

***Efecto de la depleción
dopaminérgica en la actividad
sináptica, en un modelo de ratón del
Trastorno por el déficit de Atención
con Hiperactividad***

Trabajo Final de Grado

Grado en Medicina

Autor: Carlos José Cervera Crespo

Tutoras: Ana María Sánchez-Pérez, María Meseguer



Facultat de Ciències de la Salut · FCS
Unitat Predepartamental de Medicina

ÍNDICE.

| | |
|--|--------|
| Resumen-Abstract-Palabras clave-Keywords. | - 3 - |
| Extended Summary | - 5 - |
| 1. INTRODUCCIÓN | - 8 - |
| 1.1. <i>Papel de la dopamina en el TDAH.</i> | - 9 - |
| 1.2. <i>Relación de la neuroinflamación con el TDAH.</i> | - 10 - |
| 1.3. <i>Modelos preclínicos</i> | - 10 - |
| 1.4. <i>Relación del córtex cingulado anterior (ACC) y el dolor en el TDAH.</i> | - 12 - |
| 1.5. <i>Balance excitatorio/inhibitorio a través del marcaje de vGAT y vGLUT1.</i> | - 12 - |
| 1.6. <i>Resultados previos</i> | - 13 - |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | - 13 - |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS. | - 14 - |
| 3.1 <i>Procedimiento de inmunofluorescencia.</i> | - 14 - |
| 3.2 <i>Obtención de imágenes y análisis.</i> | - 14 - |
| 3.3 <i>Análisis estadístico.</i> | - 15 - |
| 4. RESULTADOS | - 15 - |
| 4.1 <i>Medición de la inhibición en ACC.</i> | - 15 - |
| 4.2. <i>Medición del equilibrio entre excitación e inhibición en ACC.</i> | - 17 - |
| 5. DISCUSIÓN | - 19 - |
| CONCLUSIONES | - 22 - |
| AGRADECIMIENTOS | - 22 - |
| REFERENCIAS | - 22 - |

Resumen.

El Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) es, junto al Trastorno del Espectro Autista, uno de los trastornos del neurodesarrollo más frecuentes. Este trastorno implica una disminución del nivel de atención, hiperactividad e impulsividad que aparecen durante la infancia y podría acarrear en el futuro de los pacientes otros problemas comórbidos y sociales.

El TDAH es considerado un trastorno por disfunción dopaminérgica. El papel de la dopamina en este trastorno ha sido apoyado circunstancialmente por la evidencia farmacológica de que los medicamentos usualmente prescritos para este síndrome, como el metilfenidato o las anfetaminas, bloquean los transportadores de la dopamina. Pese a ello otros estudios defienden un estado hiperdopaminérgico del TDAH.

En este trabajo usamos la 6 – Hidroxidopamina (6-OHDA), un neurotóxico sintético, para lesionar las vías de la dopamina, en modelos de ratones hembra. Con ello buscamos una disfunción dopaminérgica para estudiar en el córtex cingulado anterior (ACC) la existencia de un desequilibrio entre excitación e inhibición en esta región del sistema nervioso central (SNC), así como observar si el tratamiento con ABA puede tener algún efecto en éste.

Para medir el desbalance excitación/inhibición hemos cuantificado las vesículas de GABA en el ACC mediante su marcaje con vGAT. Posteriormente, con datos previos de vGLUT1, que mide las vesículas glutamatérgicas, calculamos la proporción excitación/inhibición.

Nuestros resultados muestran que la lesión con 6-OHDA en ratones hembra aumenta el conteo de vGAT y por tanto las vesículas GABAérgicas en el ACC. Además, la lesión provoca un mayor estado hipoexcitatorio al calcular el desbalance. Este resultado es contrario a lo esperado ya que estos animales, en estudios previos del grupo, habían mostrado una mayor sensibilidad al dolor.

Abstract.

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is, with Autism Spectrum Disorder, one of the most frequent neurodevelopmental disorders. This disorder involves a decreased level of attention, hyperactivity and impulsivity that appear during childhood and could lead to other comorbid and social problems in the patients' future.

ADHD is considered a dopaminergic dysfunction disorder. The role of dopamine in ADHD has been circumstantially supported by pharmacological evidence that medications commonly used for ADHD, such as methylphenidate or amphetamines, block dopamine transporters. Despite this, other studies argue for a hyperdopaminergic state in ADHD.

In this work we use 6-hydroxydopamine (6-OHDA), a synthetic neurotoxicant, to damage dopamine pathways in female mouse models. In doing so, we looked for dopaminergic dysfunction in order to study the excitation and inhibition (E/I) ratio in the anterior cingulate cortex (ACC) in this region of the central nervous system (CNS), and to observe whether ABA treatment can have any effect on it.

To measure the E/I ratio, we quantified GABA vesicles in the ACC by labelling them with vGAT. Subsequently, using previous data from vGLUT1, which measures glutamatergic vesicles, we calculated the E/I ratio.

Our results show that 6-OHDA lesioning in female mice increases vGAT counts and thus GABAergic vesicles in the ACC. In addition, the lesion causes an increased hypoexcitatory state when calculating the E/I ratio. This result is contrary to what we expected as these animals, in the group's previous studies, had shown an increased sensitivity to pain.

Palabras clave. Trastorno por el déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH), Córtez Cingulado Anterior (ACC), dopamina, GABA, excitación, inhibición.

Keywords. Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD), Anterior Cingulate Cortex (ACC), dopamine, GABA, excitation, inhibition.

Extended Summary

1. Introduction.

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is one of the most common neurodevelopmental disorders. It is characterised by decreased attention span, hyperactivity and impulsivity. The estimated prevalence is 5%, affecting males in a 2:1 ratio to females, with a high rate of heritability. ADHD increases the risk of substance abuse or obesity in the future, as well as other cognitive disorders such as anxiety or learning disorders.

The disorder has been linked to chronic inflammation in the central nervous system (CNS) during its development. Several clinical studies affirm that embryonic development exposed to maternal infection, smoking, obesity, pollutants; have higher risk of developing ADHD and other neurodevelopmental disorders within the Autism Spectrum Disorder.

Dopamine is a catecholamine synthesised in the ventral tegmental area (VTA), substantia nigra and arcuate nucleus. Studies have advocated ADHD as a disorder due to dopaminergic dysfunction.

This work uses the ADHD mice model involving perinatal 6-hydroxydopamine (6-OHDA) injury. 6-OHDA is a synthetic neurotoxicant toxic to dopamine pathways leading to spontaneous motor hyperactivity as a central symptom of ADHD.

Several publications argue that ADHD increases pain perception and that its prevalence is higher in ADHD patients. Attention and pain transmission use the anterior cingulate cortex (ACC) as a neural network. This area of the CNS appears to be dysfunctional in ADHD patients. Hyperexcitability in ACC neurons is associated with higher levels of pain, which led us to consider whether DA dysfunction in the VTA causes an excitation/inhibition imbalance in target area ACC, using female ADHD of the mouse model. To this end, we have used the vesicular GABA transporter (vGAT) to mark synaptic vesicles of the main inhibitory neurotransmitter in the CNS. Likewise, the vesicular transporter (vGLUT1/2) is used to measure glutamate vesicles.

2. Hypothesis and objectives,

We hypothesised that perinatal 6-OHDA injury causes ADHD-like dopaminergic dysfunction in VTA leading to an excitation/inhibition imbalance in target areas.

Moreover, we aimed to evaluate the effect of treatment with the anti-inflammatory drug abscitic acid (ABA) on this labelling and to estimate this excitation/inhibition imbalance.

To that end, the objective of present work was to study the inhibitory labelling of vGAT in the ACC of female mice.

3. Methodology.

To carry out the vGAT labelling, immunofluorescence was performed using mouse anti-vGAT antibodies, on filaments detected with rabbit anti-NF-L.

Imaging was performed with a confocal microscopy unit. For the quantification of GABA vesicles (vGAT) in these images, Image J software was used to quantify the number of vGAT present in each fibre per square millimetre.

