la activación de células gliales [182], la disfunción neurotransmisora [183], la reducción en los factores de crecimiento neurotróficos [184] y un incremento en la producción de radicales libres [185]. Todo ello respalda la hipótesis de que los procesos inflamatorios que ocurren durante el desarrollo embrionario conducen

Introducción

a un estado de neuroinflamación que posiblemente desempeñe un papel crucial en la fisiopatología del TDAH [178].

El desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes, la desregulación catecolaminérgica y la interacción entre múltiples factores genéticos y ambientales producen un estado de estrés oxidativo y neuroinflamación que, a su vez, aumentan aún más los síntomas del TDAH debido a un paradójico círculo vicioso [175].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

El trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) es una entidad con una etiología multifactorial donde juegan un papel muy relevante el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal, la neuroinflamación y el estrés oxidativo. Se han encontrado asociaciones entre un CAR atípico en diferentes trastornos del neurodesarrollo, así como un patrón de estrés oxidativo e inflamatorio alterado en pacientes con TDAH.

Existen una serie de marcadores bioquímicos relacionados con el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal y el estrés oxidativo que se encuentran particularmente alterados en esta entidad. Dichos parámetros, podrían verse modificados al recibir tratamiento farmacológico y, por tanto, convertirse en marcadores clínicamente útiles en la evaluación de la respuesta al tratamiento.

2. Objetivos

Objetivo principal/general:

El objetivo principal de este estudio es medir los niveles de cortisol y de diferentes marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo e inflamatorio en pacientes pre púberes y púberes con TDAH, para determinar si se producen diferencias significativas tras recibir el tratamiento farmacológico habitual. Esto podría ser utilizado como indicador objetivo para evaluar la eficacia del tratamiento en pacientes con TDAH.

Objetivos secundarios/específicos:

1. Evaluar el grado de inflamación y estrés oxidativo/nitrosativo mediante la determinación de diversos marcadores en pacientes con TDAH.
2. Evaluar la función del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal, mediante el estudio de la respuesta al despertar del cortisol.
3. Determinar si se producen diferencias significativas de estos parámetros después de haber recibido tratamiento farmacológico con metilfenidato.

Hipótesis y objetivos

4. Establecer si existen diferencias entre pre púberes y púberes en las circunstancias anteriores.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Sujetos del estudio

El estudio se llevó a cabo en un total de 59 sujetos que fueron clasificados en dos grupos en función del **estadio madurativo** que presentaban: niños pre púberes y púberes. Para ello se utilizó la escala de Tanner, que es un sistema de clasificación empleado para valorar el estado de maduración sexual de niños desde el inicio de la pubertad hasta alcanzar el desarrollo sexual completo [186].

Los sujetos clasificados en el estadio I formaban el grupo de niños pre púberes (n = 34), mientras que los de los estadios II-IV constituían el grupo de púberes (n = 25).

Los criterios de **inclusión** en ambos grupos fueron:

- Presentar una **capacidad intelectual normal**: esto fue evaluado mediante el test breve de inteligencia de Kaufman.
- Haber sido diagnosticado de **TDAH**, según los criterios de clasificación del Manual Diagnóstico y Estadístico de Salud Mental, quinta edición (DSM-5) [7].
- **Ausencia** de otras **patologías** de interés, salvo las comorbilidades habitualmente descritas en estos pacientes.
- **Ausencia** de **tratamiento** farmacológico.
- Firma del **consentimiento informado** (Anexo I) por parte de los pacientes o sus progenitores.

Los criterios de **exclusión** fueron: la ausencia de consentimiento informado, la existencia de discapacidad intelectual, la presencia de otras enfermedades crónicas y aquellos pacientes que estuviesen en tratamiento farmacológico previamente.

Material y métodos

El protocolo fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Clínico San Cecilio (nº 0250-N-20) y el estudio se realizó de acuerdo con las directrices de la declaración de Helsinki de 1975 revisada en 2013 [187].

2. Diseño de la investigación

El estudio se llevó a cabo entre septiembre de 2020 y mayo de 2023. Se trata de un estudio prospectivo, cuasi-experimental, de seguimiento longitudinal basado en la práctica clínica diaria. Los sujetos del estudio fueron reclutados por el Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Clínico San Cecilio. Todos ellos dieron su consentimiento informado por escrito y fueron sometidos a una entrevista clínica estructurada y a un análisis de sangre y saliva antes de iniciar el tratamiento prescrito y tras tres meses del inicio de este.

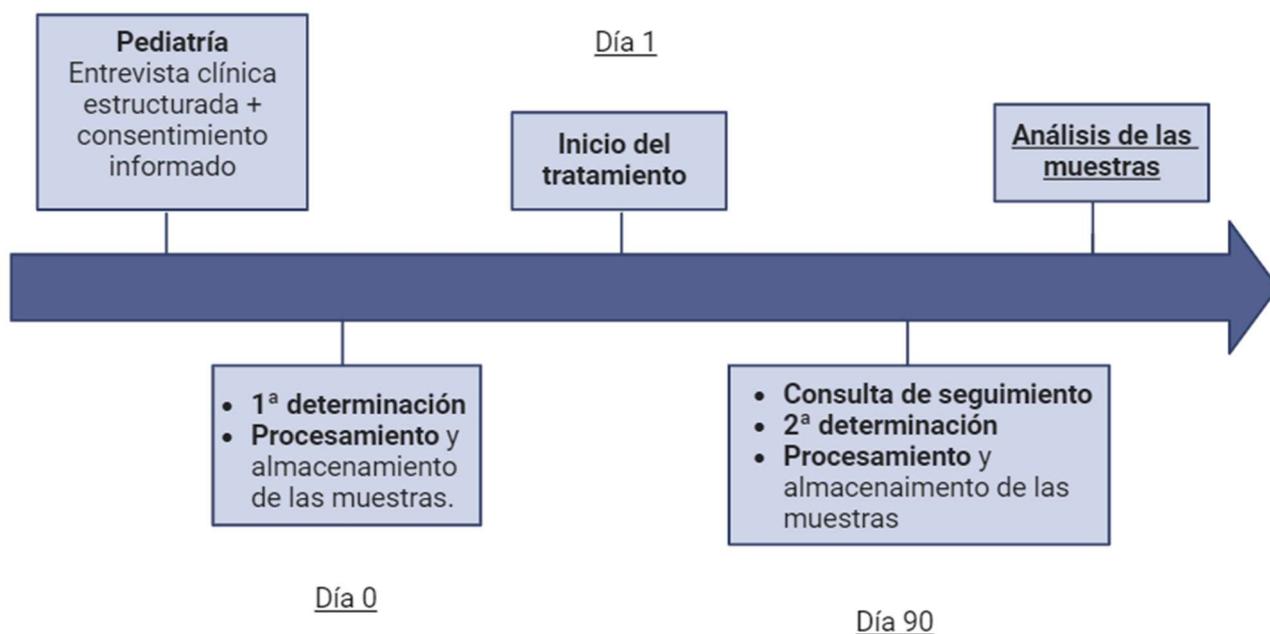


Figura 6: Representación esquemática del protocolo del estudio.

El diagnóstico se realizó en base a los criterios de clasificación del Manual Diagnóstico y Estadístico de Salud Mental, quinta edición (DSM-5) [7]. Los pacientes también se subclasificaron en diferentes grupos en función de la presentación

predominante de TDAH: presentación predominantemente inatenta, presentación predominantemente hiperactiva/impulsiva o presentación combinada. Además, se entregó a padres y profesores las escalas Vanderbilt para la evaluación de las condiciones comórbidas existentes. Las principales características clínicas y demográficas de los participantes se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características clínicas y demográficas de los participantes.

Parámetros	Grupo pre púberes (n = 34)	Grupo púberes (n = 25)
Edad (años)	7,74 ± 1,29	12,7 ± 1,03
Género (niños/niñas)	26 niños/8 niñas	14 niños/11 niñas
Presentación TDAH	Presentación combinada: 14	Presentación combinada: 7
	Presentación inatenta: 14	Presentación inatenta: 15
	Presentación hiperactiva-impulsiva: 5	Presentación hiperactiva-impulsiva: 2
	Sin clasificar: 1	Sin clasificar: 1
Tratamiento	Metilfenidato	Metilfenidato

El estudio incluyó 59 participantes divididos en dos grupos. El grupo de niños prepúberes estaba formado por 34 participantes: 26 niños y 8 niñas, con una edad media de 7,74 ± 1,29 años. Un total de 14 niños tenían TDAH de presentación predominantemente inatenta, otros 14 niños TDAH de presentación combinada y el resto de los niños (6) TDAH de presentación predominantemente hiperactiva/impulsiva. El grupo de niños puberales estaba formado por 25 participantes: 14 niños y 11 niñas, con una edad media de 12,7 ± 1,03 años. En total, 15 niños tenían un diagnóstico de TDAH de presentación predominantemente inatenta, otros 7 tenían TDAH presentación combinada, y los niños restantes (3) tenían TDAH de presentación predominantemente

hiperactiva/impulsiva. Todos los participantes recibieron metilfenidato como tratamiento del TDAH.

3. Muestras de sangre

Se realizaron dos extracciones de sangre: una **antes** de recibir el tratamiento farmacológico y otra tres meses **después** del inicio del mismo. Las muestras se extrajeron de la vena antecubital del brazo a primera hora de la mañana, tras un ayuno nocturno de aproximadamente 12 horas.

Las muestras sanguíneas se recogieron en 2 tubos Vacutainer con EDTA-K₃ como conservante (Beckton Dickinson, Madrid, España) para la obtención de plasma y hematíes. Después de centrifugar los tubos a 3500 rpm, durante 15 minutos y a 4 °C, se separó el plasma de los hematíes utilizando una pipeta Pasteur. A continuación, los hematíes se lavaron dos veces seguidas con solución salina fría. Las muestras de plasma y eritrocitos se alicuotaron y se almacenaron congeladas a -80 °C.

El día de los experimentos, las muestras de plasma se descongelaron lentamente en un baño de hielo. En lo que respecta a los hematíes, estos se descongelaron y se hemolizaron empleando tampón fosfato (10 mM de fosfato sódico, 1 mM de EDTA-Na₂, pH 6,25), se desproteinizaron con ácido tricloroacético al 10 % y se centrifugaron de nuevo a 20.000× g durante 15 min. Los sobrenadantes obtenidos se emplearon para las mediciones que se detallan a continuación.

3.1 Medición de los productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP)

Los niveles de AOPP se midieron en plasma, por duplicado, mediante espectrofotometría en un lector de microplacas (PowerWaveX; Bio-Tek Instruments, Inc., Winoosky, VT, EE.UU.). Esta medición se basa en la detección de ditirosina (un marcador específico de la oxidación de

proteínas) que, al reaccionar con yoduro potásico y ácido acético, forma un componente que absorbe a 340 nm.

Para ello, se realizó una curva de calibración mediante el empleo de diluciones seriadas de cloramina T. A continuación, en cada uno de los pocillos de muestra de la microplaca, se añadieron 200 μL de muestra diluida, 10 μL de PBS y 20 μL ácido acético, y se midió la absorbancia frente a un blanco. Los resultados se expresan en nmol/mL de equivalentes de cloramina T.

3.2 Medición de los productos de la peroxidación lipídica (LPO)

Los niveles de LPO se determinaron en plasma, por duplicado, mediante un kit comercial (KB03002, Bioquochem S.L., Oviedo, España) que medía las concentraciones de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (HNE) como indicadores de la peroxidación lipídica.

Las muestras de plasma se descongelaron y se centrifugaron a 5.000 g durante 5 minutos y a continuación, se añadieron 100 μL del sobrenadante obtenido a una mezcla formada por 325 μL del reactivo A y 75 μL del reactivo B del kit comercial y se dejó incubar a 40 °C al baño María durante 40 minutos. Esta reacción producía un compuesto cromóforo con una absorbancia máxima a 586 nm, que se leyó mediante un lector de placas. Las concentraciones de LPO se expresan en nmol/mL [188].

3.3 Medición de nitrato + nitrito (NOx)

Dado que el óxido nítrico (NO) es una molécula muy inestable, la medición directa de su contenido resulta difícil, por lo que a menudo se recurre un método indirecto de mayor estabilidad como lo es la determinación de nitritos y nitratos (NOx).

La concentración de NOx se determinó mediante la reacción de Griess, que produce un compuesto detectado espectrofotométricamente a 550 nm [189].

Material y métodos

Para ello, las muestras primero se trataron con ácido sulfosalicílico al 6 % para llevar a cabo la precipitación de las proteínas. A continuación, se centrifugaron durante 15 minutos a 10,000x g y 50 μ L del sobrenadante obtenido se mezcló con 4 μ L de NaOH al 1,25 % y una mezcla formada por nitrato reductasa (NRd), glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PDH), glucosa-6-fosfato (G6P) y NADPH, con el fin de reducir los nitratos a nitritos. La mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente durante una hora y, finalmente, se añadieron 100 μ L de reactivo de Griess (mezcla 1:1 de 0,1 % de naftil-etilendiamina y 1 % de sulfanilamida en H_3PO_4 al 5 %) a cada pocillo de muestra. La absorbancia se midió a 550 nm en un espectrofotómetro de placa (PowerWaveX; Bio-Tek Instruments, Inc., Winoosky, VT, EE. UU). Sus valores se indican en nmol/mL.

3.4 Medición de la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRd) y catalasa (CAT)

Las enzimas GPx, GRd y CAT constituyen la primera línea de defensa antioxidante de nuestro organismo. La cuantificación de las actividades enzimáticas se realizó en la fracción eritrocitaria de cada paciente.

En el caso de GPx, su actividad enzimática se midió por espectrofotometría en una placa de 96 pocillos (PowerWaveX; Bio-Tek Instruments, Inc., Winoosky, VT, EE.UU.). El método consiste en una medición indirecta del consumo de NADPH.

La actividad GRd también se midió espectrofotométricamente utilizando un kit comercial (703202; Cayman chemical, Ann Arbor, MI, EE.UU.). La oxidación de NADPH a $NADP^+$ da lugar a una disminución de la absorbancia a 340 nm, que es directamente proporcional a la actividad GRd.

La actividad de la enzima CAT se midió por la velocidad de descomposición del H_2O_2 , según el método de Aebi [190].

Todas las actividades enzimáticas se expresan como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ Hb. La concentración de hemoglobina se determinó espectrofotométricamente por el método de Drabkin [191].

3.5 Medición de α -Klotho

α -Klotho es una proteína relacionada con el envejecimiento, que posee propiedades antiinflamatorias, por bloquear la acción y activación del TNF- α , y antioxidantes [192]. Los niveles plasmáticos de α -Klotho se midieron con un ELISA en fase sólida tipo sándwich (Bionova Científica S.L, Madrid, España), basado en dos reacciones específicas antígeno-anticuerpo y en una posterior medición semicuantitativa por espectrofotometría. Cada placa ELISA tiene 96 pocillos y cada uno de ellos contiene un anticuerpo monoclonal soluble anti-humano (IgG) α -Klotho.

