

EFFECTO DE AGREGAR DHA (OMEGA-3) EN EL CAMBIO DE LOS GENES EN LOS NEUROTRANSMISORES DEL TALLO CEREBRAL DE RATONES

Felipe David Durán Parra

ASESOR: Mtro. Alfonso Carreón Rodríguez, Profesor Responsable: Dr. Enrique Galindo

Área de Ciencias Biológicas

Proyecto con apoyo externo

Marco Teórico

Esta investigación va a la par de investigaciones más grandes sobre la influencia del tipo de alimentos en el desarrollo (crecimiento y adaptación) de los animales principalmente los humanos, porque tenemos diferentes razones para escoger los alimentos (aparte del instinto), y cómo desarrollar la forma de proveer los mejores alimentos a la población.

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGP-CL) son componentes del sistema nervioso central (SNC). Son poliinsaturados porque tienen varias dobles ligaduras y más de 18 carbonos en la molécula. Varios trabajos han demostrado su influencia en el control de procesos de aprendizaje y memoria. Específicamente, los niveles del ácido más importante son los del DHA, que se llama así porque tiene 22 carbonos y seis dobles ligaduras que se inserta la primera en el tercer carbón (o docosahexaenoico), se llaman omega-3 porque la primera doble ligadura se inserta en el tercer carbono de la molécula. Este ácido poliinsaturado DHA tiene que estar presente en altas concentraciones. Pues si no hay suficiente, puede haber problemas en el cerebro. Por ejemplo, las personas no pueden aprender fácilmente y no recuerdan cosas.

La manera en que el DHA afecta a las neuronas es a través de los genes o expresión genética y estructura de las membranas de las células (ahí en medio se encuentra el DHA unido a proteínas). Al agregar DHA a células este AGP-CL modifica los genes y produce células mejores y más eficientes.

Antecedentes

Los Ácidos Grasos Esenciales AGE, incluidos los omega-6 y omega-3, son necesarios para el funcionamiento del cerebro. Se ha demostrado que el ácido desohexanoico (DHA) se acumula en el SNC principalmente durante el último trimestre del embarazo, alcanzando hasta un 15% de la concentración total de ácidos grasos, para mantenerse luego constante a través de la vida adulta. Hay evidencia que indica que el DHA se acumula mayoritariamente en ciertas zonas del cerebro como el hipocampo, el cerebelo y en los fotorreceptores de la retina. Se concentra en los fosfolípidos (FL) de la membrana, principalmente como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina durante la etapa prenatal y neonatal (primer desarrollo después del nacimiento), lo cual coincide con el pico máximo de los eventos de neurogénesis (creación de neuronas), arborización de neuritas (conectores de las neuronas) y sinaptogénesis (establecimiento de la conexión entre neuronas).

Está ampliamente demostrado que el DHA es esencial para el desarrollo y mantenimiento del SNC en animales y seres humanos y que la visión, la audición y la capacidad de aprendizaje dependen en gran medida de una disposición adecuada de ácidos grasos omega-3 durante el desarrollo.

OBJETIVOS

1. Determinar en cultivos de células del tallo de cerebro de ratones si poniendo en la caja de Petri DHA, este tiene algún efecto sobre la cantidad de neurotransmisores que se generen.
2. Evaluar el efecto de agregar DHA sobre la función de los neurotransmisores (que transmiten los impulsos eléctricos en el cerebro) a la altura del tallo cerebral (parte de abajo y atrás en la cabeza de los ratones que se sacrificarán).

METODOLOGIA Y DESARROLLO

Por medio del INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PUBLICA,

Ave. Universidad 655, Sta. Ma. Ahuacatlán, Cuernavaca, 62508, Morelos.