Statistical analysis was performed with GraphPad software. Data are expressed as mean \pm SEM and ``n`` the number of subjects. Normality was confirmed by Anderson-Darling, D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk, and Kolmorov-Smirnov tests. Unpaired t-test was used to determine statistical significance ($p \leq 0.05$).

4. Results.

The results showed a higher GABAergic vesicle count (vGAT) in the ACC of females that were injured by 6-OHDA versus those that were not. This difference was greater in the groups taking ABA. This translates into greater inhibition in ACC neurons in hypodopaminergic subjects.

When performing the excitatory to inhibitory ratio we used the excitation/inhibition ratio using vGLUT1/vGAT. The results showed a lower ratio in uninjured females, which means a higher amount of GABA vesicles in ACC of injured females.

5. Discussion.

Based on a previous study by the research team, 6-OHDA-injured female ADHD mice are associated with increased pain sensitivity.

In this work we hypothesise that destroying dopaminergic projections by 6-OHDA would lead to an imbalance between excitation and inhibition in the ACC, which may contribute to alterations in pain sensitivity.

The present literature argues that hyperexcitability in ACC would be related to increased pain sensitivity in ADHD subjects. However, our results have been contradictory to this theory. This work demonstrates that 6-OHDA lesioning of female mice results in an increased amount of GABA vesicles in their ACC, which translates into a hypoexcitatory state in these lesioned subjects. The behavioural results of the previous study show that this lesion is associated with increased pain sensitivity, contradicting this theory. However, this is true when treating injured female mice with ABA, as the anti-inflammatory effect reduces pain sensitivity and increases ACC inhibition.

This work has focused on female mice as previous studies have been carried out on male mice, which could be related to the sex of the mice and the contradictory results.

6. Conclusions.

Our results allow us to conclude that the 6-OHDA lesion causes an increased amount of vGAT in the ACC, leading to an imbalance between excitation and inhibition in favour of the latter. The hypoexcitatory state of the ACC is associated with increased pain sensitivity, contrary to existing literature theory. However, the effect of ABA has been related to increased inhibition among injured subjects and associated with decreased pain sensitivity.

1. INTRODUCCIÓN.

El Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) es uno de los trastornos, junto al Espectro Autista, más comunes del neurodesarrollo, que implica una disminución del nivel de atención, hiperactividad locomotora e impulsividad presentes en dos o más escenarios antes de los 12 años. [1] Para su diagnóstico, estos síntomas deben perdurar durante al menos 6 meses y tienen que reducir o perjudicar el funcionamiento social, académico o laboral. [1] En adolescentes, el TDAH aumenta hasta 1,5 veces el riesgo de trastornos por abuso de sustancias (2,4 veces para el tabaquismo), 9,3 veces el uso problemático de las redes sociales, además de aumentar 1,23 veces el riesgo de padecer obesidad. [2; 3] A medida que el trastorno progresa, muchos adolescentes luchan contra la delincuencia, el abuso de sustancias y los trastornos psiquiátricos comórbidos, como el trastorno negativista desafiante, el trastorno de conducta, los trastornos del estado de ánimo, los trastornos de ansiedad y los trastornos del aprendizaje. [4]

El TDAH es uno de los trastornos más frecuentes dentro del campo de la Psiquiatría Infantil con una prevalencia superior al 5%. Afecta más frecuentemente a los niños que a las niñas en proporción 3:1. Asimismo, es un trastorno con alta tasa de heredabilidad oscilando entre el 60 y el 90%. [1; 5] Sin embargo, existen factores ambientales tempranos implicados en la etiología del TDAH, incluyendo aquellos asociados a una mayor inflamación, como la infección materna, el tabaco o la obesidad materna; lo que hace pensar en un perfil inflamatorio sistémico. [6; 7; 8]

Estudios de Resonancia Magnética estructural han demostrado una reducción del volumen de los núcleos o ganglios basales del cerebro (caudado y núcleo pálido) en pacientes comparados con controles de la misma edad. Igualmente, el desarrollo prefrontal lateral en niños con TDAH se retrasa varios años, y el córtex cingulado anterior es más delgado en los adultos afectados. [10] A ello se le suma un retraso de 2 a 5 años en adquirir el grosor máximo de la corteza parietal y temporal del cerebro de niños con TDAH. [11] Estudios utilizando imágenes de resonancia magnética funcional en niños con TDAH para evaluar de forma indirecta el volumen sanguíneo en el cuerpo estriado, mostraron tamaños más pequeños de las áreas diana de la dopamina, incluidos el córtex prefrontal y el estriado, y una disminución de las áreas de los ganglios basales. [12]

1.1. Papel de la dopamina en el TDAH.

El TDAH es considerado un trastorno por disfunción dopaminérgica [13]. La dopamina (DA) es una catecolamina sintetizada principalmente en el área tegmental ventral (VTA), la sustancia negra y el núcleo arqueado (*Fig. 1*); a partir del aminoácido precursor Tirosina. El papel de la dopamina en el TDAH ha sido apoyado circunstancialmente por la evidencia farmacológica de que los medicamentos, como el metilfenidato (tratamiento actual para el TDAH) y las anfetaminas, bloquean los transportadores de dopamina (DAT) aumentando los niveles de ésta en la hendidura sináptica, mejorando temporalmente los síntomas. [14] Sin embargo, otros estudios afirman que la hiperactividad en sujetos humanos con TDAH se acompaña de una disminución de los niveles de DAT en el núcleo estriado, núcleo accumbens, además de en el mesencéfalo donde se encuentran las células dopaminérgicas del VTA, lo que conllevaría a ciertos casos de TDAH a un estado hiperdopaminérgico. En el putamen, una disminución de los DAT se ha asociado con la falta de atención. [15, 16]

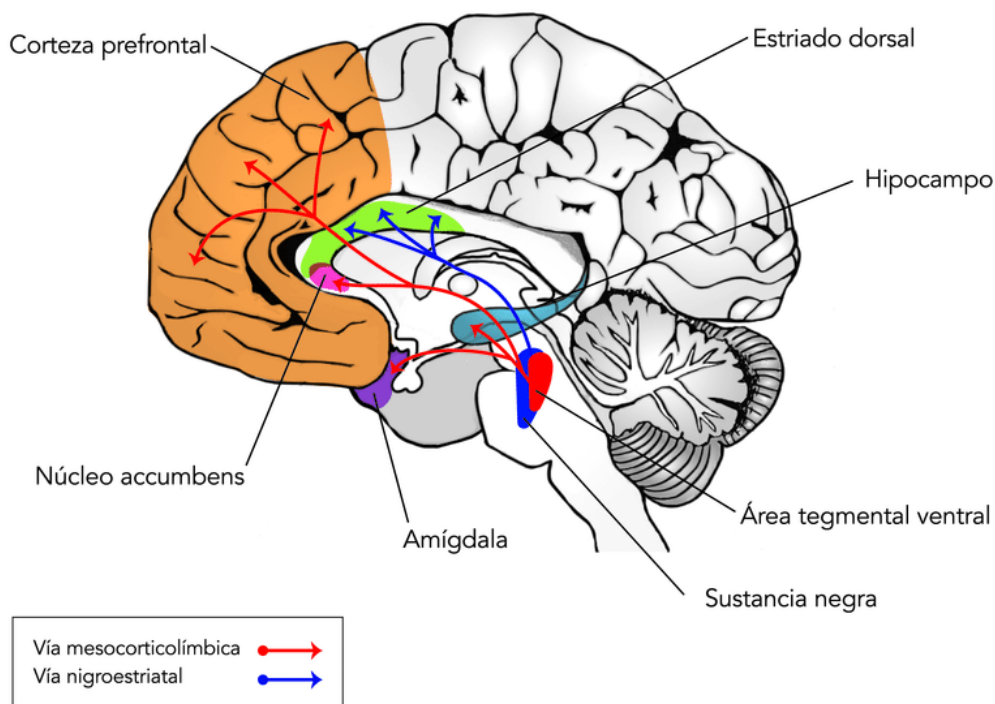


Figura 1. Vías de la dopamina. Imagen representativa de las vías mesocorticolímbicas que incluye las proyecciones neuronales dopaminérgicas (rojo) desde el VTA hacia el núcleo accumbens, la corteza prefrontal, la amígdala y el hipocampo. La vía

nigroestriada (azul) involucra las proyecciones neuronales dopaminérgicas desde la sustancia nigra hacia el estriado dorsal. [52]