Para llevar a cabo la primera reacción, se añadió a cada uno de los pocillos las muestras y el estándar correspondientes y se dejó incubar durante 60 minutos a 23 °C. A continuación, se realizó un lavado con el fin de eliminar la fracción de muestra no unida al anticuerpo inmovilizado. Después, se añadió un segundo anticuerpo conjugado con HRP y se dejó incubar durante otros 30 minutos para que tuviese lugar la segunda reacción. Tras un nuevo lavado, se añadió a cada pocillo una solución de tetrametilbencidina (TMB) y ácido sulfúrico, que provocó un cambio de color que se midió espectrofotométricamente a 450 nm. Los niveles de α -Klotho se expresan en pg/mL.

4. Muestras de saliva

Para poder evaluar la respuesta al despertar del cortisol (CAR), se pidió a los participantes que recogieran tres muestras de saliva en casa: inmediatamente al despertar, 30 y 60 minutos después. Las muestras de saliva fueron recolectadas utilizando los dispositivos Salivette© (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Estos dispositivos contienen en

su interior un hisopo de algodón que se ha de introducir en la boca, sobre la base de la lengua, durante al menos dos minutos, sin llegar a ser masticado ni ingerido. Tras esto, la torunda de algodón impregnada de saliva se devuelve al interior del tubo cilíndrico de polipropileno y se enrosca la tapa herméticamente. Se proporcionó a los familiares un protocolo escrito con instrucciones detalladas (Anexo II). Asimismo, se indicó a los familiares de los niños que éstos no comieran ni se cepillaran los dientes al menos 30 minutos antes de completar la toma de muestra para evitar la contaminación de la saliva.

Los familiares anotaron en cada uno de los dispositivos el nombre completo de cada participante y la hora exacta a la que se tomó cada una de las muestras. Además, se hizo coincidir el día de la recogida de muestras de saliva con el análisis de sangre, de tal forma que los pacientes acudían a primera hora al hospital para la extracción sanguínea y posteriormente entregaban las muestras de saliva al personal de enfermería de la Sala de extracciones.

Una vez recibidas en el laboratorio, las muestras se centrifugaron a 3000× g durante 10 minutos y luego se congelaron a -80 °C. Al igual que con las muestras de sangre, también se recogieron muestras de saliva al inicio del estudio (antes de empezar el tratamiento) y tres meses después.

4.1 Medición del cortisol salival

La medición del cortisol en saliva es un buen sustituto del cortisol plasmático debido a la buena correlación con los niveles de cortisol libre sérico, a su gran estabilidad incluso a temperatura ambiente y a la forma no invasiva empleada para su obtención [193].

El cortisol en saliva se midió por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), empleando el kit comercial MassChrom® Cortisol

(Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Gräfelfing, Alemania). Este método se considera actualmente el método de referencia para medir el cortisol salival, entre otras razones, por su alta sensibilidad y especificidad, su estandarización y porque evita problemas de reactividad cruzada con otros esteroides [194].

Las muestras de saliva se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante y se inyectaron en el instrumento 15 μ L de cada muestra a un flujo de 0,5 mL/min. La cuantificación se llevó a cabo en el equipo de cromatografía líquida Nexera XR LC (Shimadzu, Kyoto, Japón) acoplado a un espectrómetro de masas QTRAP 4500 LC-MS/MS4500 (AB Sciex, Framingham, MA, EE.UU.). La separación cromatográfica se realizó mediante una columna analítica Chromsystems (MassChrom® Cortisol chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Gräfelfing, Alemania) utilizando el perfil de elución en gradiente. Los resultados se expresan en μ g/L.

5. Análisis de datos

Todos los datos se expresan como media \pm SEM. Los datos se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) unidireccional no apareado seguido de la prueba de Student para identificar diferencias significativas entre todas las variables. También se utilizó ANOVA de dos vías para identificar la influencia del estado puberal y el tratamiento en los resultados. Además, también se realizó un análisis de correlación y regresión entre las variables de los grupos PreT y PostT. Para todos los análisis estadísticos se utilizó GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE.UU.). Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

En el caso particular del cortisol, para poder evaluar la respuesta al despertar del cortisol (CAR), ésta se codificó como presente cuando la segunda medición era al menos un 50 % superior a la basal [77,195].

Material y métodos

Además, se llevó a cabo un análisis adicional mediante el cálculo del área bajo la curva (AUC) para cada una de las mediciones utilizando el método propuesto por Pruessner et al. La concentración media de cortisol en cada uno de los tres puntos temporales dibuja una curva que representa el AUC. Pruessner et al. diseñaron dos fórmulas para calcular el área bajo la curva: una con respecto al suelo (AUC_G) y otra con respecto al incremento (AUC_I) [196]. Los sujetos a los que les faltaba alguna de las tres muestras fueron excluidos de los análisis.

RESULTADOS

Parte de los resultados mostrados en esta sección están incluidos en el siguiente artículo de investigación:

Garre-Morata Laura, de Haro Tomás, González Villén Raquel, Fernández-López María Luisa, Escames Germaine, Molina-Carballo Antonio, Acuña-Castroviejo Darío.

Changes in Cortisol and in Oxidative/Nitrosative Stress

Indicators after ADHD Treatment.

Antioxidants, 2024

doi: 10.3390/antiox13010092

Factor de Impacto: 7,0 (D1)

1. Evaluación del estado oxidativo e inflamatorio en los pacientes antes y después del tratamiento

La caracterización del estado oxidativo/nitrosativo de los sujetos de nuestro estudio se realizó mediante el análisis de los niveles plasmáticos de AOPP, LPO y NOx. Después de tres meses de tratamiento con metilfenidato, se produjo una marcada disminución de los niveles de LPO ($p < 0,001$), AOPP ($p < 0,05$) y NOx ($p < 0,05$) (Figura 7A-C).

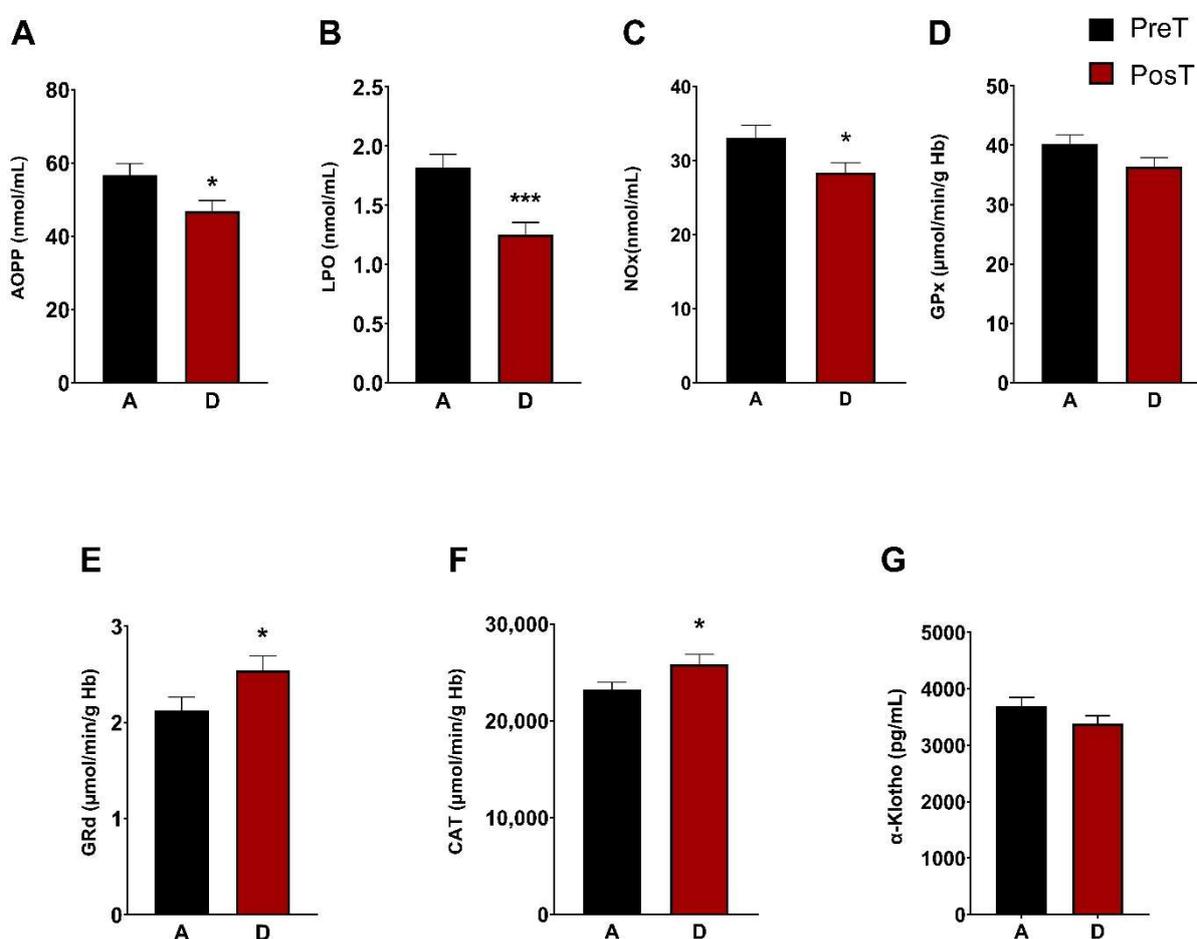


Figura 7. Análisis de los parámetros de estrés oxidativo plasmático y eritrocitario en pacientes con TDAH. Se representan los siguientes niveles de estrés oxidativo: (A) niveles plasmáticos de productos de proteínas de oxidación avanzada (AOPP); (B) productos de peroxidación lipídica (LPO); (C) niveles de nitrito más nitrato (NOx); (D) actividad de la glutación peroxidasa (GPx); (E) actividad de la glutación reductasa (GRd); (F) actividad de la catalasa (CAT); (G) α -Klotho. Los datos se presentan como media \pm SEM. PreT, pre tratamiento (en negro); PosT, post tratamiento (en rojo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ frente a PreT.

Resultados

La actividad enzimática de CAT y de las enzimas del ciclo de glutatión, GPx y GRd, se midió en la fracción eritrocitaria. Tras el tratamiento, se registró un aumento significativo en la actividad enzimática de GRd y CAT ($p < 0,05$, **Figura 7E,F**), mientras que la actividad de GPx no mostró cambios significativos (**Figura 7D**).

En cuanto a los niveles de α -Klotho, se observó una disminución tras el tratamiento, aunque esta reducción no fue estadísticamente significativa (**Figura 7G**).

2. Evaluación del estado oxidativo e inflamatorio en función del estadio madurativo: grupos de niños prepuberales frente a puberales

Para valorar si el desarrollo puberal tenía alguna influencia en el estado oxidativo e inflamatorio medido anteriormente, clasificamos a los sujetos de nuestro estudio en diferentes estadios madurativos (I-IV), según los criterios de la escala de Tanner. Los pacientes clasificados en el estadio I formaron el grupo de niños pre púberes ($n = 33$), mientras que los de los estadios II-IV constituyeron el grupo de púberes ($n = 25$).

Con esta categorización, observamos una disminución significativa de los niveles de LPO después del tratamiento, tanto en el grupo de pre púberes ($p < 0,001$) como en el de púberes ($p < 0,05$) (**Figura 8B**), mientras que la concentración de AOPP únicamente disminuyó tras el tratamiento en el grupo de niños pre púberes ($p < 0,05$, **Figura 8A**). De manera similar, las concentraciones de NOx también disminuyeron tras el tratamiento en los niños clasificados como púberes, pero no en los pre púberes ($p < 0,05$, **Figura 8C**).

En cuanto a las actividades enzimáticas, encontramos una disminución de la actividad enzimática de GPx en el grupo de púberes tratados ($p < 0,05$, **Figura 8D**) y un aumento de la actividad de CAT en el grupo de pre púberes tratados ($p < 0,05$, **Figura 8F**). No se encontraron cambios en la actividad de GRd en ningún grupo (**Figura 8E**) y tampoco en los niveles de α -Klotho (**Figura 8G**).

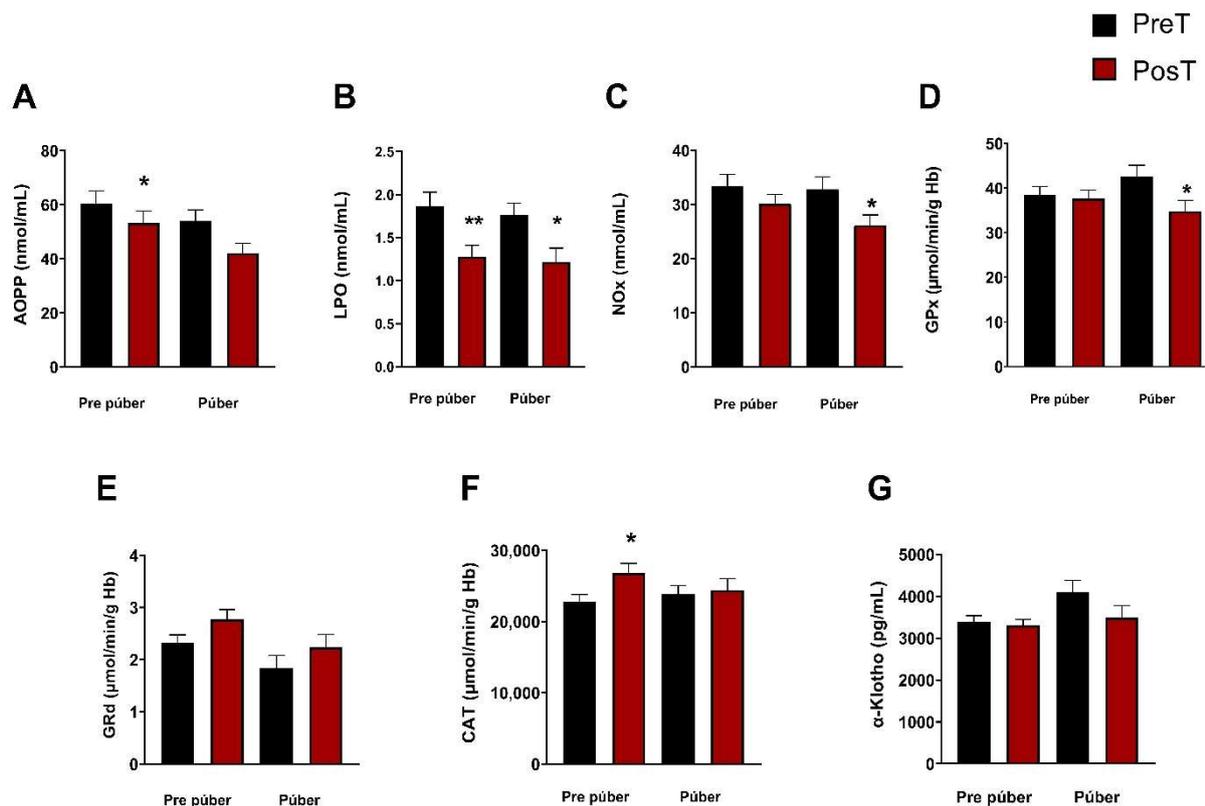


Figura 8. Análisis de los parámetros de estrés oxidativo plasmático y eritrocitario en pacientes con TDAH. En cada gráfico, las dos columnas de la izquierda representan el grupo de niños prepuberales y las dos columnas de la derecha el grupo de niños púberes. Se representan los siguientes niveles de estrés oxidativo: (A) niveles plasmáticos de productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP); (B) productos de peroxidación lipídica (LPO); (C) niveles de nitrito más nitrato (NOx); (D) actividad de la glutatión peroxidasa (GPx); (E) actividad de la glutatión reductasa (GRd); (F) actividad de la catalasa (CAT); (G) α -Klotho. Los datos se presentan como media \pm SEM. PreT, pre tratamiento (en negro); PosT, post tratamiento (en rojo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, y *** $p < 0,001$ frente a PreT.

