

Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Neurobiología



Relevancia de la activación del receptor GPR40 para los efectos del ácido docosahexaenoico en procesos de supervivencia, de crecimiento neurítico y de sinaptogénesis

ANA BELÉN PETERMANN TOLEDO

Tesis presentada a la escuela de graduados de la Universidad de Concepción para optar al grado de Magíster en Neurobiología

Tutor: Dr. Gonzalo Yévenes Crisóstomo

Co-Tutor: Dra. Katterine Salazar

Laboratorio de Neurofarmacología

Departamento de Fisiología

Departamento de Biología Celular

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Comisión evaluadora:

Dr. Fernando Martínez Acuña

Dra. Pía Vidal Vera

CONCEPCIÓN, CHILE

-2022-

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Fisiología y en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, en colaboración con el Centro de Microscopia Avanzada, CMA, UdeC.

Profesores integrantes del comité evaluador:

Profesor Guía

Dr. Gonzalo Yévenes Crisóstomo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dra. Katterine Salazar Martínez
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dra. Pía Vidal Vera
Facultad de Medicina
Universidad de católica de la Santísima Concepción

Dr. Fernando Martínez Acuña
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director subrogante Programa:

Dra. Patricio Castro Maldonado
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



Agradecimientos

Quisiera agradecer:

A los proyectos ANID-FONDECYT 1170252 y 1211082, por permitir el financiamiento de este trabajo.

A mi profesor guía y tutor Dr. Gonzalo Yévenes por todo el apoyo, paciencia, dedicación y disponibilidad brindados durante el proceso de estudio y posteriormente, durante el desarrollo de la tesis. También, por el instarme a seguir adelante y levantarme cuando lo necesite. Gracias por su motivación constante y mostrarme que cuando uno quiere nada es imposible. Finalmente, gracias por contribuir en mi desarrollo profesional en el área de neurobiología.

A mi profesor co-guía Dra. Katterine Salazar, por su disposición, paciencia y disponibilidad para guiarme durante el desarrollo de la tesis. Además, agradezco su contribución en los experimentos desarrollados en esta tesis y la entrega constante de conocimientos durante todo el proceso. Finalmente, agradezco las conversaciones críticas en torno a mejorar los experimentos y su tenacidad en todo momento.

A mi comité evaluador, conformado por la Dra. Pía Vidal y al Dr. Fernando Martínez, por su disponibilidad y muy buena disposición, desde el primer momento, para contribuir y mejorar mi trabajo de tesis.

Al equipo de Laboratorio de Neurofarmacología:

A Ana Maria Marileo, quien fue mi tutora por gran parte de mi formación, gracias por tu tiempo, paciencia, amabilidad y pasión por enseñar. Gracias por estar ahí para mi, y por tu dedicación.

A Victoria San Martín, gracias por formarme y guiarme con rigurosidad. Gracias por tu dedicación y fortaleza, pero sobre todo por nunca permitirme flaquear y centrarme cuando debía. Gracias a ti, estoy escribiendo esto, y terminando el magister.

A Anggelo Sazo, gracias por apoyarme con los experimentos y acompañarme hasta tan tarde haciéndolos. Gracias también, por tu paciencia y mostrarme que las cosas son mas sencillas de lo que uno cree.

A Cesar Lara, gracias por tu dedicación, dulzura y paciencia para enseñar. Por siempre estar dispuesto a ayudarme, muchas gracias.

Al personal técnico del laboratorio de neurofisiología (Ixia Cid, David Flaig, Oscar Ramírez y Laurie Aguayo), gracias por su apoyo y ayuda en los experimentos, y consejos, cuando lo necesite.

A todos los equipos de investigación que conforman el departamento de Fisiología de la Universidad de Concepción, gracias. Cuando entre, me dijeron que aprendería de todos y que finalmente, me llevaría lo mejor de cada uno. Hoy siento que es así. Me llevo todos conocimientos que me entregaron en conjunto y lo más lindo de cada uno de ustedes.

A Kathleen Escobar, gracias por tu amistad, por tomarme de la mano en este camino y guiarme, por instarme a entrar al magíster, gracias por existir.

A Aline Wendt, por ayudarme y enseñarme arduamente a usar un microscopio, pero, sobre todo por tu amistad y apoyo en todo momento.

Al equipo del Laboratorio de Neurobiología y células madre. En especial, a María José Oviedo y a Rocío Magdalena, por todo su apoyo, disponibilidad y cariño para enseñarme, siempre. A Eder Ramírez, por su excelente disposición y orientación cuando lo necesite.