1.2. Relación de la neuroinflamación con el TDAH.

La inflamación crónica durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) se considera un factor de riesgo que conlleva a los síntomas centrales del TDAH. [17] Varios estudios clínicos afirman que individuos cuyo desarrollo embrionario estuvo expuesto a factores asociados con el aumento de la inflamación, como la infección materna [6], el tabaquismo materno [7; 18], obesidad materna y mala alimentación [8], y la exposición materna a contaminantes [19]; pueden desarrollar TDAH y otros trastornos de neurodesarrollo. [17; 20] Además, en un estudio realizado con niños, los niveles de Interleucina IL-6 era significativamente más elevados en el grupo de niños con TDAH en comparación con el grupo control, correlacionándose con los síntomas de inatención e hiperactividad. [21]

Estudios con pacientes TDAH en tratamiento con metilfenidato indican que la *IL-16*, relacionada con la hiperactividad e *IL-13* con la inatención, tienen niveles reducidos respecto los pacientes sin medicación; aunque también en los tratados se demostró un aumento de la interleucina proinflamatoria IL-1 beta. [22]

1.3. Modelos preclínicos

El diagnóstico del TDAH, al igual que otros trastornos psiquiátricos, se basa en la evaluación del comportamiento. Los modelos animales del TDAH deben imitar la sintomatología clínica y, en particular, los tres síntomas principales de hiperactividad, impulsividad e inatención, pero también otras afecciones comórbidas. Además, para validarse como modelo de enfermedad humana, debe validarse también su respuesta a fármacos que regulan la sintomatología en pacientes.

El TDAH es una enfermedad compleja, muy pocos modelos animales de TDAH pueden imitar todos los síntomas. A principios de la década de 1960, se desarrolló la rata espontáneamente hipertensa (‘‘SHR’’ siglas en inglés) mediante la endogamia de ratas *Wistar-Kyoto* (WKY) [23]. La SHR muestra varios síntomas centrales del TDAH, como la hiperactividad, la impulsividad y la escasa atención. Sin embargo, las ratas SHR también muestran una hipertensión que no se registra en los pacientes con TDAH, lo que dificulta la disociación de los efectos de los dos trastornos. De hecho, la hipertensión es un posible factor de confusión para las ratas SHR como modelo de TDAH, lo que sugiere

que la alteración de la transmisión de norepinefrina puede contribuir a la hipertensión más que a la hiperactividad y, sin embargo, estos modelos sí responden a tratamiento con metilfenidato. Otra limitación de este modelo es que el grupo control, las ratas WKY suele mostrar niveles de actividad bajos, e incluso se ha sugerido como modelo de depresión. [23]

Otro modelo genético es la cepa de ratón que carece del DAT. Estos ratones muestran hiperactividad en entornos nuevos y alteraciones en el aprendizaje y la memoria por exceso de dopamina, sobre todo en el estriado y el núcleo accumbens. Sin embargo, es imposible probar la validez predictiva de este modelo con psicoestimulantes, como metilfenidato, debido a la ausencia de la proteína transportadora, el principal objetivo de estos fármacos. [24; 25]

Fez1 es un gen expresado específicamente en el sistema nervioso con funciones documentadas en el neurodesarrollo. Los modelos de ratones Fez1-knockout (KO) muestran fenotipos de hiperactividad e impulsividad, además de una expresión reducida de tirosina hidroxilasa en el mesencéfalo y el tronco encefálico, que se traduce en niveles reducidos de dopamina, norepinefrina o sus metabolitos tanto en el núcleo accumbens como en el córtex prefrontal. La guanfacina es un fármaco agonista selectivo de los receptores adrenérgicos α -2A postsinápticos que favorece el funcionamiento de la corteza frontal y mejora los síntomas del TDAH. La guanfacina junto con el psicoestimulante metilfenidato consiguen normalizar estos cambios bioquímicos en estos modelos, así como una normalización en la conducta a los psicoestimulantes MK-801 y metanfetamina. [26; 27]

El modelo de ratón con lesión perinatal con 6 - Hidroxidopamanina (6-OHDA) presenta síntomas conocidos de la patología humana. [23] 6-OHDA es un neurotóxico sintético que provoca una destrucción selectiva de las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas, sin embargo, estas últimas se protegen de la acción de 6-OHDA con la inyección previa de Desipramina [23; 28]. La eliminación selectiva de las proyecciones de dopamina al cerebro anterior en ratones neonatales conduce a una hiperactividad motora espontánea. [29] El modelo de ratón de TDAH con 6-OHDA también presenta algunas de las características anatómicas del TDAH, incluida la disminución del peso y el volumen cerebral, el menor tamaño de las áreas diana de la dopamina, el grosor cortical y anomalías en las neuronas del cíngulo anterior dorsal. [23]

1.4. Relación del córtex cingulado anterior (ACC) y el dolor en el TDAH.

Diversos estudios defienden que el TDAH aumenta la percepción del dolor y su prevalencia es mayor en pacientes TDAH respecto a la población que no lo padece. [30; 31] La atención y la transmisión del dolor utilizan las mismas redes neuronales. En particular, la corteza cingulada anterior (ACC), que desempeña un papel clave en la atención y las funciones ejecutivas, parece ser disfuncional en pacientes con TDAH. [9] El ACC recibe información sensitiva a través del tálamo y se proyecta a la corteza insular. [32] Esta área específica del SNC se ha asociado con los trastornos del estado de ánimo y la sensibilidad al dolor. [33]

El potencial excitatorio procede de las neuronas glutamatérgicas, mientras que el inhibitorio está regulado principalmente por las neuronas GABAérgicas. Durante la etapa de neurodesarrollo, los potenciales excitatorios e inhibitorios funcionan en un estrecho equilibrio (el equilibrio E/I), que es importante para la función cerebral. [34] La alteración de este equilibrio E/I a nivel sináptico se ha implicado en diversos trastornos mentales. [35] En consecuencia, a ello nos referimos como desbalance excitación/inhibición, es decir, la alteración de la proporción entre la función excitatoria e inhibitoria y sus respectivos neurotransmisores como son el glutamato y el GABA.

La hiperexcitabilidad del ACC se asocia a niveles más altos de dolor [36], lo que nos lleva a comprobar si existe ese desbalance entre la excitación y la inhibición en dicha área en modelos de ratones TDAH, asociándose con la conducta que se observó previamente [29].

1.5. Balance excitatorio/inhibitorio a través del marcaje de vGAT y vGLUT1.

La segregación entre el almacenamiento y la liberación vesicular de glutamato y GABA constituye la base molecular entre las neuronas excitadoras e inhibitoras, garantizando el funcionamiento preciso de las redes neuronales. [37] Este trabajo trata de elucidar si existe un desequilibrio entre la excitación protagonizada por la segregación sináptica del neurotransmisor glutamato y la segregación del inhibidor GABA.