1. Determinar en cultivos de células del tallo encefálico si existe un efecto del DHA sobre la expresión de genes de dopamina.
 - a. Determinación *in vitro* de la expresión de dopamina y moléculas asociadas a su síntesis, transporte o degradación
 - b. Determinación *in vitro* de la concentración de DHA en membranas
 - c. Analizar los efectos *in vitro* de la suplementación de DHA sobre las concentraciones de dopamina.
 - i. cultivos primarios de células del tallo encefálico de rata de 14-17 días de gestación
 - ii. ontogenia por inmunocitoquímica (prueba basada en cambio de color de las muestras debido a su composición) de 1 DIV a 14 DIV de serotonina, (5-HT), su transportador transmembranal (5-HTT), (Zhou, Sari et al. 2000) triptofano hidroxilasa; de tirosina hidroxilasa para mantener células vivas se necesitan estos aminoácidos que **son partes de proteínas, con las cuales se mantienen vivos los cerebros de los ratones que sacrificamos** y monoaminooxidasa (MAO)
2. Evaluar el efecto de DHA suplementado en el medio de cultivo sobre la diferenciación (indica el tamaño de la célula y desarrollo de los órganos celulares), proliferación (producción) de las células serotoninérgicas y dopaminérgicas.
 - a) Analizar los efectos *in vitro* de la suplementación de DHA sobre la proliferación de células de tallo cerebral.
 - b) Analizar los efectos *in vitro* de la suplementación de DHA sobre el número y tamaño de dendritas y axones de las células dopaminérgicas.
 - c)
 - i. cultivos primarios de células del tallo encefálico de rata de 14-17 días de gestación
 Analizar los efectos *in vitro* de la suplementación de DHA sobre niveles de moléculas asociadas a la síntesis, transporte o degradación (descomposición) de serotonina y/o dopamina.
 - ii. cultivos primarios de células del tallo encefálico de rata de 14-17 días de gestación divididos en 2 grupos: sin suplementación de DHA y con suplementación de DHA en un rango de 10^{-11} a 10^{-6} M y mantenidos por 14 días
 - iii. RT-PCR de 5-HTT, tirosina hidroxilasa, triptofano hidroxilasa y MAO.

- iv. El PCR (aparato que replica y mide ADN) es para determinar el orden de los genes y la cantidad de ADN.
- 3. Evaluar el efecto de la suplementación de DHA sobre la diferenciación, proliferación de las células del neurotransmisor dopamina.
 - a) *Analizar los efectos in vitro de la suplementación de DHA sobre la expresión de marcadores neuronales como Mash-1, PGP 9.5, TAU y MAP2 en células dopaminérgicas*
 - i. cultivos primarios de células del tallo encefálico de rata de 14-17 días de gestación divididos en 2 grupos: sin suplementación de DHA y con suplementación de DHA en un rango de 10^{-11} a 10^{-6} M y mantenidos por 14 días
 - ii. Inmunoquímicas de serotonina o dopamina con Mash1, PGP 9.5, TAU y MAP2 a los 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días en ambos grupos.
 - b) *Analizar los efectos in vitro de DHA sobre el número y tamaño de dendritas y axones de las células dopaminérgicas*
 - i. cultivos primarios de células del tallo encefálico de rata de 14-17 días de gestación divididos en 2 grupos: sin suplementación de DHA y con suplementación de DHA en un rango de 10^{-11} a 10^{-6} M y mantenidos por 14 días
 - ii. Inmunoquímica para serotonina o dopamina y análisis morfológico (forma) de las células teñidas.

Resultados

El proyecto se encuentra en desarrollo pero se espera incremento en número, tamaño y eficacia de las neuronas bajo la suplementación del DHA en contraste a las que no fueron suplementadas. Mejor respuesta de memoria y adaptación a situaciones nuevas en los laberintos de los ratones con dieta suplementada con DHA.

Conclusiones: Se espera que el DHA sea determinante en el desarrollo de los ratones y sirva como prueba de la importancia de dar atención en la diversidad de los alimentos por sus nutrientes.

Bibliografía: Vaidyanathan VV, Rao KV, Sastry PS. 1994. Regulation of diacylglycerol kinase in rat brain membranes by docosahexaenoic acid. *Neurosci Lett.* 179(1-2):171-174, Akbar M, Kim HY. 2002. Protective effects of docosahexaenoic acid in staurosporine-induced apoptosis: involvement of phosphatidylinositol-3 kinase pathway. *J Neurochem.* 82(3):655-65.

-Weisinger HS, Vingrys AJ, Bui BV, Sinclair AJ. 1999. Effects of dietary n-3 fatty acid deficiency and repletion in the guinea pig retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40(2):327-338.

-Vreugdenhil M, Bruehl C, Voskuyl RA, Kang JX, Leaf A, Waldman WJ. 1996. Polyunsaturated fatty acids modulate sodium and calcium currents in CA1 neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(22):12559-12563.