3. Evaluación de los niveles de cortisol salival

Se recibieron en el laboratorio un total de 354 muestras de saliva (59 participantes \times 3 muestras \times 2 recogidas). De ellas, 27 fueron excluidas de los análisis por falta de algunos puntos de la recogida, contaminación con sangre o coloración azul, que indicaría una muy probable contaminación debida al cepillado dental, entre otras causas. En la **Figura 9** se muestran los niveles medios de cortisol para todos los puntos de muestreo, en el grupo de niños pre púberes y púberes, antes y después del tratamiento.

Resultados

Los niveles basales de cortisol (en el momento del despertar) no sufrieron modificaciones significativas tras el tratamiento. Sin embargo, los niveles correspondientes a los 30 minutos tras el despertar sí que fueron significativamente superiores tras recibir el tratamiento farmacológico ($p < 0,05$, **Figura 9A**). En cuanto a las concentraciones de cortisol a los 60 minutos, no se encontraron diferencias significativas.

Además, si observamos cómo aumenta la concentración de cortisol desde el momento del despertar hasta los 30 minutos posteriores vemos que, tanto en el PreT como en el PosT, se produjo un aumento significativo de los niveles de cortisol ($p < 0,001$, **Figura 9A**).

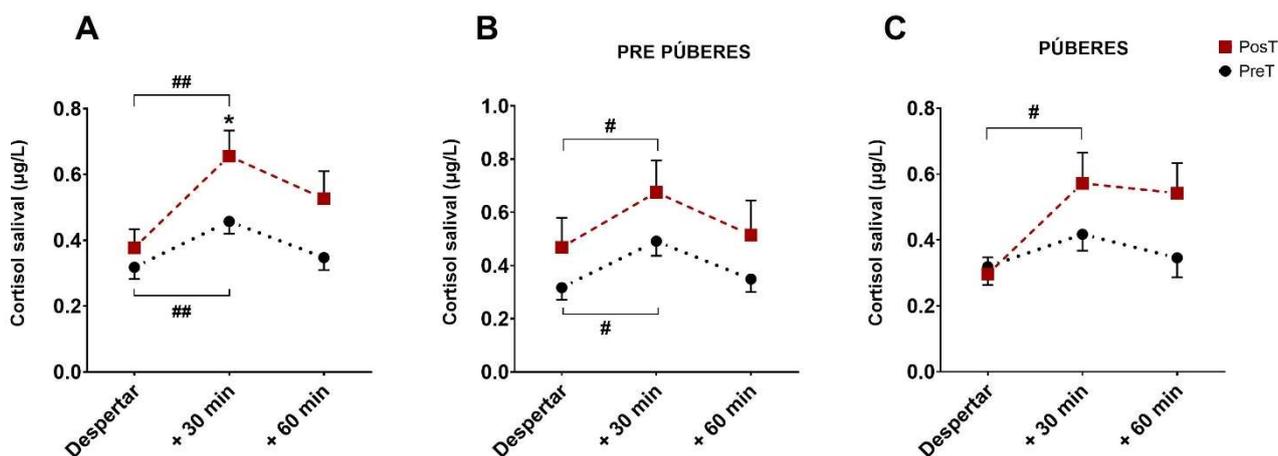


Figura 9. Representación de los niveles medios de cortisol y SEM en tres puntos temporales, antes y después del tratamiento. El gráfico "A" representa los niveles de cortisol de los sujetos del estudio, sin distinguir entre pre púberes y púberes. El gráfico "B" corresponde a los niveles de cortisol en el grupo de niños pre púberes y el gráfico "C" representa los niveles de cortisol en el grupo de púberes. * $p < 0,05$ vs. 30 min PosT; # $p < 0,05$, y ## $p < 0,001$ vs. tiempo de despertar para cada grupo

En el grupo de niños pre púberes (**Figura 9B**), los niveles de cortisol a los 30 minutos, pero no a los 60 minutos, fueron significativamente superiores a los correspondientes al momento del despertar, tanto en los pacientes tratados como en los

no tratados ($p < 0,05$). En el grupo de púberes, solo se produjeron cambios significativos tras el tratamiento en los niveles de cortisol a los 30 minutos ($p < 0,05$, **Figura 9C**).

Por otro lado, considerando un CAR positivo cuando la concentración de cortisol a los 30 minutos es, al menos, un 50 % mayor que al despertar [77,195], observamos que en el grupo de pre púberes la tasa de CAR positivas antes del tratamiento fue del 53,33 %, aumentando hasta el 58 % después del tratamiento. En el grupo de púberes, estas diferencias aumentaron, ya que la tasa de CAR positivas antes del tratamiento fue del 48 % y después del tratamiento subió al 60 %.

También se calculó el área bajo la curva (AUC) según el método de Pruessner [196]. Nuestros resultados mostraron que el AUC_G después del tratamiento era superior al AUC_G antes del mismo ($AUC_G \text{ posT} = 33,52$ frente a $AUC_G \text{ preT} = 23,50$; $p < 0,05$). Lo mismo ocurrió con el AUC_I ($AUC_I \text{ posT} = 10,98$ frente a $AUC_I \text{ preT} = 4,43$; $p < 0,05$). Además, el AUC_I también fue significativamente mayor tras el tratamiento en el grupo de púberes ($AUC_I \text{ posT} = 12,33$ frente a $AUC_I \text{ preT} = 3,35$; $p < 0,05$).

También se realizó un análisis de correlación entre las variables bioquímicas y el CAR en los grupos PreT y PosT y en los grupos PreT frente a PosT, pero no se encontró correlación entre ellas, por lo que no se pudo obtener más información de este análisis.

DISCUSIÓN

A pesar de la elevada prevalencia y comorbilidad del TDAH, seguimos sin conocer con exactitud la base neurobiológica de este trastorno. Parece estar claro que su aparición se debe a la combinación de un conjunto de factores genéticos, ambientales y anatómicos [11,27], si bien como mencionábamos, los mecanismos neurobiológicos subyacentes continúan siendo una incógnita.

Una de las hipótesis más reconocidas es que alteraciones en determinadas estructuras cerebrales y la desregulación de neurotransmisores del sistema dopaminérgico y noradrenérgico serían responsables, en gran medida, del desarrollo del trastorno y sus síntomas [56].

Las investigaciones en este campo sugieren que los síntomas nucleares de los pacientes con TDAH podrían corresponderse con una reducción de los niveles de dopamina, debido a una mayor recaptación de ésta en las vesículas presinápticas. De hecho, algunos autores consideran que esta alteración podría considerarse como el principal factor fisiopatológico del trastorno [61].

No obstante, y a pesar del amplio reconocimiento de las teorías catecolaminérgicas, en los últimos tiempos ha habido una mayor investigación en otros mecanismos biológicos que también pudieran estar asociados con el TDAH. Varios estudios sugieren que los radicales libres y el estrés oxidativo podrían estar implicados en diversas afecciones psiquiátricas, como la esquizofrenia, el trastorno bipolar, el trastorno depresivo mayor, los trastornos de ansiedad y el TDAH [165,166,168].

El estrés oxidativo engloba un complejo fenómeno biológico que se produce cuando hay un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la respuesta de los sistemas de defensa antioxidantes endógenos [197], lo que resulta en

la acumulación de ROS y otros compuestos altamente reactivos, que provocan daños en la estructura y función celular.

En lo que respecta al TDAH, aunque no son demasiados los estudios que han investigado sobre este aspecto, la mayoría de ellos coinciden en que los pacientes diagnosticados de TDAH presentan, en comparación con controles sanos, un mayor nivel de daño oxidativo que se refleja en concentraciones más elevadas de ciertos marcadores, entre los que destacan principalmente el óxido nítrico, el índice de peroxidación lipídica y productos avanzados de peroxidación proteica [177]. Estos marcadores, junto a otros, han emergido como indicadores de la presencia aumentada de radicales libres y su elevación sugiere la alteración de diferentes procesos bioquímicos que favorecen la formación y acumulación de ROS [164,174,198,199].

En cuanto a la implicación del eje HHS en la fisiopatología del TDAH, y más concretamente la implicación del cortisol y la respuesta al despertar del cortisol (CAR), en los últimos tiempos se ha propuesto que algunos de los síntomas nucleares del TDAH podrían estar vinculados a déficits de excitación o a una incapacidad para mantener niveles adecuados de ésta [68,69,200]. Esto estaría directamente relacionado con la actividad del eje HHS, donde el cortisol desempeña un papel central participando en una amplia gama de funciones cognitivas como la atención, el esfuerzo sostenido y el comportamiento [201–203]. Por ello, se cree que las alteraciones en la síntesis o en la regulación del cortisol podrían explicar las dificultades en la atención y el comportamiento, influenciando mecanismos neurobiológicos en la corteza prefrontal [204].

Nuestros resultados muestran por primera vez que el estado oxidativo e inflamatorio de los niños diagnosticados de TDAH, así como la función del eje

hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, mejoraron tras el tratamiento farmacológico con el psicoestimulante metilfenidato. Por lo que nuestros datos apoyan aún más la hipótesis de que el estrés y la inflamación, que parecen desempeñar un papel clave en varias enfermedades psiquiátricas, están efectivamente implicados también en la fisiopatología del TDAH [165,168].

Aunque varios estudios señalan que los niños y adolescentes con diagnóstico de TDAH tienden a mostrar un aumento en el daño oxidativo y una disminución en la actividad de ciertas enzimas antioxidantes, en comparación con los individuos sanos, existe una gran discrepancia en la bibliografía con respecto a este tema [164,174,176,177,198,199,205]. De hecho, un metaanálisis halló una asociación entre el TDAH y el daño oxidativo, pero, sin embargo, no logró demostrar alteraciones significativas en los sistemas antioxidantes [173].

Estas divergencias, junto con el hecho de que el estrés oxidativo podría no ser el agente causal del trastorno, sino sólo una consecuencia más del mismo, ponen de manifiesto la necesidad de realizar más investigaciones que evalúen las modificaciones de diferentes marcadores bioquímicos antes y después del tratamiento farmacológico para alcanzar una comprensión más profunda del TDAH [174].

Los pocos estudios existentes sobre los efectos de los psicoestimulantes en el estado oxidativo muestran resultados inconsistentes. La mayoría de ellos se basan en modelos animales y no en pacientes reales y, además, las mediciones han sido realizadas en diferentes especímenes y en varias regiones cerebrales [206].

Por ejemplo, en un estudio realizado en ratas, se observó que el efecto del metilfenidato variaba según la edad y el tipo de exposición al fármaco, de tal forma que las ratas jóvenes mostraban una reducción de los niveles de LPO tras el tratamiento agudo,

mientras que el tratamiento crónico aumentaba el daño oxidativo en las jóvenes y lo reducía en las adultas [207].

Otro estudio demostró que el efecto del tratamiento variaba en función de la región cerebral estudiada: en algunas zonas, como el cerebelo y el cuerpo estriado, se reducían los niveles de ROS y aumentaba la actividad de las enzimas antioxidantes, mientras que, en otras regiones, como en el córtex prefrontal, se observaba un empeoramiento del estrés oxidativo [208].

Del mismo modo, en otro estudio realizado también en ratas, se vio que el consumo crónico de metilfenidato presentaba efectos diferentes según el contexto clínico que se tratase: en el modelo animal de TDAH que simulaba el uso terapéutico (ratas espontáneamente hipertensas, SHR), el metilfenidato mostraba efectos positivos al aumentar la capacidad antioxidante y reducir los procesos de peroxidación lipídica en el hipocampo y el córtex prefrontal. De lo contrario, el grupo control, conformado por ratas sanas (ratas Wistar Kyoto, WKY) que simulaba el consumo no terapéutico del fármaco, el metilfenidato tenía consecuencias perjudiciales en términos de estrés oxidativo/nitrosativo, reactividad astrocítica y capacidad antioxidante [209].

Se observaron resultados similares en otro estudio realizado en ratas, donde el tratamiento con metilfenidato mejoró el perfil proinflamatorio en el modelo de TDAH, mientras que en las condiciones de control indujo un estado proinflamatorio [210].

Los resultados de nuestro estudio muestran que, tras tres meses de tratamiento con metilfenidato, se producía una mejora significativa en el estado oxidativo, en términos de reducción del daño oxidativo proteico (AOPP) y del daño oxidativo lipídico (LPO). También detectamos una reducción de la inflamación medida por los niveles de NOx. Estos resultados coinciden con los de otros autores que también han observado una mejora

del estado oxidativo y del potencial de membrana mitocondrial en células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y [211,212].

Además, nuestros hallazgos también demuestran que el tratamiento con metilfenidato mejoró la acción protectora del sistema antioxidante endógeno con el aumento de la actividad enzimática de CAT y GRd. En general, nuestros datos respaldan los resultados obtenidos en niños y adolescentes con TDAH [206], así como en pacientes con depresión, en los que el tratamiento con psicofármacos dio lugar a una normalización de algunos parámetros relacionados con el estrés oxidativo [167].

Para poder explicar los cambios inducidos por la terapia psicoestimulante con metilfenidato en el estado oxidativo, se han propuesto varias hipótesis: Por un lado, algunos estudios sugieren que el aumento de dopamina inducido por el mecanismo de acción del metilfenidato podría tener un efecto antioxidante, ya que la dopamina tiene capacidad para eliminar los radicales libres [211,213]. Otros estudios indican que las propiedades protectoras del metilfenidato podrían estar relacionadas con su capacidad para secuestrar toxinas y otros metabolitos tóxicos procedentes del metabolismo de la dopamina, mediante la redistribución del transportador vesicular de monoamina tipo 2 (VMAT2) [214–217]. Mientras que otros estudios señalan que el efecto beneficioso del metilfenidato se debe a la capacidad protectora que este ejerce sobre las células al protegerlas contra metabolitos neurotóxicos [218] o por su capacidad para aumentar la actividad enzimática de la SOD y la CAT. En definitiva, todos estos mecanismos podrían contribuir en conjunto a la mejora del estrés oxidativo aquí descrita.

En cuanto a α -Klotho, aunque no existe en la literatura una relación directa entre esta proteína y el TDAH, se sabe que α -Klotho está altamente expresada en el cerebro y que desempeña un importante papel neuroprotector [219], que en parte podría estar

mediado por la supresión de citoquinas proinflamatorias en el sistema nervioso central [220], estableciéndose así una hipotética relación con la teoría proinflamatoria del TDAH.

De hecho, ya se ha estudiado su implicación en otras patologías neuropsiquiátricas como la esquizofrenia [221] o el trastorno bipolar [222], y se ha demostrado una mayor concentración de α -Klotho en estos pacientes en comparación con los controles sanos [223]. Esto podría deberse muy probablemente a su capacidad para hacer frente al estrés oxidativo y a su efecto beneficioso sobre la cognición [221]. En nuestro estudio, sin embargo, no encontramos diferencias significativas en los niveles de α -Klotho tras tres meses de tratamiento.

En cuanto al eje HHS, una forma ampliamente reconocida para evaluar su función es la medición de la respuesta al despertar del cortisol, conocida por sus siglas en inglés como CAR (Cortisol Awakening Response) [202]. Aunque su medición parece relativamente sencilla, no existe un claro consenso sobre qué fórmulas utilizar o qué parámetros exactos medir para evaluar con precisión el patrón CAR [195,224–226].