Para marcar las vesículas sinápticas GABAérgicas se usa el transportador vesicular de GABA (*vGAT*), el primer transportador vesicular de aminoácidos identificado molecularmente. [38] Este transportador está muy concentrado en las terminaciones nerviosas de las neuronas GABAérgicas del cerebro y la médula espinal. [38]

Por otro lado, la transmisión glutamatérgica es fundamental para controlar la actividad neuronal. En las neuronas glutamatérgicas, el glutamato se almacena en vesículas

sinápticas y se libera por estimulación. La homeostasis del sistema glutamatérgico se mantiene gracias a un conjunto de transportadores en la membrana de las vesículas sinápticas. El glutamato se incorpora a las vesículas sinápticas a través del transportador vesicular de glutamato (que puede ser de tipo 1 o tipo 2, *vGLUT1/2*). La expresión de *vGLUT1* en particular es uno de los marcadores más utilizados para identificar las neuronas que utilizan este neurotransmisor en la excitación del SNC. [39]

1.6. Resultados previos

El trabajo parte del estudio [29]. Este estudio demuestra una asociación independiente del sexo entre la depleción de la dopamina en el córtex cingulado anterior y la ínsula posterior, unido a inflamación en dichas áreas cerebrales específicas. Para valorar el estado inflamatorio del cerebro, Meseguer et al. caracterizó la morfología de la microglía en el córtex cingulado anterior (ACC) y el córtex insular posterior (PIC), áreas fuertemente implicadas en el procesamiento del dolor [40; 41]. Además, este estudio demostró que existe un efecto dependiente del sexo de la lesión de 6 – OHDA en la conducta, provocando una mayor sensibilidad al dolor en las hembras, y una mayor actividad locomotora espontánea en los machos.

La respuesta a tratamiento fue dependiente del sexo ya que el tratamiento con ABA durante un mes redujo este estado inflamatorio en las hembras, pero no en los machos.

El tratamiento con ABA redujo la inflamación y el estrés oxidativo, aliviando la hipersensibilidad al dolor en las hembras. En los machos, el ABA redujo la hiperactividad, aunque no afectó al estado neuroinflamatorio. Los datos del estudio refuerzan el papel beneficioso del ABA y abren una potencial intervención terapéutica alternativa dirigida a la inflamación para el manejo del TDAH. [29]

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

El desbalance entre la excitación, protagonizada por el papel del glutamato; y la inhibición, cuyo papel lo desempeña el GABA; en ACC, se ha asociado con los trastornos del estado de ánimo y la sensibilidad al dolor. [36] En este trabajo, hipotetizamos los síntomas asociados al TDAH y dolor comórbido, causados por la disfunción dopaminérgica causada por 6-OHDA puede estar mediado por un desbalance excitatorio/inhibitorio. En caso positivo, evaluaríamos el efecto de ABA, en el mismo.

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- Estudiar el marcaje inhibitorio de vGAT en el ACC de hembras, en un modelo de ratón TDAH por lesión perinatal con 6-OHDA.
- Evaluar el efecto del tratamiento con ABA sobre el marcaje vGAT.
- Estimar el desbalance excitación/inhibición a través de la ratio vGLUT1/vGAT.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

Todos los procedimientos previos a este trabajo en los que fueron incluidos el uso de ratones han sido aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Jaime I (UJI), de acuerdo con las directrices y regulaciones nacionales.

3.1 Procedimiento de inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia se llevó a cabo como se describe [29]. Se utilizaron anticuerpos primarios anti-NFL de conejo (Synaptic System 1:2000), y vGAT de ratón (Synaptic System 1:1000) se incubaron durante la noche. A continuación, se enjuagaron las secciones y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios antiratón Cy3 de burro o anticonejo Alexa 488 de burro (Jackson Immunoresearch, Suffolk, Reino Unido). Por último, las secciones se montaron en portaobjetos y se cubrieron con el medio de montaje Fluoromount-G.

3.2 Obtención de imágenes y análisis.

Las imágenes de fluorescencia se tomaron con una unidad de microscopia confocal con un módulo TCS SP8 equipado con rayos láser de argón y helio-neón acoplado a un microscopio invertido Leica DMi8 (Leica Microsystems). Las longitudes de onda de excitación y emisión del Cy3 fueron de 433 y 560-618 nm respectivamente; la longitud de onda de excitación de la etiqueta Alexa488 fue de 488 nm y su emisión de 510-570 nm.

Para obtener las imágenes de las vesículas de GABA (vGAT), se utilizó un objetivo de 63x. Y para la cuantificación de vGAT presentes en neurofilamentos de secciones en el ACC, se utilizó el software Image J en hembras de los 4 grupos de estudio (6-OHDA, SHAM, 6-OHDA + ABA, SHAM + ABA). Para ello de cada imagen se cuantificó el área (mm^2) de 10 fibras marcadas con el anticuerpo Neurofilament-L (NF-L). Posteriormente, se cuantificó el número de vGAT presentes en cada fibra; expresando el resultado como el número de vesículas GABAérgicas/ mm^2 .

Por otra parte, gracias a los resultados previos del grupo, se obtuvieron los datos del número de vesículas glutamatérgicas (vGLUT1) por mm² de NF-L, siguiendo el procedimiento explicado anteriormente.

3.3 Análisis estadístico.

El análisis se realizó con el software Graph Pad (Software GraphPad Prism V8, GraphPad). Los datos se informan como la media \pm SEM y la "n" el número de sujetos independientes. La normalidad fue confirmada con los test Anderson-Darling, D'Agostino y Pearson, Shapiro-Wilk, y Kolmorov-Smirnov (SHAM n=10, 6-OHDA n=10, SHAM + ABA n=10, 6-OHDA + ABA n=11) los datos fueron sometidos a un Unpaired t-test, para determinar la significancia estadística de las diferencias observadas entre los grupos experimentales comparados ($p \leq 0.05$).

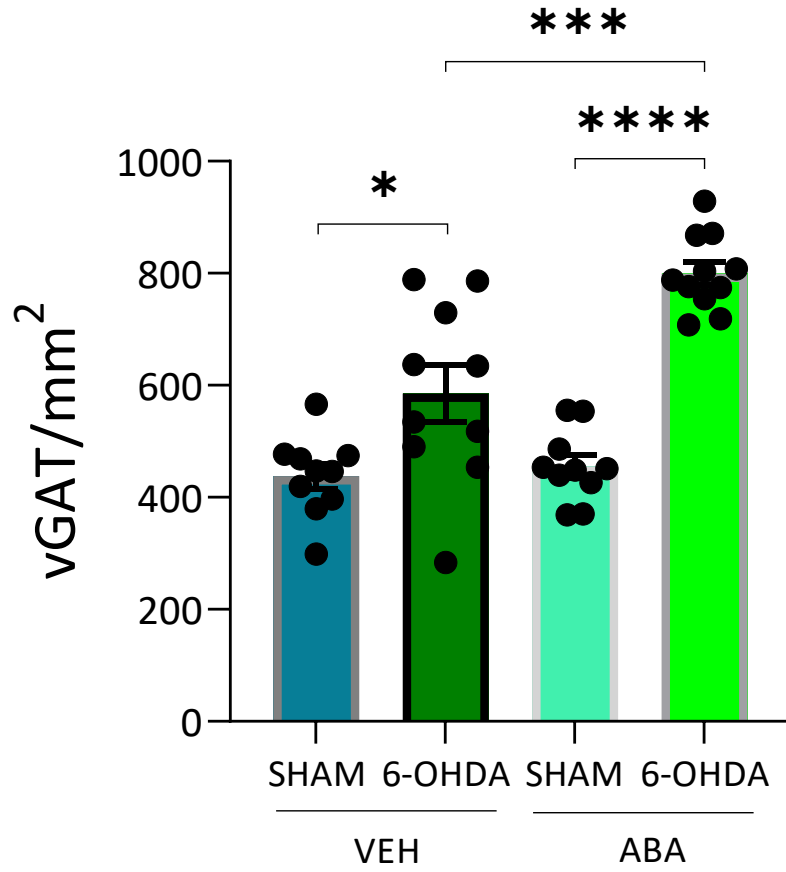
4. RESULTADOS

4.1 Medición de la inhibición en ACC.

4.1.1 Efecto de la lesión perinatal con 6-OHDA sobre la inhibición en ACC.

Los resultados del conteo de las vesículas GABAérgicas en el ACC mediante vGAT muestran que, en hembras, en el grupo lesionado con 6-OHDA hay más ($585,7 \pm 50,8$ vGAT/mm²) vesículas GABAérgicas frente al grupo SHAM ($437,5 \pm 22,43$ vGAT/mm²) (Fig. 2A). Esta diferencia es mayor si comparamos el grupo 6-OHDA + ABA ($799,9 \pm 20,18$ vGAT/mm²) con el grupo SHAM + ABA ($455,4 \pm 20,13$ vGAT/mm²). Este resultado indica que la lesión con 6-OHDA provoca un aumento de las vesículas GABAérgicas, lo que se traduciría en una mayor inhibición en el ACC en los sujetos hipodopaminérgicos comparados con sujetos control, siendo esta diferencia mayor en los grupos que fueron tratados con ABA. La diferencia es significativa en ambos casos, empleando two-tailed Student's t-test (6-OHDA vs SHAM $p = 0,0157$; $t = 2,668$; $df = 18$) (6-OHDA + ABA vs SHAM + ABA $p = 0,0001$; $t = 12,06$; $df = 19$).

A



B

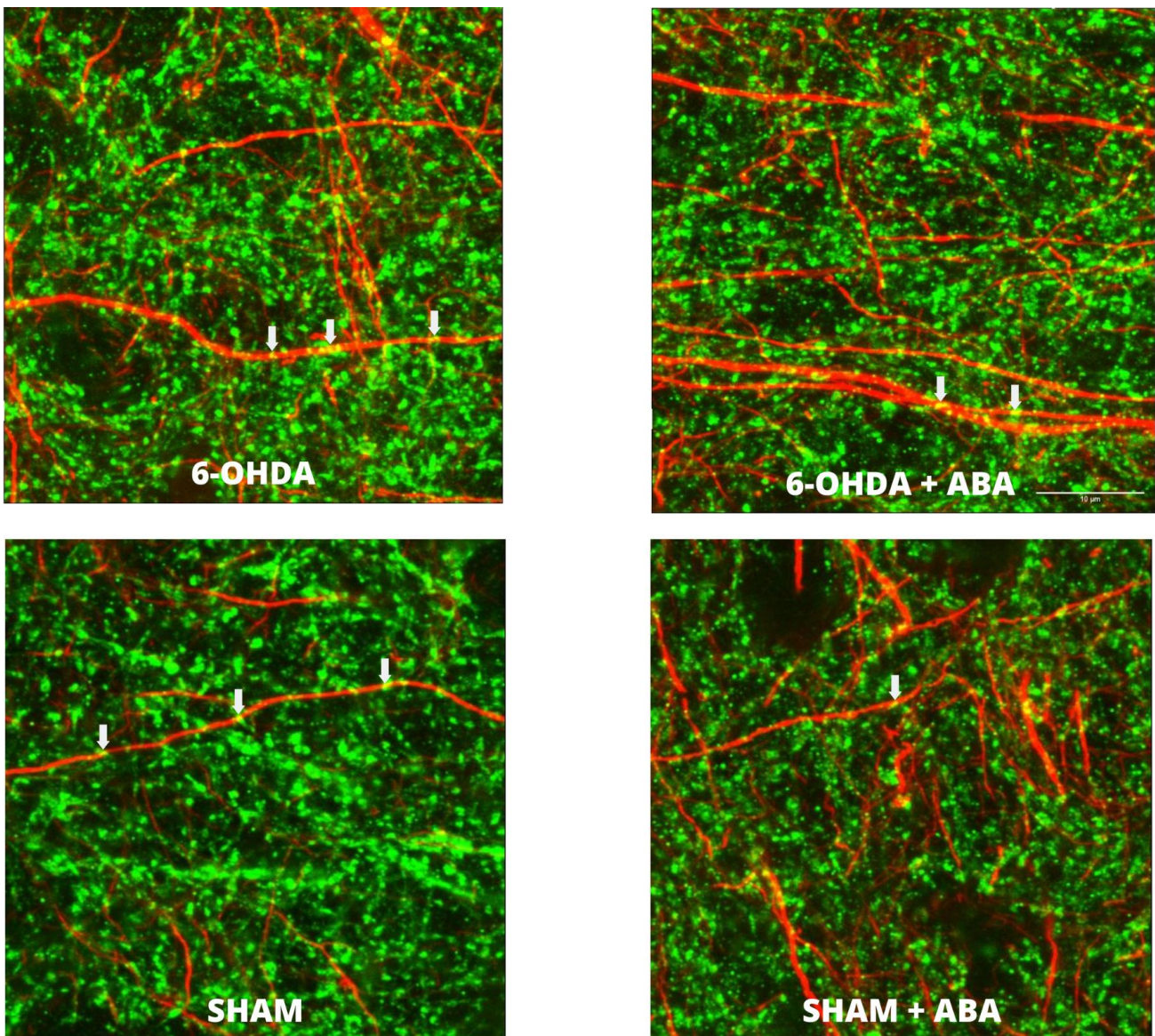


Figura 2. Cuantificación de vesículas GABAérgicas (vGAT) en la Corteza del Cíngulo Anterior (ACC) de hembras. A. Cuantificación de vGAT por milímetro cuadrado (vGAT/mm^2) [mean \pm SEM] en SHAM (n=10), 6-OHDA (n=10), SHAM + ABA (n=10), 6-OHDA + ABA (n=11); $p < 0.05$. **B.** Imagen representativa de vGAT detectadas mediante inmunofluorescencia con anticuerpos mouse anti-vGAT (verde), en filamentos detectados con rabbit anti-NF-L (rojo). Barra de calibración: 10 μm .

4.2. Medición del equilibrio entre excitación e inhibición en ACC.

Para calcular la proporción excitatoria e inhibitoria utilizamos el marcaje de vesículas de los neurotransmisores. Mediante vGLUT1 podemos marcar las vesículas glutamatérgicas

que emplean las células excitatorias y, para las vesículas GABAérgicas, utilizamos vGAT. Dicha proporción entre estas vesículas de neurotransmisores (vGLUT1/vGAT) indicaría la ratio entre excitación e inhibición (*ratio E/I*).

4.2.1. *Efecto de la lesión perinatal con 6-OHDA en el desbalance excitación/inhibición (E/I)*

Los resultados de la ratio E/I en el ACC muestran que, en hembras, la ratio del grupo SHAM ($4,295 \pm 0,22$) es mayor que el del grupo 6-OHDA ($2,827 \pm 0,22$), al igual que si comparamos los grupos SHAM + ABA ($3,915 \pm 0,2$) y 6-OHDA + ABA ($2,14 \pm 0,068$) (Fig. 3). El two-tailed Student's t-test mostró que la ratio vGLUT1/vGAT en las hembras control es mayor que el grupo lesionado con 6-OHDA, lo que afirma que existe una mayor cantidad de vesículas GABAérgicas en relación con las glutamatérgicas en los sujetos hipodopaminérgicos. Este resultado sugiere que la lesión provocaría una menor actividad neuronal en ACC y una mayor liberación de GABA en las sinapsis de dicha área. La diferencia es significativa en ambos casos. (6-OHDA vs SHAM $p=0,0003$ $t=4,574$ $df=17$) (6-OHDA + ABA vs SHAM + ABA $p=0,0001$ $t=8,741$ $df=17$)