En 2009, Pruessner et al. desarrollaron dos fórmulas derivadas del método trapezoidal para medir la secreción de cortisol tras el despertar: AUC_G y AUC_I [196]. Estas fórmulas, aunque similares, difieren en su planteamiento ya que, mientras que la AUC_G engloba toda el área bajo la curva con respecto al suelo y representa la producción total de hormona a partir de un determinado momento, el AUC_I incluye sólo el área bajo la curva con respecto a la primera medición y se centra en los cambios producidos durante un periodo de tiempo determinado.

Nuestro estudio es el primero en evaluar el efecto del tratamiento del TDAH sobre el CAR. Estudios previos sólo han investigado el impacto del tratamiento sobre los niveles basales de cortisol u otras hormonas relacionadas, como la

deshidroepiandrosterona sulfato (DHEA-s), y sus hallazgos resultan escasos y contradictorios. Algunos de ellos informan de un aumento en los niveles de cortisol tras el tratamiento con metilfenidato y atomoxetina [227], otros informan de un aumento inicial seguido de un descenso gradual [228], y otros detectan diferencias en los niveles de DHEA-s, pero no en los de cortisol [229].

En lo que respecta a nuestros resultados, debemos destacar que los niveles de cortisol a los 30 minutos fueron significativamente más altos que los niveles basales (justo al despertar), tanto en el grupo de pre tratamiento como en el post tratamiento. Así, aunque el TDAH puede afectar a la reactividad del eje HHS, éste responde con un aumento de los niveles de cortisol incluso en ausencia de tratamiento [79,188].

Otro hecho que consideramos especialmente relevante es la ausencia de cambios significativos en los niveles basales de cortisol (justo al despertar) después de recibir tratamiento farmacológico, lo que contrasta con el hecho de que los niveles de cortisol a los 30 minutos sí que fueron significativamente más altos después del tratamiento, reflejando así una variación en el CAR.

Con el fin de determinar si se producía un cambio significativo en el CAR tras recibir el tratamiento, llevamos a cabo diferentes estrategias ya descritas y utilizadas por otros autores: por un lado, consideramos que el CAR estaba presente cuando la concentración de cortisol a los 30 minutos era al menos un 50 % superior con respecto a la basal [80]. De esta forma observamos que, en nuestro estudio, el CAR estaba presente en el 50,9 % de los pacientes antes de recibir el tratamiento y que esta cifra aumentaba hasta el 59,25 % tras los tres meses de terapia. Esta cifra, aunque sigue siendo inferior a la observada en la población sana, 75 % [77] aumentó casi un 10 % con el tratamiento con metilfenidato.

Discusión

Por otro lado, también calculamos el AUC. Para ello, representamos gráficamente las concentraciones medias de cortisol en cada uno de los tres puntos temporales (justo al despertar, 30 min y 60 min después) y calculamos el área bajo la curva empleando las fórmulas propuestas por Pruessner et al. [196]. Siguiendo este método, observamos que tras el tratamiento se producía un aumento estadísticamente significativo tanto del AUC_G como del AUC_I .

Con todo ello podemos inferir que, tras el tratamiento, los pacientes diagnosticados de TDAH presentaron una mejor respuesta al despertar del cortisol, ya que se produjo tanto un aumento significativo de la producción total de cortisol durante este periodo (AUC_G), como un aumento adecuado de los niveles de esta hormona (AUC_I).

Dado que el cortisol es la hormona por excelencia del día y está relacionada con el estrés y la actividad, y que el metilfenidato es un fármaco estimulante que aumenta el rendimiento diurno, parece razonable considerar que el aumento significativo del cortisol tras el tratamiento refleja su efecto clínico positivo. Todo ello, unido a la mejora observada en el perfil oxidativo e inflamatorio, podría conformar la base bioquímica que explicaría los avances clínicos manifestados en nuestros pacientes, como la potenciación de la concentración o la memoria y la mejora en el rendimiento académico, en el comportamiento social y en el manejo de actos impulsivos.

En cuanto al papel del desarrollo madurativo funcional, observamos que este efectivamente ejerció una influencia sobre algunos parámetros. En el grupo de pre púberes, los niveles de AOPP y LPO disminuyeron significativamente mientras que la actividad de la enzima catalasa aumentó, sin embargo, en el grupo de púberes se observó un descenso de los niveles de LPO y NOx pero también de la actividad enzimática de GPx. Hasta donde sabemos, no existe ningún otro estudio en la literatura que relacione el

impacto del desarrollo madurativo, el estado oxidativo y la inflamación en pacientes con TDAH. Estos hallazgos pueden apuntar a la hipótesis de que durante las diferentes etapas madurativas que conforman la pubertad, los sistemas de defensa antioxidante disminuyen, y esto se refleja en un aumento significativo de marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo. Por otro lado, la ausencia de cambios en α -Klotho entre los grupos pre púberes y púberes aquí descritos sugiere que esta vía no estaría implicada en los cambios descritos en los pacientes con TDAH.

No obstante, deberían realizarse más estudios para confirmar estas hipótesis y establecer conclusiones más sólidas en relación con los distintos factores etiológicos implicados en el TDAH y la relación compleja entre el desarrollo madurativo y los marcadores oxidativos e inflamatorios y sus implicaciones clínicas.

CONCLUSIONES

Primera: Los pacientes diagnosticados con TDAH presentan un estado de estrés oxidativo e inflamatorio que, en general, es independiente del estado puberal.

Segunda: El tratamiento con metilfenidato en pacientes diagnosticados con TDAH conduce a una mejora de la capacidad del sistema antioxidante endógeno, principalmente con el aumento de glutathion reductasa y catalasa.

Tercera: Como consecuencia, el tratamiento con metilfenidato en estos pacientes mejora el perfil redox, que se refleja en la disminución de varios marcadores de daño oxidativo incluyendo la reducción en AOPP, LPO, y NOx, lo que evidencia una disminución del daño oxidativo e inflamatorio.

Cuarta: La reactividad del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal mejora en pacientes con TDAH tratados con metilfenidato al producirse un aumento de la respuesta al despertar del cortisol (CAR), que se correlaciona con el aumento del área bajo la curva (AUC) y que indica una mejor respuesta al estrés.

Quinta: El efecto que el estadio madurativo ejerce sobre algunos de los marcadores aquí analizados podría estar relacionados con los cambios hormonales propios de la pubertad. El impacto que esto pueda ejercer sobre los diferentes mecanismos fisiopatológicos del TDAH abre nuevas líneas de investigación.

Sexta: Los resultados indican una mejora del estado redox, del perfil inflamatorio y de la respuesta del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal tras tres meses de tratamiento con metilfenidato. Dado que la mayoría de los estudios actuales se han realizado en

Conclusiones

modelos animales, nuestro estudio refleja un perfil mucho más fiable de la evolución de los pacientes con TDAH tratados con metilfenidato.

BIBLIOGRAFÍA

1. Still, G.F. Some Abnormal Psychical Conditions in Children. *Lancet* **1902**, *159*, 1008–1013, doi:10.1016/S0140-6736(01)74901-X.
2. Kramer, F.; Pollnow, H. Über Eine Hyperkinetische Erkrankung Im Kindesalter. *Eur Neurol* **1932**, *82*, 21–40, doi:10.1159/000164074.
3. Clements, S.D.; Peters, J.E. Minimal Brain Dysfunctions in the School-Age Child: Diagnosis and Treatment. *Arch Gen Psychiatry* **1962**, *6*, 185–197, doi:10.1001/archpsyc.1962.01710210001001.
4. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-III*; Washington DC, USA, 1980.
5. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-III-R*; Washington DC, USA, 1987.
6. World Health Organization. *The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders: Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines*; Geneva, Switzerland, 1992.
7. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5*; Arlington, USA, 2013.
8. Luo, Y.; Weibman, D.; Halperin, J.M.; Li, X. A Review of Heterogeneity in Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). *Front Hum Neurosci* **2019**, *13*, 1–12, doi:10.3389/fnhum.2019.00042.
9. Doernberg, E.; Hollander, E. Neurodevelopmental Disorders (ASD and ADHD): DSM-5, ICD-10, and ICD-11. *CNS Spectr* **2016**, *21*, 295–299, doi:10.1017/S1092852916000262.
10. Polanczyk, G. V.; Willcutt, E.G.; Salum, G.A.; Kieling, C.; Rohde, L.A. ADHD Prevalence Estimates across Three Decades: An Updated Systematic Review and Meta-Regression Analysis. *Int J Epidemiol* **2014**, *43*, 434–442, doi:10.1093/IJE/DYT261.
11. Catalá-López, F.; Peiró, S.; Ridao, M.; Sanfélix-Gimeno, G.; Gènova-Maleras, R.; Catalá, M.A. Prevalence of Attention Deficit Hyperactivity Disorder among Children and Adolescents in Spain: A Systematic Review and Meta-Analysis of

Bibliografía

- Epidemiological Studies. *BMC Psychiatry* **2012**, *12*, 1–13, doi:10.1186/1471-244X-12-168.
12. Polanczyk, G. V.; Salum, G.A.; Sugaya, L.S.; Caye, A.; Rohde, L.A. Annual Research Review: A Meta-Analysis of the Worldwide Prevalence of Mental Disorders in Children and Adolescents. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* **2015**, *56*, 345–365, doi:10.1111/JCPP.12381.
 13. Collantes, R.González.; Cascajo, A.R.-Sacristán.; García, J.Sánchez. Epidemiología Del TDAH. *Rev Esp Pediatr* **2015**, *71*, 58–61.
 14. Martínez-Raga, J. Repercusión En La Persona Adulta Del TDAH No Abordado En La Infancia y Adolescencia. *Revista de Formación Continuada de la Sociedad Española de Medicina de la Adolescencia. Adolescere* **2021**, *9*, 1–6.
 15. De Rossi, P.; Pretelli, I.; Menghini, D.; D’Aiello, B.; Di Vara, S.; Vicari, S. Gender-Related Clinical Characteristics in Children and Adolescents with ADHD. *J Clin Med* **2022**, *11*, 385, doi:10.3390/jcm11020385.
 16. Gaub, M.; Carlson, C.L. Gender Differences in ADHD: A Meta-Analysis and Critical Review. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **1997**, *36*, 1036–1045, doi:10.1097/00004583-199708000-00011.
 17. Wilens, T.E.; Biederman, J.; Faraone, S. V; Westerberg, D.; Spencer, T.J. Presenting ADHD Symptoms, Subtypes, and Comorbid Disorders in Clinically Referred Adults with ADHD. *J Clin Psychiatry* **2009**, *70*, 1557–1562, doi:10.4088/JCP.08m04785pur.
 18. Cornejo Ochoa, J.W.; Osío, O.; Sánchez, Y.; Carrizosa, J.; Sánchez, G.; Grisales, H.; Castillo-Parra, H.; Holguín, J. Prevalence of Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Colombian Children and Teenagers. *Rev Neurol* **2005**, *40*, 716–722, doi:10.33588/rn.4012.2004569.
 19. Vicario, M.H.; Santos, L.S. Trastorno Por Déficit de Atención e Hiperactividad. Manifestaciones Clínicas y Evolución. Diagnóstico Desde La Evidencia Científica. *Pediatría Integral* **2014**, *18*, 609–623.

20. Faraone, S. V.; Biederman, J.; Mick, E. The Age-Dependent Decline of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A Meta-Analysis of Follow-up Studies. *Psychol Med* **2006**, *36*, 159–165, doi:10.1017/S003329170500471X.
21. Kooij, J.J.S.; Buitelaar, J.K.; Furer, J.W.; Rijnders, C.A.; Hodiament, P.P. Internal and External Validity of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder in a Population-Based Sample of Adults. *Psychol Med* **2005**, *35*, 817–827, doi:10.1017/s003329170400337x.
22. Pisón, J.L. TDA/TDAH. Un Problema de Salud Pública, Con Tratamiento Farmacológico Eficaz. *Boletín de la Sociedad de Pediatría de Aragón, La Rioja y Soria* **2022**, *52*, 121–122.
23. Polanczyk, G.; De Lima, M.S.; Horta, B.L.; Biederman, J.; Rohde, L.A. The Worldwide Prevalence of ADHD: A Systematic Review and Metaregression Analysis. *American Journal of Psychiatry* **2007**, *164*, 942–948, doi:10.1176/ajp.2007.164.6.942.
24. Wolraich, M.L.; Wibbelsman, C.J.; Brown, T.E.; Evans, S.W.; Gotlieb, E.M.; Knight, J.R.; Ross, E.C.; Shubiner, H.H.; Wender, E.H.; Wilens, T. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder among Adolescents: A Review of the Diagnosis, Treatment, and Clinical Implications. *Pediatrics* **2005**, *115*, 1734–1746, doi:10.1542/peds.2004-1959.
25. Pelham, W.E.; Foster, E.M.; Robb, J.A. The Economic Impact of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Children and Adolescents. *J Pediatr Psychol* **2007**, *32*, 711–727, doi:10.1093/jpepsy/jsm022.
26. Daley, D.; Jacobsen, R.H.; Lange, A.-M.; Sørensen, A.; Walldorf, J. The Economic Burden of Adult Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A Sibling Comparison Cost Analysis. *European Psychiatry* **2019**, *61*, 41–48, doi:10.1016/j.eurpsy.2019.06.011.
27. Spencer, T.J.; Biederman, J.; Mick, E. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Diagnosis, Lifespan, Comorbidities, and Neurobiology. *J Pediatr Psychol* **2007**, *32*, 631–642, doi:10.1016/j.ambp.2006.07.006.

Bibliografía

28. Vázquez-González, D.; Carreón-Trujillo, S.; Alvarez-Arellano, L.; Abarca-Merlin, D.M.; Domínguez-López, P.; Salazar-García, M.; Corona, J.C. A Potential Role for Neuroinflammation in ADHD. In *Neuroinflammation, Gut-Brain Axis and Immunity in Neuropsychiatric Disorders. Advances in Experimental Medicine and Biology*; Kim, Y.-K., Ed.; Springer: Singapore, 2023; Vol. 1411, pp. 327–356.
29. Matthews, M.; Nigg, J.T.; Fair, D.A. Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Curr Top Behav Neurosci* **2014**, *16*, 235–266, doi:10.1007/7854_2013_249.
30. Faraone, S. V.; Perlis, R.H.; Doyle, A.E.; Smoller, J.W.; Goralnick, J.J.; Holmgren, M.A.; Sklar, P. Molecular Genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry* **2005**, *57*, 1313–1323, doi:10.1016/J.BIOPSYCH.2004.11.024.
31. Sánchez-Mora, C.; Ribasés, M.; Mulas, F.; Soutullo, C.; Sans, A.; Pàmias, M.; Casas, M.; Ramos-Quiroga, A.; Ribasés, M.; Casas, M.; et al. Bases Genéticas Del Trastorno Por Déficit de Atención/Hiperactividad. *Rev Neurol* **2012**, *55*, 609–618, doi:10.33588/rn.5510.2012344.
32. Franke, B.; Vasquez, A.A.; Johansson, S.; Hoogman, M.; Romanos, J.; Boreatti-Hümmer, A.; Heine, M.; Jacob, C.P.; Lesch, K.P.; Casas, M.; et al. Multicenter Analysis of the SLC6A3/DAT1 VNTR Haplotype in Persistent ADHD Suggests Differential Involvement of the Gene in Childhood and Persistent ADHD. *Neuropsychopharmacology* *2010* *35:3* **2009**, *35*, 656–664, doi:10.1038/npp.2009.170.
33. Grünblatt, E.; Anna, ; Werling, M.; Roth, · Alexander; Romanos, M.; Walitza, · Susanne Association Study and a Systematic Meta-Analysis of the VNTR Polymorphism in the 3'-UTR of Dopamine Transporter Gene and Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *J Neural Transm* **2019**, *126*, 517–529, doi:10.1007/s00702-019-01998-x.
34. Trejo, S.; Toscano-Flores, J.J.; Matute, E. The Application of Clinical Genetics Dovepress Hardy-Weinberg Equilibrium Analysis of the 48 Bp VNTr in the III Exon of the DrD4 Gene in a Sample of Parents of ADhD Cases. *Appl Clin Genet* **2015**, *8*, 133–136, doi:10.2147/TACG.S74300.
35. Gizer, I.R.; Ficks, C.; Waldman, I.D. Candidate Gene Studies of ADHD: A Meta-Analytic Review. *Hum Genet* **2009**, *126*, 51–90, doi:10.1007/s00439-009-0694-x.