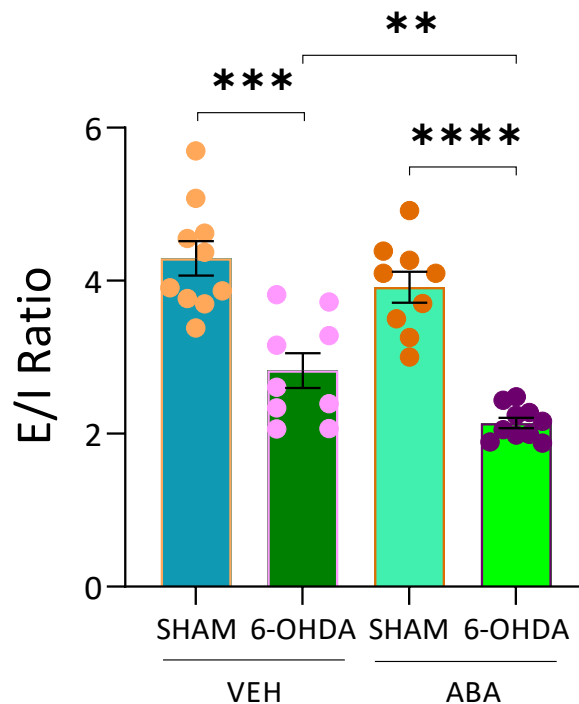


Figura 3. Ratio excitación/inhibición en la Corteza del Cíngulo Anterior (ACC). Ratio excitación/inhibición [mean± SEM] expresado por la división del número de vGLUT1 entre el número de vGAT por milímetro cuadrado de NF-L en el ACC de

hembras SHAM (n=10), 6-OHDA (n=10), SHAM + ABA (n=10) y 6-OHDA+ABA (n=11); $p < 0.05$

5. DISCUSIÓN

La lesión perinatal con 6-OHDA en ratones es un modelo ampliamente utilizado para provocar una disfunción dopaminérgica, la cual se ha asociado con los síntomas presentes en pacientes con TDAH. [13; 43] Otros autores han empleado la misma lesión, en adultos para modelar en ratones otras patologías donde intervienen las vías de la dopamina, como la enfermedad de Parkinson [44]. La inyección perinatal de 6-OHDA provoca la destrucción específica de vías de la dopamina en VTA y la sustancia nigra, que emiten proyecciones a varias áreas cerebrales, entre ellas la corteza prefrontal, el estriado o el ACC (áreas responsables de la planificación y ejecución del movimiento) [45]. Esta alteración de la producción dopaminérgica puede proporcionar información valiosa sobre la relación entre el TDAH y la excitación o inhibición en regiones específicas del SNC, así como para evaluar su impacto en diferentes comportamientos y funciones cognitivas, ya que la hiperactividad locomotora que resulta de la lesión es un fenotipo similar al que encontramos en el TDAH de humanos.

Como resultados previos en cuanto al comportamiento, tomando como referencia los resultados del estudio [29]; la sensibilidad al dolor por el estímulo mecánico medido por el test de Von Frey aumentó, en hembras lesionadas con 6-OHDA (disminuyó su umbral de dolor). De la misma forma, la lesión también disminuyó el umbral de dolor por estímulo térmico medido por el Test Plantar, en hembras. [29]

Como hemos visto en el estudio [29], la lesión ha conllevado a un aumento de la sensibilidad dolorosa disminuyendo el umbral del dolor en las hembras. Según la literatura existente, el TDAH puede aumentar la percepción del dolor y su prevalencia es mayor en pacientes TDAH. [30; 31] También se sugiere que los jóvenes que tienen dolor crónico pueden tener síntomas de TDAH como inatención o hiperactividad. [48]

En este trabajo probamos la hipótesis de que al destruir proyecciones dopaminérgicas mediante la lesión perinatal con 6-OHDA en hembras ratón, se provocaría un desequilibrio entre excitación e inhibición en el córtex cingulado anterior (ACC), lo que puede contribuir a las dificultades de atención e hiperactividad genuinas del TDAH. Además, probamos cómo afecta esa lesión a sujetos que se tratan con un antiinflamatorio como ABA.

Para ello, hemos usado el marcaje mediante vGAT para medir la inhibición en ACC. Esta área ejerce una función importante en referente a la atención, las funciones ejecutivas y el dolor, las cuales se ven alteradas en pacientes con TDAH. [9]

Utilizando datos previos del marcaje de vesículas de glutamato para medir la excitación, usando vGLUT1 (datos obtenidos por la cotutora María Meseguer, perteneciente al equipo de investigación de la UJI), calculamos la proporción entre vGLUT1 y vGAT, para calcular la ratio entre la excitación y la inhibición en el ACC de hembras ratón con el objetivo evaluar la ratio excitación/inhibición. Nuestros resultados muestran una menor ratio E/I en las hembras lesionadas, lo que sugiere que la lesión 6-OHDA conlleva a un estado hipoexcitatorio en ACC.

Comprobamos la existencia de un aumento de vGAT, lo que sugiere una mayor inhibición en el ACC de ratones hembra que fueron lesionadas, por lo que nos hace considerar que la depleción de dopamina, o en los casos de TDAH, su disfunción; provoca una menor actividad neuronal en el ACC. Curiosamente, comprobamos que el efecto de ABA aumenta la cantidad de vesículas de GABA (vGAT) pero disminuye la ratio E/I. Esta diferencia es más notable entre las hembras que fueron lesionadas mediante la inyección de 6-OHDA perinatal. Esto nos da a entender que el efecto de la lesión sobre la inhibición es mayor en aquellos sujetos que fueron tratados durante un mes con ABA. Esta afirmación nos hace pensar que al atacar la inflamación del SNC, conlleva un mayor grado de inhibición en el ACC respecto a los sujetos del estudio que no fueron expuestos al ABA y sus consecuencias en relación con el dolor y funciones ejecutivas.

El ACC es una región involucrada en la toma de decisiones, la atención y la regulación emocional; funciones cognitivas alteradas en el TDAH. [9; 33; 46] Al mostrar esta región un desequilibrio excitatorio/inhibitorio en ratones hembra lesionadas existirá una alteración de su comportamiento como lo hay en el TDAH. [29; 36; 47]

Síntomas centrales del TDAH como son la compulsividad y la disfunción de la atención, se han asociado a una hipoexcitabilidad de regiones cerebrales. Una hipoexcitabilidad de la corteza insular anterior se ha relacionado con un mayor desarrollo de comportamiento compulsivo en ratas. [49] En el ACC, se ha asociado una disminución de la excitabilidad neuronal con un peor control de la atención en las personas con TDAH. [50] En cuanto a la hiperactividad y falta de control motora, se ha asociado con niveles bajos de glutamato en la corteza prefrontal. [51]

En este trabajo nos centramos en relacionar el desbalance observado en nuestro estudio con la sensibilidad al dolor en las hembras, basándonos en los resultados de un trabajo previo [29]. La hiperexcitabilidad del ACC se ha relacionado con niveles sensoriales que aumentan el dolor [36], asimismo, un aumento de GABA y la reducción de la secreción de glutamato en dicha área se asocia a un efecto antinocicepcivo [47].

Con esto, podemos observar que los resultados en referencia al comportamiento chocan con la teoría de que la hipoexcitabilidad del ACC disminuiría el nivel nocicepcivo [36; 47].

Este trabajo ha expuesto que la lesión con 6-OHDA provoca un desequilibrio excitatorio/inhibitorio aumentando la inhibición de ACC en hembras; y, además, esa inhibición es significativamente mayor entre los sujetos lesionados que han sido tratados con el antiinflamatorio ABA. Sin embargo, partiendo de los datos de nuestro estudio previo de referencia [29], en él se demuestra que el tratamiento con ABA sí que reduce la sensibilidad al dolor en el modelo de ratón TDAH. Esto sí que se relaciona con la teoría de que una hipoexcitabilidad de ACC se asocia a una menor sensibilidad al dolor [36; 47], pues en nuestros resultados se comprueba que ABA provoca un aumento significativo de vesículas GABAérgicas entre hembras lesionadas con 6-OHDA. Lo que podríamos concluir que el tratamiento de la neuroinflamación característica del TDAH, en estos modelos de ratón, provoca mayor inhibición en el ACC si lo comparamos con hembras lesionadas que no han sido tratadas con un antiinflamatorio como ABA. La inflamación, por tanto, se relacionaría con mayor sensibilidad al dolor; y que al atacarla con ABA, aumenta significativamente la inhibición en ACC, en sujetos hembras lesionados.

En este trabajo hemos demostrado la existencia de un desbalance entre la excitación y la inhibición en el ACC, en hembras de modelos de ratón TDAH mediante la lesión con 6-OHDA, a favor de un estado hipoexcitatorio por la depleción dopaminérgica. Sin embargo, no se ha relacionado con lo que esperaríamos encontrar según la literatura existente en la cuestión a la sensibilidad al dolor. Aunque, es importante pensar que en este estudio se han utilizado sólo sujetos ratón hembras, partiendo de que los demás estudios se han realizado con machos lo que podría tener relación la dependencia del sexo en el efecto de la lesión y su relación con el comportamiento en el dolor u otros síntomas a nivel cognitivo.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo permiten concluir:

- ✓ La lesión 6-OHDA, por el cual se produce una depleción dopaminérgica, provoca una mayor cantidad de vGAT en ACC comparado con controles.
- ✓ La lesión mediante 6-OHDA produce un desbalance entre la excitación y la inhibición en el ACC de modelos de ratón TDAH hembras, a favor de la inhibición.
- ✓ El estado hipoexcitatorio de ACC en hembras lesionadas no se traduce en un menor nivel nociceptivo, sino que, aumenta el umbral de dolor, si tomamos los resultados del comportamiento de un estudio previo.
- ✓ Sin embargo, ABA aumenta significativamente la inhibición entre las hembras lesionadas, reduciendo la sensibilidad al dolor.

AGRADECIMIENTOS

Dar las gracias a Ana como tutora, por su orientación y guía para la realización de este trabajo. A mis padres, mi hermana y a Patricia por su apoyo en esta recta final de este camino. A mis compañeros y amigos de Castellón por hacer este tortuoso camino más ameno. Y principalmente mi agradecimiento a María, sin su colaboración y su luz en este área de investigación no podría haber hecho este trabajo, le deseo lo mejor para su doctorado.

REFERENCIAS

1. Drechsler, R., Brem, S., Brandeis, D., Grünblatt, E., Berger, G., & Walitza, S. (2020). ADHD: Current Concepts and Treatments in Children and Adolescents. *Neuropediatrics*, 51(5), 315–335.
2. Charach, A., Yeung, E., Climans, T., & Lillie, E. (2011). Childhood attention-deficit/hyperactivity disorder and future substance use disorders: comparative meta-analyses. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 50(1), 9–21.
3. Aguirre Castaneda, R. L., Kumar, S., Voigt, R. G., Leibson, C. L., Barbaresi, W. J., Weaver, A. L., Killian, J. M., & Katusic, S. K. (2016). Childhood Attention-

- Deficit/Hyperactivity Disorder, Sex, and Obesity: A Longitudinal Population-Based Study. *Mayo Clinic proceedings*, 91(3), 352–361.
4. Biederman J. (2005). Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. *Biological psychiatry*, 57(11), 1215–1220.
 5. Dmitrzak-Weglarz, M., Duda, J., & Słopeń, A. (2021). Progress and stumbling blocks in the discovery of biological and genetic basis of attention deficit hyperactivity disorder. Postępy i trudności w identyfikacji biologicznych i genetycznych przyczyn zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD). *Psychiatria polska*, 55(4), 769–786.
 6. Werenberg Dreier, J., Nybo Andersen, A. M., Hvolby, A., Garne, E., Kragh Andersen, P., & Berg-Beckhoff, G. (2016). Fever and infections in pregnancy and risk of attention deficit/hyperactivity disorder in the offspring. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*, 57(4), 540–548.
 7. Becker, K., El-Faddagh, M., Schmidt, M. H., Esser, G., & Laucht, M. (2008). Interaction of dopamine transporter genotype with prenatal smoke exposure on ADHD symptoms. *The Journal of pediatrics*, 152(2), 263–269.
 8. Andersen, C. H., Thomsen, P. H., Nohr, E. A., & Lemcke, S. (2018). Maternal body mass index before pregnancy as a risk factor for ADHD and autism in children. *European child & adolescent psychiatry*, 27(2), 139–148.
 9. Devinsky, O., Morrell, M. J., & Vogt, B. A. (1995). Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain : a journal of neurology*, 118 (Pt 1), 279–306.
 10. Makris, N., Buka, S. L., Biederman, J., Papadimitriou, G. M., Hodge, S. M., Valera, E. M., Brown, A. B., Bush, G., Monuteaux, M. C., Caviness, V. S., Kennedy, D. N., & Seidman, L. J. (2008). Attention and executive systems abnormalities in adults with childhood ADHD: A DT-MRI study of connections. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 18(5), 1210–1220.
 11. Shaw, P., Eckstrand, K., Sharp, W., Blumenthal, J., Lerch, J. P., Greenstein, D., Clasen, L., Evans, A., Giedd, J., & Rapoport, J. L. (2007). Attention-deficit/hyperactivity disorder is characterized by a delay in cortical maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19649–19654.
 12. Teicher, M. H., Anderson, C. M., Polcari, A., Glod, C. A., Maas, L. C., & Renshaw, P. F. (2000). Functional deficits in basal ganglia of children with

- attention-deficit/hyperactivity disorder shown with functional magnetic resonance imaging relaxometry. *Nature medicine*, 6(4), 470–473.
13. Levy F. (1991). The dopamine theory of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*, 25(2), 277–283.
 14. Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., & Ding, Y. S. (2005). Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological psychiatry*, 57(11), 1410–1415.
 15. Volkow, N. D., Wang, G. J., Newcorn, J., Fowler, J. S., Telang, F., Solanto, M. V., Logan, J., Wong, C., Ma, Y., Swanson, J. M., Schulz, K., & Pradhan, K. (2007). Brain dopamine transporter levels in treatment and drug naïve adults with ADHD. *NeuroImage*, 34(3), 1182–1190.
 16. Jucaite, A., Fernell, E., Halldin, C., Forssberg, H., & Farde, L. (2005). Reduced midbrain dopamine transporter binding in male adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: association between striatal dopamine markers and motor hyperactivity. *Biological psychiatry*, 57(3), 229–238.
 17. Dunn, G. A., Nigg, J. T., & Sullivan, E. L. (2019). Neuroinflammation as a risk factor for attention deficit hyperactivity disorder. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 182, 22–34.
 18. Mick, E., Biederman, J., Faraone, S. V., Sayer, J., & Kleinman, S. (2002). Case-control study of attention-deficit hyperactivity disorder and maternal smoking, alcohol use, and drug use during pregnancy. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 41(4), 378–385.
 19. Thapar, A., Cooper, M., Eyre, O., & Langley, K. (2013). What have we learnt about the causes of ADHD?. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*, 54(1), 3–16.
 20. Thürmann, L., Herberth, G., Rolle-Kampczyk, U., Röder, S., Borte, M., von Bergen, M., Lehmann, I., & Trump, S. (2019). Elevated Gestational IL-13 During Fetal Development Is Associated With Hyperactivity and Inattention in Eight-Year-Old Children. *Frontiers in immunology*, 10, 1658.
 21. Darwish, A. H., Elgohary, T. M., & Nosair, N. A. (2019). Serum Interleukin-6 Level in Children With Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). *Journal of child neurology*, 34(2), 61–67.