36. Morell, B.R.; Hernández, S.; Rodríguez, Ó.H.; Gastaminza, X.; Méndez, M. del R.C.; Castrillo, J.; Morell, B.R.; Hernández, S.; Rodríguez, Ó.H.; Gastaminza, X.; et al. Efectividad Cognitiva Del Metilfenidato y de La Atomoxetina En El Trastorno Por Déficit de Atención Con Hiperactividad: *Revista de Psiquiatría Infanto-Juvenil* **2016**, *33*, 367–377, doi:10.31766/REVPSIJ.V33N3A1.
37. Ramírez, D.S.R. Etiopatogenia Del Trastorno de Déficit de Atención Con Hiperactividad. *Canarias Pediátrica* **2007**, *31*, 71–78.
38. Hou, Y. wei; Xiong, P.; Gu, X.; Huang, X.; Wang, M.; Wu, J. Association of Serotonin Receptors with Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr Med Sci* **2018**, *38*, 538–551, doi:10.1007/S11596-018-1912-3.
39. Curran, S.; Purcell, S.; Craig, I.; Asherson, P.; Sham, P. The Serotonin Transporter Gene as a QTL for ADHD. *Am J Med Genet* **2005**, *134-B*, 42–47, doi:10.1002/AJMG.B.30118.
40. Cardo, E.; Servera, M. Attention Deficit Hyperactivity Disorder: The State of the Matter and Further Research Approaches. *Rev Neurol* **2008**, *46*, 365–372, doi:10.33588/rn.4606.2007529.
41. Silva, D.; Colvin, L.; Hagemann, E.; Bower, C. Environmental Risk Factors by Gender Associated With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Pediatrics* **2014**, *133*, 14–22, doi:10.1542/PEDS.2013-1434.
42. Sciberras, E.; Mulraney, M.; Silva, D.; Coghill, D. Prenatal Risk Factors and the Etiology of ADHD—Review of Existing Evidence. *Curr Psychiatry Rep* **2017**, *19*, 1–8, doi:10.1007/s11920-017-0753-2.
43. Thapar, A.; Cooper, M.; Jefferies, R.; Stergiakouli, E. What Causes Attention Defi Cit Hyperactivity Disorder? *Archives of disease in childhood* **2012**, *97*, 260–265, doi:10.1136/archdischild-2011-300482.
44. Banerjee, T. Das; Middleton, F.; Faraone, S. V. Environmental Risk Factors for Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Acta Paediatr* **2007**, *96*, 1269–1274, doi:10.1111/J.1651-2227.2007.00430.X.

Bibliografía

45. Mann, J.R.; McDermott, S. Are Maternal Genitourinary Infection and Pre-Eclampsia Associated with ADHD in School-Aged Children? *J Atten Disord* **2011**, *15*, 667–673, doi:10.1177/1087054710370566.
46. Almeida Montes, L.G.; Ricardo-Garcell, J.; Prado Alcántara, H.; Martínez García, R.B. Alteraciones Estructurales Encefálicas En El Trastorno Por Déficit de Atención e Hiperactividad: Una Actualización. Primera Parte. *Salud Mental* **2009**, *32*, 503–512.
47. Bakker, L.; Rubiales, J. Interacción de Factores Genéticos y Ambientales En El Trastorno Por Déficit de Atención Con Hiperactividad. Estudio de Caso de Gemelos. *Revista Chilena de Neuropsicología* **2010**, *5*, 227–237.
48. Lavigne Cerván, R.; Romero Pérez, J.F. *El TDAH: ¿Qué Es?, ¿Qué Lo Causa?, ¿Cómo Evaluarlo y Tratarlo?*; Madrid, España, 2010.
49. Castellanos, F.X.; Acosta, M.T. Neuroanatomía Del Trastorno Por Déficit de Atención Con Hiperactividad. *Rev Neurol* **2004**, *38*, 131–136, doi:10.33588/rn.38S1.2004086.
50. Fernández-Mayoralas, D.M.; Fernández-Jaén, A.; García-Segura, J.M.; Quiñones-Tapia, D. Neuroimagen En El Trastorno Por Déficit de Atención/Hiperactividad. *Rev Neurol* **2010**, *50*, 125–133, doi:10.33588/rn.50S03.2009762.
51. Almeida, L.G.; Ricardo-Garcell, J.; Prado, H.; Barajas, L.; Fernández-Bouzas, A.; Ávila, D.; Martínez, R.B. Reduced Right Frontal Cortical Thickness in Children, Adolescents and Adults with ADHD and Its Correlation to Clinical Variables: A Cross-Sectional Study. *J Psychiatr Res* **2010**, *44*, 1214–1223, doi:10.1016/j.jpsychires.2010.04.026.
52. Shaw, P.; Eckstrand, K.; Sharp, W.; Blumenthal, J.; Lerch, J.P.; Greenstein, D.; Clasen, L.; Evans, A.; Giedd, J.; Rapoport, J.L. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Is Characterized by a Delay in Cortical Maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 19649–19654, doi:10.1073/pnas.0707741104.
53. Kesner, R.P.; Churchwell, J.C. An Analysis of Rat Prefrontal Cortex in Mediating Executive Function. *Neurobiol Learn Mem* **2011**, *96*, 417–431, doi:10.1016/j.nlm.2011.07.002.

54. Gallo, E.F.; Posner, J. Moving towards Causality in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: Overview of Neural and Genetic Mechanisms. *Lancet Psychiatry* **2016**, *3*, 555–567, doi:10.1016/S2215-0366(16)00096-1.
55. Posner, J.; Polanczyk, G.; Sonuga-Barke, E. Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Lancet* **2020**, *395*, 450–462, doi:10.1016/S0140-6736(19)33004-1.
56. Quintero, J.; Castaño de la Mota, C. Introducción y Etiopatogenia Del Trastorno Por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH). *Pediatría Integral* **2014**, *9*, 600–608.
57. Russell, V.A. Overview of Animal Models of Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). *Curr Protoc Neurosci* **2011**, *54*, 9–35, doi:10.1002/0471142301.ns0935s54.
58. Castellanos, F.X.; Tannock, R. Neuroscience of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: The Search for Endophenotypes. *Nat Rev Neurosci* **2002**, *3*, 617–628, doi:10.1038/nrn896.
59. Klein, M.O.; Battagello, D.S.; Cardoso, A.R.; Hauser, D.N.; Bittencourt, J.C.; Correa, R.G. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell Mol Neurobiol* **2019**, *39*, 31–59, doi:10.1007/s10571-018-0632-3.
60. Del Campo, N.; Chamberlain, S.R.; Sahakian, B.J.; Robbins, T.W. The Roles of Dopamine and Noradrenaline in the Pathophysiology and Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry* **2011**, *69*, 145–157, doi:10.1016/J.BIOPSYCH.2011.02.036.
61. Prince, J. Catecholamine Dysfunction in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder an Update. *J Clin Psychopharmacol* **2008**, *28*, 39–45, doi:10.1097/JCP.0B013E318174F92A.
62. Fernández López, M.L. Metabolismo de Los Indoles, Eje Cerebroentérico y S100β En El TDAH: Modificaciones Por Metilfenidato. Tesis Doctoral, Universidad de Granada: Granada, España, 2020.
63. Anesiadou, S.; Makris, G.; Michou, M.; Bali, P.; Papassotiriou, I.; Apostolakou, F.; Korkoliakou, P.; Papageorgiou, C.; Chrousos, G.; Pervanidou, P. Salivary Cortisol and Alpha-Amylase Daily Profiles and Stress Responses to an Academic

Bibliografía

- Performance Test and a Moral Cognition Task in Children with Neurodevelopmental Disorders. *Stress and Health* **2021**, *37*, 45–59, doi:10.1002/SMI.2971.
64. Palacio, A.V.; González, V.B.; Maya, G.C. Evaluación de La Función Del Eje Hipotálamohipófisis-Adrenal En Niños Tratados Con Esteroides. *Medicina y Laboratorio* **2020**, *19*, 111–125.
65. Jessop, D.S.; Turner-Cobb, J.M. Measurement and Meaning of Salivary Cortisol: A Focus on Health and Disease in Children. *Stress* **2008**, *11*, 1–14, doi:10.1080/10253890701365527.
66. Kaneko, M.; Hoshino, Y.; Hashimoto, S.; Okano, T.; Kumashiro, H. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function in Children with Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *J Autism Dev Disord* **1993**, *23*, 59–65, doi:10.1007/BF01066418.
67. Van West, D.; Claes, S.; Deboutte, D. Differences in Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis Functioning among Children with ADHD Predominantly Inattentive and Combined Types. *Eur Child Adolesc Psychiatry* **2009**, *18*, 543–553, doi:10.1007/s00787-009-0011-1.
68. Fairchild, G. Hypothalamic–Pituitary–Adrenocortical Axis Function in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. In *Behavioral Neuroscience of Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Its Treatment*; Stanford, C., Tannock, R., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2010; Vol. 9, pp. 93–111.
69. Isaksson, J.; Nilsson, K.W.; Nyberg, F.; Hogmark, Å.; Lindblad, F. Cortisol Levels in Children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Psychiatr Res* **2012**, *46*, 1398–1405, doi:10.1016/j.jpsychires.2012.08.021.
70. Blomqvist, M.; Holmberg, K.; Lindblad, F.; Fernell, E.; Ek, U.; Dahllöf, G. Salivary Cortisol Levels and Dental Anxiety in Children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Eur J Oral Sci* **2007**, *115*, 1–6, doi:10.1111/j.1600-0722.2007.00423.x.
71. Kariyawasam, S.H.; Zaw, F.; Handley, S.L. Reduced Salivary Cortisol in Children with Comorbid Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Oppositional Defiant Disorder. *Neuroendocrinology Letters* **2002**, *23*, 45–48.

-
72. Ma, L.; Chen, Y.-H.; Chen, H.; Liu, Y.-Y.; Wang, Y.-X. The Function of Hypothalamus–Pituitary–Adrenal Axis in Children with ADHD. *Brain Res* **2011**, *1368*, 159–162, doi:10.1016/j.brainres.2010.10.045.
73. Pesonen, A.-K.; Kajantie, E.; Jones, A.; Pyhälä, R.; Lahti, J.; Heinonen, K.; Eriksson, J.G.; Strandberg, T.E.; Räikkönen, K. Symptoms of Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Children Are Associated with Cortisol Responses to Psychosocial Stress but Not with Daily Cortisol Levels. *J Psychiatr Res* **2011**, *45*, 1471–1476, doi:10.1016/j.jpsychires.2011.07.002.
74. Wang, L.-J.; Huang, Y.-S.; Hsiao, C.-C.; Chiang, Y.-L.; Wu, C.-C.; Shang, Z.-Y.; Chen, C.-K. Salivary Dehydroepiandrosterone, but Not Cortisol, Is Associated with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *The World Journal of Biological Psychiatry* **2011**, *12*, 99–109, doi:10.3109/15622975.2010.512090.
75. Hernández-Quiceno, S.; Uribe-Bojanini, E.; Alfaro-Velásquez, J.M.; Campuzano-Maya, G.; Salazar-Peláez, L.M. Cortisol: Mediciones de Laboratorio y Aplicación Clínica. *Medicina y Laboratorio* **2016**, *22*, 147–164, doi:10.36384/01232576.74.
76. Pruessner, J.C.; Wolf, O.T.; Hellhammer, D.H.; Buske-Kirschbaum, A.; Von Auer, K.; Jobst, S.; Kaspers, F.; Kirschbaum, C. Free Cortisol Levels after Awakening: A Reliable Biological Marker for the Assessment of Adrenocortical Activity. *Life Sci* **1997**, *61*, 2539–2549, doi:10.1016/s0024-3205(97)01008-4.
77. Fries, E.; Dettenborn, L.; Kirschbaum, C. The Cortisol Awakening Response (CAR): Facts and Future Directions. *International Journal of Psychophysiology* **2009**, *72*, 67–73, doi:10.1016/j.ijpsycho.2008.03.014.
78. Stalder, T.; Kirschbaum, C.; Kudielka, B.M.; Adam, E.K.; Pruessner, J.C.; Wüst, S.; Dockray, S.; Smyth, N.; Evans, P.; Hellhammer, D.H.; et al. Assessment of the Cortisol Awakening Response: Expert Consensus Guidelines. *Psychoneuroendocrinology* **2016**, *63*, 414–432, doi:10.1016/j.psyneuen.2015.10.010.
79. Clow, A.; Hucklebridge, F.; Stalder, T.; Evans, P.; Thorn, L. The Cortisol Awakening Response: More than a Measure of HPA Axis Function. *Neurosci Biobehav Rev* **2010**, *35*, 97–103, doi:10.1016/j.neubiorev.2009.12.011.