22. Oades, R. D., Myint, A. M., Dauvermann, M. R., Schimmelmann, B. G., & Schwarz, M. J. (2010). Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) and glial integrity: an exploration of associations of cytokines and kynurenine metabolites with symptoms and attention. *Behavioral and brain functions : BBF*, 6, 32.
23. Bouchatta, O., Manouze, H., Bouali-Benazzouz, R., Kerekes, N., Ba-M'hamed, S., Fossat, P., Landry, M., & Bennis, M. (2018). Neonatal 6-OHDA lesion model in mouse induces Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder (ADHD)-like behaviour. *Scientific reports*, 8(1), 15349.
24. Sora, I., Wichems, C., Takahashi, N., Li, X. F., Zeng, Z., Revay, R., Lesch, K. P., Murphy, D. L., & Uhl, G. R. (1998). Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), 7699–7704.
25. Li, B., Arime, Y., Hall, F. S., Uhl, G. R., & Sora, I. (2010). Impaired spatial working memory and decreased frontal cortex BDNF protein level in dopamine transporter knockout mice. *European journal of pharmacology*, 628(1-3), 104–107.
26. Sumitomo, A., Saka, A., Ueta, K., Horike, K., Hirai, K., Gamo, N. J., Hikida, T., Nakayama, K. I., Sawa, A., Sakurai, T., & Tomoda, T. (2018). Methylphenidate and Guanfacine Ameliorate ADHD-Like Phenotypes in *Fez1*-Deficient Mice. *Molecular neuropsychiatry*, 3(4), 223–233.
27. Sakae, N., Yamasaki, N., Kitaichi, K., Fukuda, T., Yamada, M., Yoshikawa, H., Hiranita, T., Tatsumi, Y., Kira, J., Yamamoto, T., Miyakawa, T., & Nakayama, K. I. (2008). Mice lacking the schizophrenia-associated protein FEZ1 manifest hyperactivity and enhanced responsiveness to psychostimulants. *Human molecular genetics*, 17(20), 3191–3203.
28. Matsumoto, K., Ojima, K., & Watanabe, H. (1995). Noradrenergic denervation attenuates desipramine enhancement of aggressive behavior in isolated mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 50(3), 481–484.
29. Meseguer-Beltrán, M., Sánchez-Sarasúa, S., Landry, M., Kerekes, N., & Sánchez-Pérez, A. M. (2023). Targeting Neuroinflammation with Abscisic Acid Reduces Pain Sensitivity in Females and Hyperactivity in Males of an ADHD Mice Model. *Cells*, 12(3), 465.

30. Battison, E. A. J., Brown, P. C. M., Holley, A. L., & Wilson, A. C. (2023). Associations between Chronic Pain and Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) in Youth: A Scoping Review. *Children (Basel, Switzerland)*, *10*(1), 142.
31. Treister, R., Eisenberg, E., Demeter, N., & Pud, D. (2015). Alterations in pain response are partially reversed by methylphenidate (Ritalin) in adults with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Pain practice : the official journal of World Institute of Pain*, *15*(1), 4–11.
32. Kasanetz F, Acuna MA, Nevian T. Anterior cingulate cortex, pain perception, and pathological neuronal plasticity during chronic pain. *The Neurobiology, Physiology, and Psychology of Pain*. Academic Press; 2022;193–202.
33. Matisz, C. E., & Gruber, A. J. (2022). Neuroinflammatory remodeling of the anterior cingulate cortex as a key driver of mood disorders in gastrointestinal disease and disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *133*, 104497.
34. Lee, E., Lee, J., & Kim, E. (2017). Excitation/Inhibition Imbalance in Animal Models of Autism Spectrum Disorders. *Biological psychiatry*, *81*(10), 838–847.
35. Mamiya, P. C., Arnett, A. B., & Stein, M. A. (2021). Precision Medicine Care in ADHD: The Case for Neural Excitation and Inhibition. *Brain sciences*, *11*(1), 91.
36. Lançon, K., Qu, C., Navratilova, E., Porreca, F., & Séguéla, P. (2021). Decreased dopaminergic inhibition of pyramidal neurons in anterior cingulate cortex maintains chronic neuropathic pain. *Cell reports*, *37*(9), 109933.
37. Zander, J. F., Münster-Wandowski, A., Brunk, I., Pahner, I., Gómez-Lira, G., Heinemann, U., Gutiérrez, R., Laube, G., & Ahnert-Hilger, G. (2010). Synaptic and vesicular coexistence of VGLUT and VGAT in selected excitatory and inhibitory synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *30*(22), 7634–7645.
38. Chaudhry, F. A., Reimer, R. J., Bellocchio, E. E., Danbolt, N. C., Osen, K. K., Edwards, R. H., & Storm-Mathisen, J. (1998). The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *18*(23), 9733–9750.

39. Du, X., Li, J., Li, M., Yang, X., Qi, Z., Xu, B., Liu, W., Xu, Z., & Deng, Y. (2020). Research progress on the role of type I vesicular glutamate transporter (VGLUT1) in nervous system diseases. *Cell & bioscience*, *10*, 26.
40. Becker, S., Gandhi, W., & Schweinhardt, P. (2012). Cerebral interactions of pain and reward and their relevance for chronic pain. *Neuroscience letters*, *520*(2), 182–187.
41. Leknes, S., Brooks, J. C., Wiech, K., & Tracey, I. (2008). Pain relief as an opponent process: a psychophysical investigation. *The European journal of neuroscience*, *28*(4), 794–801.
42. Mattei, D., Ivanov, A., Ferrai, C., Jordan, P., Guneykaya, D., Buonfiglioli, A., Schaafsma, W., Przanowski, P., Deuther-Conrad, W., Brust, P., Hesse, S., Patt, M., Sabri, O., Ross, T. L., Eggen, B. J. L., Boddeke, E. W. G. M., Kaminska, B., Beule, D., Pombo, A., Kettenmann, H., ... Wolf, S. A. (2017). Maternal immune activation results in complex microglial transcriptome signature in the adult offspring that is reversed by minocycline treatment. *Translational psychiatry*, *7*(5), e1120.
43. Düzel, E., Bunzeck, N., Guitart-Masip, M., Wittmann, B., Schott, B. H., & Tobler, P. N. (2009). Functional imaging of the human dopaminergic midbrain. *Trends in neurosciences*, *32*(6), 321–328.
44. Thiele, S. L., Warre, R., & Nash, J. E. (2012). Development of a unilaterally-lesioned 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (60), 3234.
45. Zhang, K., Tarazi, F. I., Davids, E., & Baldessarini, R. J. (2002). Plasticity of dopamine D4 receptors in rat forebrain: temporal association with motor hyperactivity following neonatal 6-hydroxydopamine lesioning. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *26*(5), 625–633.
46. Bush, G., Frazier, J. A., Rauch, S. L., Seidman, L. J., Whalen, P. J., Jenike, M. A., Rosen, B. R., & Biederman, J. (1999). Anterior cingulate cortex dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder revealed by fMRI and the Counting Stroop. *Biological psychiatry*, *45*(12), 1542–1552.
47. Koga, K., Matsuzaki, Y., Honda, K., Eto, F., Furukawa, T., Migita, K., Irie, K., Mishima, K., & Ueno, S. (2017). Activations of muscarinic M₁ receptors in the

- anterior cingulate cortex contribute to the antinociceptive effect via GABAergic transmission. *Molecular pain*, 13, 1744806917692330.
48. Battison, E. A. J., Brown, P. C. M., Holley, A. L., & Wilson, A. C. (2023). Associations between Chronic Pain and Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) in Youth: A Scoping Review. *Children (Basel, Switzerland)*, 10(1), 142.
49. Jadhav, K. S., Bernheim, A. P., Aeschlimann, L., Kirschmann, G., Decosterd, I., Hoffman, A. F., Lupica, C. R., & Boutrel, B. (2022). Reversing anterior insular cortex neuronal hypoexcitability attenuates compulsive behavior in adolescent rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(21), e2121247119.
50. Mamiya, P. C., Richards, T. L., Edden, R. A. E., Lee, A. K. C., Stein, M. A., & Kuhl, P. K. (2022). Reduced Glx and GABA Inductions in the Anterior Cingulate Cortex and Caudate Nucleus Are Related to Impaired Control of Attention in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *International journal of molecular sciences*, 23(9), 4677.
51. Carlsson M. L. (2000). On the role of cortical glutamate in obsessive-compulsive disorder and attention-deficit hyperactivity disorder, two phenomenologically antithetical conditions. *Acta psychiatrica Scandinavica*, 102(6), 401–413.
52. Vindas-Smith, Rebeca & Vargas-Sanabria, Dayana & Brenes, Juan C.. (2022). Consumo de alimentos altamente procesados y de alta palatabilidad y su relación con el sobrepeso y la obesidad. *Población y Salud en Mesoamérica*. 19(2)