Bibliografía

80. Wust, S.; Wolf, J.; Hellhammer, D.H.; Federenko, I.; Schommer, N.; Kirschbaum, C. The Cortisol Awakening Response-Normal Values and Confounds. *Noise Health* **2000**, *2*, 79–88.
81. Wilhelm, I.; Born, J.; Kudielka, B.M.; Schlotz, W.; Wüst, S. Is the Cortisol Awakening Rise a Response to Awakening? *Psychoneuroendocrinology* **2007**, *32*, 358–366, doi:10.1016/j.psyneuen.2007.01.008.
82. Stalder, T.; Lupien, S.J.; Kudielka, B.M.; Adam, E.K.; Pruessner, J.C.; Wüst, S.; Dockray, S.; Smyth, N.; Evans, P.; Kirschbaum, C. Evaluation and Update of the Expert Consensus Guidelines for the Assessment of the Cortisol Awakening Response (CAR). *Psychoneuroendocrinology* **2022**, 1–11, doi:10.1016/j.psyneuen.2022.105946.
83. Shibuya, I.; Nagamitsu, S.; Okamura, H.; Ozono, S.; Chiba, H.; Ohya, T.; Yamashita, Y.; Matsuishi, T. High Correlation between Salivary Cortisol Awakening Response and the Psychometric Profiles of Healthy Children. *Biopsychosoc Med* **2014**, *8*, 1–4, doi:10.1186/1751-0759-8-9.
84. Northover, C.; Thapar, A.; Langley, K.; Fairchild, G.; van Goozen, S.H.M. Cortisol Levels at Baseline and under Stress in Adolescent Males with Attention-Deficit Hyperactivity Disorder, with or without Comorbid Conduct Disorder. *Psychiatry Res* **2016**, *242*, 130–136, doi:10.1016/j.psychres.2016.05.052.
85. Drechsler, R.; Brem, S.; Brandeis, D.; Grünblatt, E.; Berger, G.; Walitza, S. ADHD: Current Concepts and Treatments in Children and Adolescents. *Neuropediatrics* **2020**, *51*, 315–335, doi:10.1055/s-0040-1701658.
86. WHO ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics. Available online: <https://icd.who.int/browse/2024-01/mms/en#821852937> (accessed on 22 February 2024).
87. Harrison, J.E.; Weber, S.; Jakob, R.; Chute, C.G. ICD-11: An International Classification of Diseases for the Twenty-First Century. *BMC Med Inform Decis Mak* **2021**, *21*, 1–10, doi:10.1186/s12911-021-01534-6.
88. Delgado Reyes, A.C.; Agudelo Hernández, A.F. Trastornos Del Neurodesarrollo: Una Comparación Entre El DSM-5 y La CIE-11. *Psicoespacios* **2021**, *15*, 1–16, doi:10.25057/21452776.1417.

89. Farré-Riba, A.; Narbona, J. Escalas de Conners En La Evaluación Del Trastorno Por Déficit de Atención Con Hiperactividad: Nuevo Estudio Factorial En Niños Españoles. *Rev Neurol* **1997**, *25*, 200–204, doi:10.33588/rn.25138.97756.
90. Gioia, G.A.; Isquith, P.K.; Guy, S.C.; Kenworthy, L. Test Review Behavior Rating Inventory of Executive Function. *Child Neuropsychology* **2000**, *6*, 235–238, doi:10.1076/chin.6.3.235.3152.
91. Wolraich, M.L.; Bard, D.E.; Neas, B.; Doffing, M.; Beck, L. The Psychometric Properties of the Vanderbilt Attention-Deficit Hyperactivity Disorder Diagnostic Teacher Rating Scale in a Community Population. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics* **2013**, *34*, 83–93, doi:10.1097/DBP.0b013e31827d55c3.
92. Fernández-Mayoralas, D.M.; Fernández-Perrone, A.L.; Muñoz-Jareño, N.; Fernández-Jaén, A. Actualización En El Tratamiento Farmacológico Del Trastorno Por Déficit de Atención/Hiperactividad: Lisdexanfetamina y Guanfacina de Liberación Retardada. *Rev Neurol* **2017**, *64*, 1–8, doi:10.33588/rn.64s02.2017069.
93. Vicario, H. Situación En España Del Trastorno Por Déficit de Atención e Hiperactividad. *Pediatría Integral* **2014**, *9*, 595–597.
94. García Campayo, J.; Santed Germán, M.Á.; Cerdán Lanero, C.; Alda Díez, M. Tratamiento Del Trastorno Por Déficit de Atención. *Aten Primaria* **2007**, *39*, 671–674, doi:10.1157/13113962.
95. Mehta, S.; Mehta, V.; Mehta, S.; Shah, D.; Motiwala, A.; Vardhan, J.; Mehta, N.; Mehta, D. Multimodal Behavior Program for ADHD Incorporating Yoga and Implemented by High School Volunteers: A Pilot Study. *ISRN Pediatr* **2011**, *2011*, 1–5, doi:10.5402/2011/780745.
96. Groom, M.J.; Cortese, S. Current Pharmacological Treatments for ADHD. In *New Discoveries in the Behavioral Neuroscience of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. Current Topics in Behavioral Neurosciences*; Stanford, S.C., Sciberras, E., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2022; Vol. 57, pp. 19–50.
97. Fernández Mayoralas, D.M.; Calleja Pérez, B.; Fernández Jaén, A. Novedades En El Tratamiento Del TDAH. *Revista de Formación Continuada de la Sociedad Española de Medicina de la Adolescencia, Adolescere* **2019**, *7*, 67–73.

Bibliografía

98. Soutullo Esperón, C.; Álvarez Gómez, M. Tratamiento Farmacológico Del TDAH Basado En La Evidencia. *Pediatría Integral* **2014**, *18*, 634–642.
99. Advokat, C. What Exactly Are the Benefits of Stimulants for ADHD? *J Atten Disord* **2009**, *12*, 495–498, doi:10.1177/1087054708329781.
100. Papaseit, E.; García-Algar, O.; Simó, S.; Pichini, S.; Farré, M. Metilfenidato En El Tratamiento Del Trastorno de Déficit de Atención Con Hiperactividad En Pediatría: Monitorización En Matrices Biológicas. *An Pediatr* **2013**, *78*, 1–10, doi:10.1016/j.anpedi.2012.08.015.
101. Edinoff, A.N.; Akuly, H.A.; Wagner, J.H.; Boudreaux, M.A.; Kaplan, L.A.; Yusuf, S.; Neuchat, E.E.; Cornett, E.M.; Boyer, A.G.; Kaye, A.M. Viloxazine in the Treatment of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Front Psychiatry* **2021**, *12*, 1–7, doi:10.3389/fpsy.2021.789982.
102. San Sebastián Cabasés, J.; Quintero-Gutiérrez Del Álamo, F. Tratamiento Multimodal Del Trastorno Por Déficit de Atención Con Hiperactividad (TDAH). *Rev Esp Pediatr* **2005**, *61*, 503–514.
103. Fenollar Iváñez, F.M.; Gómez Sánchez, J.A.; Muñoz Ruiz, A. Tratamiento No Farmacológico Del Trastorno Por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) y Su Abordaje En El Entorno Escolar. *Rev Esp Pediatr* **2015**, *71*, 90–97.
104. Ramos Cortés, A. Estudio Epidemiológico Del TDAH e Investigación de Variables Predictoras. Tesis Doctoral, Universidad de Málaga: Málaga, España, 2016.
105. Wakefield, J.C. Diagnostic Issues and Controversies in DSM-5: Return of the False Positives Problem. *Annu Rev Clin Psychol* **2016**, *12*, 105–132, doi:10.1146/annurev-clinpsy-032814-112800.
106. Zabaleta, O.G. Los Problemas y Limitaciones Del DSM-5. *Dilemata* **2018**, *27*, 367–391.
107. Ouadih-Moran, M.; Muñoz-Hoyos, A.; D'Marco, L.; Molina-Carballo, A.; Seiquer, I.; Checa-Ros, A. Is S100B Involved in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD)? Comparisons with Controls and Changes Following a Triple Therapy Containing Methylphenidate, Melatonin and ω -3 PUFAs. *Nutrients* **2023**, *15*, 1–14, doi: 10.3390/nu15030712.

-
108. Fernández-López, L.; Molina-Carballo, A.; Cubero-Millán, I.; Checa-Ros, A.; Machado-Casas, I.; Blanca-Jover, E.; Jerez-Calero, A.; Madrid-Fernández, Y.; Uberos, J.; Muñoz-Hoyos, A. Indole Tryptophan Metabolism and Cytokine S100B in Children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Daily Fluctuations, Responses to Methylphenidate, and Interrelationship with Depressive Symptomatology. *J Child Adolesc Psychopharmacol* **2020**, *30*, 177–188, doi:10.1089/cap.2019.0072.
109. Molina-Carballo, A.; Justicia-Martínez, F.; Moreno-Madrid, F.; Cubero-Millán, I.; Machado-Casas, I.; Moreno-García, L.; León, J.; Luna-del-Castillo, J.-D.; Uberos, J.; Muñoz-Hoyos, A. Differential Responses of Two Related Neurosteroids to Methylphenidate Based on ADHD Subtype and the Presence of Depressive Symptomatology. *Psychopharmacology* **2014**, *231*, 3635–3645, doi:10.1007/s00213-014-3514-5.
110. Maayan, R.; Yoran-Hegesh, R.; Strous, R.; Nechmad, A.; Averbuch, E.; Weizman, A.; Spivak, B. Three-Month Treatment Course of Methylphenidate Increases Plasma Levels of Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Dehydroepiandrosterone-Sulfate (DHEA-S) in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Neuropsychobiology* **2003**, *48*, 111–115, doi:10.1159/000073626.
111. Rosado-Pérez J, M.-N.V. Mini-Revisión: Inflamación Crónica y Estrés Oxidativo En La Diabetes Mellitus. *Bioquímica* **2007**, *32*, 58–69.
112. Liguori, I.; Russo, G.; Curcio, F.; Bulli, G.; Aran, L.; Della-Morte, D.; Gargiulo, G.; Testa, G.; Cacciatore, F.; Bonaduce, D. Oxidative Stress, Aging, and Diseases. *Clin Interv Aging* **2018**, *13*, 757–772, doi:10.2147/CIA.S158513.
113. Das, A.K.; Kalra, S.; Punyani, H.; Deshmukh, S.; Taur, S. ‘Oxidative Stress’-A New Target in the Management of Diabetes Mellitus. *J Family Med Prim Care* **2023**, *12*, 2552–2557, doi:10.4103/jfmpe.jfmpe_2249_21.
114. Augusto, O.; Miyamoto, S. Oxygen Radicals and Related Species. In *Principles of Free Radical Biomedicine*; Pantopoulos, K., Schipeer, H.M., Eds.; Nova Science Publishers, Inc: New York, USA, 2011; Vol. 1, pp. 1–23.

Bibliografia

115. Phaniendra, A.; Jestadi, D.B.; Periyasamy, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* **2015**, *30*, 11–26, doi:10.1007/s12291-014-0446-0.
116. Zarkovic, N. Roles and Functions of ROS and RNS in Cellular Physiology and Pathology. *Cells* **2020**, *9*, 1–5, doi:10.3390/cells9030767.
117. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *Int J Biochem Cell Biol* **2007**, *39*, 44–84, doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.
118. Alvarez, B.; Radi, R. Peroxynitrite Reactivity with Amino Acids and Proteins. *Amino Acids* **2003**, *25*, 295–311, doi:10.1007/s00726-003-0018-8.
119. Indo, H.P.; Davidson, M.; Yen, H.-C.; Suenaga, S.; Tomita, K.; Nishii, T.; Higuchi, M.; Koga, Y.; Ozawa, T.; Majima, H.J. Evidence of ROS Generation by Mitochondria in Cells with Impaired Electron Transport Chain and Mitochondrial DNA Damage. *Mitochondrion* **2007**, *7*, 106–118, doi:10.1016/j.mito.2006.11.026.
120. Zhao, R.; Jiang, S.; Zhang, L.; Yu, Z. Mitochondrial Electron Transport Chain, ROS Generation and Uncoupling. *Int J Mol Med* **2019**, *44*, 3–15, doi:10.3892/ijmm.2019.4188.
121. de Almeida, A.J.P.O.; de Oliveira, J.C.P.L.; da Silva Pontes, L.V.; de Souza Júnior, J.F.; Gonçalves, T.A.F.; Dantas, S.H.; de Almeida Feitosa, M.S.; Silva, A.O.; de Medeiros, I.A. ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and Its Implications in Aging Pathways. *Oxid Med Cell Longev* **2022**, *2022*, 1–23, doi:10.1155/2022/1225578.
122. Kirkham, P. Oxidative Stress and Macrophage Function: A Failure to Resolve the Inflammatory Response. *Biochem Soc Trans* **2007**, *35*, 284–287, doi:10.1042/BST0350284.
123. Svensk, A.-M.; Soini, Y.; Pääkkö, P.; Hirvikoski, P.; Kinnula, V.L. Differential Expression of Superoxide Dismutases in Lung Cancer. *Am J Clin Pathol* **2004**, *122*, 395–404, doi:10.1309/A45Q-HB0Q-RRX6-CT9A.
124. Jomova, K.; Raptova, R.; Alomar, S.Y.; Alwasel, S.H.; Nepovimova, E.; Kuca, K.; Valko, M. Reactive Oxygen Species, Toxicity, Oxidative Stress, and Antioxidants:

-
- Chronic Diseases and Aging. *Arch Toxicol* **2023**, *97*, 2499–2574, doi:10.1007/s00204-023-03562-9.
125. Bhattacharyya, A.; Chattopadhyay, R.; Mitra, S.; Crowe, S.E. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiol Rev* **2014**, *94*, 329–354, doi:10.1152/physrev.00040.2012.
126. Kohen, R.; Nyska, A. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol Pathol* **2002**, *30*, 620–650, doi:10.1080/01926230290166724.
127. Ighodaro, O.M.; Akinloye, O.A. First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX): Their Fundamental Role in the Entire Antioxidant Defence Grid. *Alexandria Journal of Medicine* **2018**, *54*, 287–293, doi:10.1016/j.ajme.2017.09.001.
128. Arana Molina, C. Melatonina, Estrés Oxidativo y Osteointegración En La Cavidad Oral. Tesis Doctoral, Universidad de Granada: Granada, España, 2006.
129. Altobelli, G.G.; Van Noorden, S.; Balato, A.; Cimini, V. Copper/Zinc Superoxide Dismutase in Human Skin: Current Knowledge. *Front Med* **2020**, *7*, 1–8, doi:10.3389/fmed.2020.00183.
130. Acevedo León, D. Relación Del Estrés Oxidativo y Lesión Del Material Genético Con La Patogenia Del Tumor Colorrectal. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia: Valencia, España, 2019.
131. Lucas Azorín, J. Valoración de Marcadores Inflamatorios y Estrés Oxidativo En Un Grupo de Pacientes Con Enfermedad Periimplantaria. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia: Murcia, España, 2015.
132. Escrig Fernández, R. Estrés Oxidativo En La Hipoxia/Re-Oxigenación de La Transición Fetal – Neonatal: Reanimación Del Recién Nacido Prematuro Con Concentraciones Bajas de Oxígeno. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia: Valencia, España, 2012.

Bibliografía

133. Couto, N.; Wood, J.; Barber, J. The Role of Glutathione Reductase and Related Enzymes on Cellular Redox Homeostasis Network. *Free Radic Biol Med* **2016**, *95*, 27–42, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028.
134. Freudenthal, B.D.; Beard, W.A.; Perera, L.; Shock, D.D.; Kim, T.; Schlick, T.; Wilson, S.H. Uncovering the Polymerase-Induced Cytotoxicity of an Oxidized Nucleotide. *Nature* **2015**, *517*, 635–639, doi:10.1038/nature13886.
135. Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D.P. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem* **2017**, *86*, 715–748, doi:10.1146/annurev-biochem-061516-045037.
136. Pisoschi, A.M.; Pop, A. The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review. *Eur J Med Chem* **2015**, *97*, 55–74, doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
137. Vázquez Tarragón, A. Perfil Metabólico y de Estrés Oxidativo En La Obesidad Mórbida y Su Modulación Tras Cirugía Bariátrica: Identificación de Nuevos Marcadores Clínicos. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia: Valencia, España, 2016.
138. Montuschi, P.; Barnes, P.J.; Roberts, L.J. Isoprostanes: Markers and Mediators of Oxidative Stress. *The FASEB Journal* **2004**, *18*, 1791–1800, doi:10.1096/fj.04-2330rev.
139. Zhang, X.; Hou, L.; Guo, Z.; Wang, G.; Xu, J.; Zheng, Z.; Sun, K.; Guo, F. Lipid Peroxidation in Osteoarthritis: Focusing on 4-Hydroxynonenal, Malondialdehyde, and Ferroptosis. *Cell Death Discov* **2023**, *9*, 1–13, doi:10.1038/s41420-023-01613-9.
140. Higdon, A.; Diers, A.R.; Oh, J.Y.; Landar, A.; Darley-USmar, V.M. Cell Signalling by Reactive Lipid Species: New Concepts and Molecular Mechanisms. *Biochemical Journal* **2012**, *442*, 453–464, doi:10.1042/BJ20111752.
141. Esterbauer, H.; Schaur, R.J.; Zollner, H. Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes. *Free Radic Biol Med* **1991**, *11*, 81–128, doi:10.1016/0891-5849(91)90192-6.
142. Mas-Bargues, C.; Escriva, C.; Dromant, M.; Borrás, C.; Vina, J. Lipid Peroxidation as Measured by Chromatographic Determination of Malondialdehyde. Human

- Plasma Reference Values in Health and Disease. *Arch Biochem Biophys* **2021**, *709*, 1–7, doi:10.1016/j.abb.2021.108941.
143. Tsikas, D. Assessment of Lipid Peroxidation by Measuring Malondialdehyde (MDA) and Relatives in Biological Samples: Analytical and Biological Challenges. *Anal Biochem* **2017**, *524*, 13–30, doi:10.1016/j.ab.2016.10.021.
144. Headlam, H.A.; Davies, M.J. Markers of Protein Oxidation: Different Oxidants Give Rise to Variable Yields of Bound and Released Carbonyl Products. *Free Radic Biol Med* **2004**, *36*, 1175–1184, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.017.
145. Poulsen, H.E.; Specht, E.; Broedbaek, K.; Henriksen, T.; Ellervik, C.; Mandrup-Poulsen, T.; Tonnesen, M.; Nielsen, P.E.; Andersen, H.U.; Weimann, A. RNA Modifications by Oxidation: A Novel Disease Mechanism? *Free Radic Biol Med* **2012**, *52*, 1353–1361, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.009.
146. Voulgaridou, G.-P.; Anestopoulos, I.; Franco, R.; Panayiotidis, M.I.; Pappa, A. DNA Damage Induced by Endogenous Aldehydes: Current State of Knowledge. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2011**, *711*, 13–27, doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.03.006.
147. World Health Organization. *Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation*; Geneva, Switzerland, 2001.
148. Frijhoff, J.; Winyard, P.G.; Zarkovic, N.; Davies, S.S.; Stocker, R.; Cheng, D.; Knight, A.R.; Taylor, E.L.; Oettrich, J.; Ruskovska, T. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal* **2015**, *23*, 1144–1170, doi:10.1089/ars.2015.6317.
149. Tejchman, K.; Kotfis, K.; Sieńko, J. Biomarkers and Mechanisms of Oxidative Stress—Last 20 Years of Research with an Emphasis on Kidney Damage and Renal Transplantation. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 1–26, doi:10.3390/ijms22158010.
150. Longini, M.; Belvisi, E.; Proietti, F.; Bazzini, F.; Buonocore, G.; Perrone, S. Oxidative Stress Biomarkers: Establishment of Reference Values for Isoprostanes, AOPP, and NPBI in Cord Blood. *Mediators Inflamm* **2017**, *2017*, 1–6, doi:10.1155/2017/1758432.

Bibliografía

151. Capeillère-Blandin, C.; Gausson, V.; Descamps-Latscha, B.; Witko-Sarsat, V. Biochemical and Spectrophotometric Significance of Advanced Oxidized Protein Products. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **2004**, *1689*, 91–102, doi:10.1016/j.bbadis.2004.02.008.
152. Piwowar, A.; Knapik-Kordecka, M.; Warwas, M. AOPP and Its Relations with Selected Markers of Oxidative/Antioxidative System in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* **2007**, *77*, 188–192, doi:10.1016/j.diabres.2006.12.007.
153. Sánchez, D.C.V.; Aguilar, C.A.; García, A.G. Productos Avanzados de Oxidación Proteica (PAOP) y Su Relación Con Los Factores de Riesgo Cardiovascular En Jóvenes Aparentemente Sanos. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis* **2017**, *29*, 209–215, doi:10.1016/j.arteri.2017.04.004.
154. Hahm, J.Y.; Park, J.; Jang, E.-S.; Chi, S.W. 8-Oxoguanine: From Oxidative Damage to Epigenetic and Epitranscriptional Modification. *Exp Mol Med* **2022**, *54*, 1626–1642, doi:10.1038/s12276-022-00822-z.
155. Campos, C.; Guzmán, R.; López-Fernández, E.; Casado, Á. Evaluation of Urinary Biomarkers of Oxidative/Nitrosative Stress in Children with Down Syndrome. *Life Sci* **2011**, *89*, 655–661, doi:10.1016/j.lfs.2011.08.006.
156. Gaikwad, K.B.; Joshi, N.G.; Selkar, S.P. Study of Nitrosative Stress in ‘Pregnancy Induced Hypertension’. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **2017**, *11*, 6–8, doi:10.7860/JCDR/2017/23960.9396.
157. Azizi, S.; Ebrahimi-Mameghani, M.; Mobasser, M.; Karamzad, N.; Mahdavi, R. Oxidative Stress and Nitrate/Nitrite (NOx) Status Following Citrulline Supplementation in Type 2 Diabetes: A Randomised, Double-blind, Placebo-controlled Trial. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* **2021**, *34*, 64–72, doi:10.1111/jhn.12792.
158. DiMauro, S.; Schon, E.A. Mitochondrial Disorders in the Nervous System. *Annu Rev Neurosci* **2008**, *31*, 91–123, doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094302.
159. Jiménez Fernández, S. Identificación de Marcadores de Estrés Oxidativo En La Depresión y El Trastorno Bipolar: Estudio de Metaanálisis. Tesis Doctoral, Universidad de Granada: Granada, España, 2017.

160. Mahadik, S.P.; Mukherjee, S. Free Radical Pathology and Antioxidant Defense in Schizophrenia: A Review. *Schizophr Res* **1996**, *19*, 1–17, doi:10.1016/0920-9964(95)00049-6.
161. Zhang, X.Y.; Chen, D.-C.; Tan, Y.-L.; Tan, S.; Wang, Z.-R.; Yang, F.-D.; Okusaga, O.O.; Zunta-Soares, G.B.; Soares, J.C. The Interplay between BDNF and Oxidative Stress in Chronic Schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology* **2015**, *51*, 201–208, doi:10.1016/j.psyneuen.2014.09.029.
162. Lee, S.-Y.; Lee, S.-J.; Han, C.; Patkar, A.A.; Masand, P.S.; Pae, C.-U. Oxidative/Nitrosative Stress and Antidepressants: Targets for Novel Antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **2013**, *46*, 224–235, doi:10.1016/j.pnpbp.2012.09.008.
163. Kandemir, H.; Abuhandan, M.; Aksoy, N.; Savik, E.; Kaya, C. Oxidative Imbalance in Child and Adolescent Patients with Obsessive Compulsive Disorder. *J Psychiatr Res* **2013**, *47*, 1831–1834, doi:10.1016/j.jpsychires.2013.08.010.
164. Kul, M.; Unal, F.; Kandemir, H.; Sarkarati, B.; Kilinc, K.; Kandemir, S.B. Evaluation of Oxidative Metabolism in Child and Adolescent Patients with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Psychiatry Investig* **2015**, *12*, 361–366, doi:10.4306/pi.2015.12.3.361.
165. Ng, F.; Berk, M.; Dean, O.; Bush, A.I. Oxidative Stress in Psychiatric Disorders: Evidence Base and Therapeutic Implications. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **2008**, *11*, 851–876, doi:10.1017/S1461145707008401.
166. Tsaluchidu, S.; Cocchi, M.; Tonello, L.; Puri, B.K. Fatty Acids and Oxidative Stress in Psychiatric Disorders. *BMC Psychiatry* **2008**, *8*, 1–3, doi:10.1186/1471-244X-8-S1-S5.
167. Jimenez-Fernandez, S.; Gurpegui, M.; Diaz-Atienza, F.; Pérez-Costillas, L.; Gerstenberg, M.; Correll, C.U. Oxidative Stress and Antioxidant Parameters in Patients with Major Depressive Disorder Compared to Healthy Controls before and after Antidepressant Treatment: Results from a Meta-Analysis. *J Clin Psychiatry* **2015**, *76*, 1658–1667, doi:10.4088/JCP.14r09179.

Bibliografía

168. Jiménez-Fernández, S.; Gurpegui, M.; Garrote-Rojas, D.; Gutiérrez-Rojas, L.; Carretero, M.D.; Correll, C.U. Oxidative Stress Parameters and Antioxidants in Patients with Bipolar Disorder: Results from a Meta-Analysis Comparing Patients, Including Stratification by Polarity and Euthymic Status, with Healthy Controls. *Bipolar Disord* **2021**, *23*, 117–129, doi:10.1111/BDI.12980.
169. Faraone, S. V; Biederman, J.; Wozniak, J. Examining the Comorbidity between Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Bipolar I Disorder: A Meta-Analysis of Family Genetic Studies. *American Journal of Psychiatry* **2012**, *169*, 1256–1266, doi: 10.1176/appi.ajp.2012.12010087.
170. Faraone, S. V; Mick, E. Molecular Genetics of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Psychiatric Clinics* **2010**, *33*, 159–180, doi:10.1016/j.psc.2009.12.004.
171. Mulligan, A.; Anney, R.J.L.; O'Regan, M.; Chen, W.; Butler, L.; Fitzgerald, M.; Buitelaar, J.; Steinhausen, H.-C.; Rothenberger, A.; Minderaa, R. Autism Symptoms in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Familial Trait Which Correlates with Conduct, Oppositional Defiant, Language and Motor Disorders. *J Autism Dev Disord* **2009**, *39*, 197–209, doi:10.1007/s10803-008-0621-3.
172. Nijmeijer, J.S.; Arias-Vásquez, A.; Rommelse, N.N.J.; Altink, M.E.; Anney, R.J.L.; Asherson, P.; Banaschewski, T.; Buschgens, C.J.M.; Fliers, E.A.; Gill, M. Identifying Loci for the Overlap between Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Autism Spectrum Disorder Using a Genome-Wide QTL Linkage Approach. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **2010**, *49*, 675–685, doi:10.1016/j.jaac.2010.03.015.
173. Joseph, N.; Zhang-James, Y.; Perl, A.; Faraone, S. V. Oxidative Stress and ADHD: A Meta-Analysis. *J Atten Disord* **2015**, *19*, 915–924, doi:10.1177/1087054713510354.
174. J Verlaet, A.A.; Breynaert, A.; Ceulemans, B.; De Bruyne, T.; Fransen, E.; Pieters, L.; J Savelkoul, H.F.; Hermans, N. Oxidative Stress and Immune Aberrancies in Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder (ADHD): A Case-Control Comparison. *Eur Child Adolesc Psychiatry* **2019**, *28*, 719–729, doi:10.1007/s00787-018-1239-4.

175. Corona, J.C. Role of Oxidative Stress and Neuroinflammation in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1–17, doi:10.3390/antiox9111039.
176. Alvarez-Arellano, L.; González-García, N.; Salazar-García, M.; Corona, J.C. Antioxidants as a Potential Target against Inflammation and Oxidative Stress in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1–17, doi:10.3390/antiox9020176.
177. Lopresti, A.L. Oxidative and Nitrosative Stress in ADHD: Possible Causes and the Potential of Antioxidant-Targeted Therapies. *ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders* **2015**, *7*, 237–247, doi:10.1007/s12402-015-0170-5.
178. Dunn, G.A.; Nigg, J.T.; Sullivan, E.L. Neuroinflammation as a Risk Factor for Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Pharmacol Biochem Behav* **2019**, *182*, 22–34, doi:10.1016/j.pbb.2019.05.005.
179. Leffa, D.T.; Torres, I.L.S.; Rohde, L.A. A Review on the Role of Inflammation in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Neuroimmunomodulation* **2019**, *25*, 328–333, doi:10.1159/000489635.
180. Solleiro-Villavicencio, H.; Rivas-Arancibia, S. Effect of Chronic Oxidative Stress on Neuroinflammatory Response Mediated by CD4+ T Cells in Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci* **2018**, *12*, 1–13, doi:10.3389/fncel.2018.00114.
181. de Araújo Boleti, A.P.; de Oliveira Flores, T.M.; Moreno, S.E.; Dos Anjos, L.; Mortari, M.R.; Migliolo, L. Neuroinflammation: An Overview of Neurodegenerative and Metabolic Diseases and of Biotechnological Studies. *Neurochem Int* **2020**, *136*, 1–13, doi:10.1016/j.neuint.2020.104714.
182. Réus, G.Z.; Fries, G.R.; Stertz, L.; Badawy, M.; Passos, I.C.; Barichello, T.; Kapczinski, F.; Quevedo, J. The Role of Inflammation and Microglial Activation in the Pathophysiology of Psychiatric Disorders. *Neuroscience* **2015**, *300*, 141–154, doi:10.1016/j.neuroscience.2015.05.018.
183. Kronfol, Z.; Remick, D.G. Cytokines and the Brain: Implications for Clinical Psychiatry. *American Journal of Psychiatry* **2000**, *157*, 683–694, doi:10.1176/appi.ajp.157.5.683.

Bibliografía

184. Sen, S.; Duman, R.; Sanacora, G. Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression, and Antidepressant Medications: Meta-Analyses and Implications. *Biol Psychiatry* **2008**, *64*, 527–532, doi:10.1016/j.biopsych.2008.05.005.
185. Hassan, W.; Noreen, H.; Castro-Gomes, V.; Mohammadzai, I.; Batista Teixeira da Rocha, J.; Landeira-Fernandez, J. Association of Oxidative Stress with Psychiatric Disorders. *Curr Pharm Des* **2016**, *22*, 2960–2974, doi:10.2174/1381612822666160307145931.
186. Marshall, W.A.; Tanner, J.M. Variations in the Pattern of Pubertal Changes in Boys. *Arch Dis Child* **1970**, *45*, 13–23, doi:10.1136/adc.45.239.13.
187. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA* **2013**, *310*, 2191–2194, doi:10.1001/JAMA.2013.281053.
188. Esterbauer, H.; Cheeseman, K.H. Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products: Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal. In *Methods in Enzymology*; Packer, L., Glazer, A.N., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1990; Vol. 186, pp. 407–421.
189. Granger, D.L.; Taintor, R.R.; Boockvar, K.S.; Hibbs Jr, J.B. Measurement of Nitrate and Nitrite in Biological Samples Using Nitrate Reductase and Griess Reaction. In *Methods in Enzymology*; Packer, L., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1996; Vol. 268, pp. 142–151.
190. Aebi, H. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol* **1984**, *105*, 121–126, doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
191. Balasubramaniam, P.; Malathi, A. Comparative Study of Hemoglobin Estimated by Drabkin's and Sahli's Methods. *J Postgrad Med* **1992**, *38*, 8–9.
192. Espelosín Ortega, E. Alfa-Klotho, Inflamación y Mortalidad En Pacientes Alcohólicos. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna: San Cristóbal de La Laguna, España, 2021.
193. Hernández-Quiceno, S.; Uribe-Bojanini, E.; Alfaro-Velásquez, J.M.; Campuzano-Maya, G.; Salazar-Peláez, L.M. Cortisol: Mediciones de Laboratorio y Aplicación Clínica. *Medicina y Laboratorio* **2016**, *22*, 147–164, doi:10.36384/01232576.74.

194. Zhang, Y.V. Quantitative Analysis of Salivary Cortisol Using LC-MS/MS. In *Clinical Applications of Mass Spectrometry in Biomolecular Analysis: Methods and Protocols*; Garg, U., Ed.; Springer: New York, USA, 2016; Vol. 1378, pp. 71–79.
195. Ramos-Quiroga, J.A.; Corominas-Roso, M.; Palomar, G.; Ferrer, R.; Valero, S.; Corrales, M.; Richarte, V.; Casas, M. Cortisol Awakening Response in Adults with Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Subtype Differences and Association with the Emotional Lability. *European Neuropsychopharmacology* **2016**, *26*, 1140–1149, doi:10.1016/j.euroneuro.2016.03.014.
196. Pruessner, J.C.; Kirschbaum, C.; Meinlschmid, G.; Hellhammer, D.H. Two Formulas for Computation of the Area under the Curve Represent Measures of Total Hormone Concentration versus Time-Dependent Change. *Psychoneuroendocrinology* **2003**, *28*, 916–931, doi:10.1016/s0306-4530(02)00108-7.
197. Sies, H. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1–6, doi:10.3390/antiox9090852.
198. Bulut, M.; Selek, S.; Gergerlioglu, H.S.; Savas, H.A.; Yilmaz, H.R.; Yuce, M.; Ekici, G. Malondialdehyde Levels in Adult Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* **2007**, *32*, 435–438.
199. Ceylan, M.; Sener, S.; Cavunt Bayraktar, A.; Kavutcu, M. Oxidative Imbalance in Child and Adolescent Patients with Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **2010**, *34*, 1491–1494, doi:10.1016/j.pnpbp.2010.08.010.
200. Sonuga-Barke, E.J.S.; Wiersma, J.R.; van der Meere, J.J.; Roeyers, H. Context-Dependent Dynamic Processes in Attention Deficit/Hyperactivity Disorder: Differentiating Common and Unique Effects of State Regulation Deficits and Delay Aversion. *Neuropsychol Rev* **2010**, *20*, 86–102, doi:10.1007/s11065-009-9115-0.
201. Garde, A.H.; Albertsen, K.; Persson, R.; Hansen, Å.M.; Rugulies, R. Bi-Directional Associations between Psychological Arousal, Cortisol, and Sleep. *Behavioral Sleep Medicine* **2012**, *10*, 28–40, doi:10.1080/15402002.2012.636272.

Bibliografia

202. Thorn, L.; Hucklebridge, F.; Evans, P.; Clow, A. The Cortisol Awakening Response, Seasonality, Stress and Arousal: A Study of Trait and State Influences. *Psychoneuroendocrinology* **2009**, *34*, 299–306, doi:10.1016/j.psyneuen.2008.11.005.
203. Dolcos, S.; Katsumi, Y.; Dixon, R.A. The Role of Arousal in the Spontaneous Regulation of Emotions in Healthy Aging: A fMRI Investigation. *Front Psychol* **2014**, *5*, 1–12, doi:10.3389/fpsyg.2014.00681.
204. Erickson, K.; Drevets, W.; Schulkin, J. Glucocorticoid Regulation of Diverse Cognitive Functions in Normal and Pathological Emotional States. *Neurosci Biobehav Rev* **2003**, *27*, 233–246, doi:10.1016/s0149-7634(03)00033-2.
205. Selek, S.; Savas, H.A.; Serdar Gergerlioglu, H.; Bulut, M.; Ramazan Yilmaz, H. Oxidative Imbalance in Adult Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychol* **2008**, *79*, 256–259, doi:10.1016/j.biopsycho.2008.06.005.
206. Guney, E.; Cetin, F.H.; Alisik, M.; Tunca, H.; Torun, Y.T.; Iseri, E.; Taner, Y.I.; Cayci, B.; Erel, O. Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Oxidative Stress: A Short Term Follow up Study. *Psychiatry Res* **2015**, *229*, 310–317, doi:10.1016/j.psychres.2015.07.003.
207. Martins, M.R.; Reinke, A.; Petronilho, F.C.; Gomes, K.M.; Dal-Pizzol, F.; Quevedo, J. Methylphenidate Treatment Induces Oxidative Stress in Young Rat Brain. *Brain Res* **2006**, *1078*, 189–197, doi:10.1016/j.brainres.2006.01.004.
208. Schmitz, F.; Scherer, E.B.S.; Machado, F.R.; da Cunha, A.A.; Tagliari, B.; Netto, C.A.; Wyse, A.T.S. Methylphenidate Induces Lipid and Protein Damage in Prefrontal Cortex, but Not in Cerebellum, Striatum and Hippocampus of Juvenile Rats. *Metab Brain Dis* **2012**, *27*, 605–612, doi:10.1007/s11011-012-9335-5.
209. Carvalho Muga, M. Methylphenidate-Induced Alterations in Astrocytes: A Comprehensive Characterization. Master's Thesis, University of Coimbra: Coimbra, Portugal, 2020.
210. Sanches, E.S.; Boia, R.; Leitão, R.A.; Madeira, M.H.; Fontes-Ribeiro, C.A.; Ambrósio, A.F.; Fernandes, R.; Silva, A.P. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Animal Model Presents Retinal Alterations and Methylphenidate Has a Differential Effect in ADHD versus Control Conditions. *Antioxidants* **2023**, *12*, 1–23, doi:10.3390/antiox12040937.

211. Zhu, M.; Tian, Y.; Zhang, H.; Ma, X.; Shang, B.; Zhang, J.; Jiao, Y.; Zhang, Y.; Hu, J.; Wang, Y. Methylphenidate Ameliorates Hypoxia-Induced Mitochondrial Damage in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells through Inhibition of Oxidative Stress. *Life Sci* **2018**, *197*, 40–45, doi:10.1016/j.lfs.2018.01.027.
212. Schmidt, A.J.; Clement, H.-W.; Gebhardt, S.; Hemmeter, U.M.; Schulz, E.; Krieg, J.-C.; Kircher, T.; Heiser, P. Impact of Psychostimulants and Atomoxetine on the Expression of 8-Hydroxyguanine Glycosylase 1 in Human Cells. *J Neural Transm* **2010**, *117*, 793–797, doi:10.1007/s00702-010-0408-5.
213. Yen, G.-C.; Hsieh, C.-L. Antioxidant Effects of Dopamine and Related Compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* **1997**, *61*, 1646–1649, doi:10.1271/bbb.61.1646.
214. Calvi, J.P.Q.; Cornejo, G.S.E. Metilfenidato: Propiedades, Aplicaciones y Controversias. *Revista de Psicología* **2022**, *12*, 189–203, doi:10.36901/psicologia.v12i1.1479.
215. Sandoval, V.; Riddle, E.L.; Hanson, G.R.; Fleckenstein, A.E. Methylphenidate Redistributes Vesicular Monoamine Transporter-2: Role of Dopamine Receptors. *Journal of Neuroscience* **2002**, *22*, 8705–8710, doi:10.1523/JNEUROSCI.22-19-08705.2002.
216. Lorenzo Sanz, G.; Sánchez Herranz, A. Implicación Del Transportador Vesicular de Monoaminas En El Trastorno Por Déficit de Atención/Hiperactividad. *Rev Neurol* **2011**, *52*, 103–108, doi:10.33588/rn.52S01.2011058.
217. Hanson, G.R.; Sandoval, V.; Riddle, E.; Fleckenstein, A.E. Psychostimulants and Vesicle Trafficking: A Novel Mechanism and Therapeutic Implications. *Ann N Y Acad Sci* **2004**, *1025*, 146–150, doi:10.1196/annals.1316.019.
218. Ludolph, A.G.; Schaz, U.; Storch, A.; Liebau, S.; Fegert, J.M.; Boeckers, T.M. Methylphenidate Exerts No Neurotoxic, but Neuroprotective Effects in Vitro. *J Neural Transm* **2006**, *113*, 1927–1934, doi:10.1007/s00702-006-0487-5.
219. Torbus-Paluszczak, M.; Bartman, W.; Adamczyk-Sowa, M. Klotho Protein in Neurodegenerative Disorders. *Neurological Sciences* **2018**, *39*, 1677–1682, doi:10.1007/s10072-018-3496-x.

Bibliografía

220. Martín-Núñez, E.; Donate-Correa, J.; Ferri, C.; López-Castillo, Á.; Delgado-Molinos, A.; Hernández-Carballo, C.; Pérez-Delgado, N.; Rodríguez-Ramos, S.; Cerro-López, P.; Tagua, V.G. Association between Serum Levels of Klotho and Inflammatory Cytokines in Cardiovascular Disease: A Case-Control Study. *Aging* **2020**, *12*, 1952–1964, doi:10.18632/aging.102734.
221. Xiong, J.; Zhan, J.; Luo, T.; Chen, H.; Wan, Q.; Wang, Y.; Wei, B.; Yang, Y. Increased Plasma Level of Longevity Protein Klotho as a Potential Indicator of Cognitive Function Preservation in Patients with Schizophrenia. *Front Neurosci* **2020**, *14*, 1–8, doi:10.3389/fnins.2020.00610.
222. Barbosa, I.G.; Rocha, N.P.; Alpak, G.; Vieira, E.L.M.; Huguet, R.B.; Rocha, F.L.; de Oliveira Diniz, B.S.; Teixeira, A.L. Klotho Dysfunction: A Pathway Linking the Aging Process to Bipolar Disorder? *J Psychiatr Res* **2017**, *95*, 80–83, doi:10.1016/j.jpsychires.2017.08.007.
223. Birdi, A.; Tomo, S.; Sharma, M.; Yadav, P.; Charan, J.; Sharma, P.; Yadav, D. Association of Klotho with Neuropsychiatric Disorder: A Meta-Analysis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* **2023**, *1*, 1–9, doi:10.1007/s12291-023-01132-5.
224. Freitag, C.M.; Hänig, S.; Palmason, H.; Meyer, J.; Wüst, S.; Seitz, C. Cortisol Awakening Response in Healthy Children and Children with ADHD: Impact of Comorbid Disorders and Psychosocial Risk Factors. *Psychoneuroendocrinology* **2009**, *34*, 1019–1028, doi:10.1016/j.psyneuen.2009.01.018.
225. Ozgocer, T.; Ucar, C.; Yildiz, S. Daily Cortisol Awakening Response and Menstrual Symptoms in Young Females. *Stress and Health* **2022**, *38*, 57–68, doi:10.1002/smi.3074.
226. Adams, G.C.; Wrath, A.J.; von Dewitz, B.; Marciniuk, K.; Roesler, A.; Napper, S. Attachment Impacts Cortisol Awakening Response in Chronically Depressed Individuals. *Psychoneuroendocrinology* **2020**, *120*, 1–11, doi:10.1016/j.psyneuen.2020.104778.
227. Chen, Y.-H.; Lin, X.-X.; Chen, H.; Liu, Y.-Y.; Lin, G.-X.; Wei, L.-X.; Hong, Y.-L. The Change of the Cortisol Levels in Children with ADHD Treated by Methylphenidate or Atomoxetine. *J Psychiatr Res* **2012**, *46*, 415–416, doi:10.1016/j.jpsychires.2011.11.014.

228. Wang, L.-J.; Huang, Y.-S.; Hsiao, C.-C.; Chen, C.-K. The Trend in Morning Levels of Salivary Cortisol in Children with ADHD during 6 Months of Methylphenidate Treatment. *J Atten Disord* **2017**, *21*, 254–261, doi:10.1177/1087054712466139.
229. Lee, M.-S.; Yang, J.-W.; Ko, Y.-H.; Han, C.; Kim, S.-H.; Lee, M.-S.; Joe, S.-H.; Jung, I.-K. Effects of Methylphenidate and Bupropion on DHEA-S and Cortisol Plasma Levels in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Child Psychiatry Hum Dev* **2008**, *39*, 201–209, doi:10.1007/s10578-007-0081-6.

ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES DEL ESTUDIO:

**EVOLUCIÓN CLÍNICA Y ANALÍTICA EN EL TEA Y TDAH
EN LA PRÁCTICA CLÍNICA DIARIA
EN LA INFANCIA Y ADOLESCENCIA**

La firma de este documento permite a los investigadores del Hospital Clínico San Cecilio de Granada a hacer uso de los datos contenidos en su historia clínica con fines de investigación. El desarrollo del proyecto se realizará respetando las Normas de Buena Práctica Clínica y los principios éticos fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, así como los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación. Se respetará la Ley de Protección de Datos : Ley Europea General de Regulación de Protección de Datos (GDPR) 2016/679 y Ley Orgánica sobre Protección de Datos Personales y Garantía de Derechos Digitales (LOPD-GDD) 3/2018 de 5 de diciembre).

CONSENTIMIENTO

Yo _____

(nombre y apellidos del participante o representante legal)

Como padre/madre/tutor del paciente:

.....

Y habiendo sido informado por el profesional (nombre, apellidos y centro de derivación)

.....

Comprendo que la participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirar mi consentimiento cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Por todo lo cual, presto libremente mi conformidad para que se utilicen mis datos en las condiciones expuestas.

Fecha y firma
Del participante/representante legal

Fecha y firma
del investigador

RECHAZO DE LA PARTICIPACIÓN

Yo, D/Dña _____, de forma libre y voluntaria no autorizo a la participación en este estudio tras haber sido informado del mismo, sabiendo que esta decisión no repercutirá en la atención médica prestada

En _____ a _____ de _____ de _____

El participante/representante legal

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D/Dña _____, de forma libre y consciente he decidido retirar mi consentimiento de participación en estudio sabiendo que esta decisión no repercutirá en la atención médica prestada

En _____ a _____ de _____ de _____

El participante/representante legal

PROTOCOLO DE RECOGIDA MUESTRAS DE SALIVA

Recomendaciones generales

- Para realizar las determinaciones se emplearán 3 Salivettes.
- No ingiera alimentos, ni bebidas, durante al menos, una hora antes de la recogida de las muestras.
- No se lave los dientes.
- Identifique las muestras con un rotulador permanente indicando la hora de la recogida.

Horarios de recogida

- Primera muestra: En el momento justo del despertar, cuando el niño/a aún está en la cama, con poca luz en la habitación (preferentemente a oscuras).
- Segunda muestra: a los 30 minutos de la primera muestra de saliva.
- Tercera muestra: a los 30 minutos de la segunda muestra de saliva.

Procedimiento

1. Extraiga el algodón que hay en el interior del tubo.
2. Introdúzcaselo en la boca y mástíquelo suavemente, sin romper, durante **1-2 minutos. NO TRAGAR.**
(Si ve que no genera demasiada saliva puede echar previamente unas gotas de limón en el algodón, esto le ayudará)
3. Cuando esté **empapado de saliva**, introdúzcalo de nuevo en el tubo y ciérrelo.
Rotule el contenedor con la **hora** de la recogida.
4. Guarde las muestras en la **nevera**, envueltas en papel de aluminio.
5. Entregue las muestras al personal de enfermería de la sala de extracciones del Hospital Universitario Clínico San Cecilio (planta 0).