Al Centro de Microscopia Avanzada, Udec. Gracias por contribuir en el desarrollo de mi tesis. Dentro de este equipo destaco a Germán Osorio, quien siempre me oriento y ayudo. Gracias por tu maravillosa labor, por tu sentido del humor y las risas. También, a Joanna Tereszczuk, por enseñarme y apoyarme incondicionalmente, en cada paso y aspecto nuevo a evaluar. Gracias por tus aportes en mi trabajo y siempre estar ahí para mí con cariño.

A mis profesores de Pregrado: MSc. Fredy Díaz, Susana Pincheira, por su infinita disposición a enseñarme, ayudarme y apoyarme siempre, y por siempre estar ahí para mí.

A la Dra. Ximena Ocampo, por darme la oportunidad de trabajar en experimentación, transmitirme su pasión por lo que hace y enseñarme a trabajar con rigor. También, a MSc. Daniela Jara, por guiarme desde tus enseñanzas, con cariño, pero a la vez, con rigidez, exactitud y propiedad. Además, por motivarme a seguir creciendo, y por tu amistad.

A mi familia, por su amor, apoyo incondicional y por creer en mí siempre.

A mi papá, por tu amor y tu mirada de orgullo, sé que no leerás esto, pero: Papa, no estudie medicina como querías, pero la investigación y experimentación es mucho mejor que medicina, y me encanta.

Finalmente, quiero agradecer a la vida y a Dios, por el regalo de tener a Sebastián como hermano. Gracias Seba, por tu amor incondicional, por ser mi compañero y amigo. Además, por tus sonrisas que me llenan, tu actitud de perseverancia y superación siempre. Te admiro mucho. Si no fuese por tu enfermedad yo no estaría aquí, definitivamente, lo que soy hoy, te lo debo a ti. Por amor a ti, esta tesis es para ti, te la dedico.

Índice de Contenido

1. Índice de Figuras	5
2. Abreviaturas.....	6
3. Resumen	9
4. Abstract.....	10
5. Introducción	11
5.1. Aspectos generales del ácido docosahexaenoico (DHA).....	11
5.2. Efectos del DHA en el sistema nervioso central	12
5.3. Participación del DHA en procesos de desarrollo y supervivencia neuronal	14
5.4. Efectos de DHA en la sinaptogénesis.....	15
5.5. Efectos de DHA en la arborización neuronal	17
5.6. Efectos de DHA en la supervivencia de células nerviosas	18
5.7. GPCRs como receptores de ácidos grasos	19
5.8. Receptor de ácidos grasos libre, GPR40.....	20
6. Hipótesis y Objetivos.....	25
6.1. Hipótesis	25
6.2. Objetivo general	25
6.3. Objetivos específicos.....	25
7. Metodología	27
7.1. Cultivos celulares	27
7.2. Tratamientos	28
7.3. Inmunocitoquímica.	29
7.4. Análisis y cuantificación de células en tiempo real mediante IncuCyte:	30
7.4.1. Ensayo de muerte celular:	30
7.5. Toma y procesamiento de imágenes.....	33
7.6. Estadística.....	34
8. 8. Resultados.....	35
8.1. Acciones del DHA en la supervivencia en células N2A en presencia y en ausencia del inhibidor del GPR40, GW1100.....	35

8.2. Efectos del DHA en el crecimiento neurítico y arborización neuronal en neuronas corticales en presencia y ausencia de GW1100.	39
8.3. Efectos del DHA en la expresión de la proteína sináptica SV2 en neuronas corticales, en presencia y en ausencia de GW1100.	44
8.4. La aplicación de 100 μ M de DHA provoca alteraciones morfológicas en neuronas corticales.	49
9. Discusión	51
10. Conclusiones	57
11. Bibliografía	58



1. Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química del ácido docosahexaenoico (DHA)	12
Figura 2. Modelo de incorporación de DHA (22:6) al SNC, a través, de la unidad neurovascular y su disposición dentro de neuronas y astrocitos	13
Figura 3. Representación esquemática de la especificidad de diferentes ligandos por sus respectivos receptores de ácidos grasos y sus vías señalización respectivas	20
Figura 4. Estructura del receptor GPR40/FFAR1 y representación de sus sitios de unión a ligandos	21
Figura 5. Expresión de GPR40/FFAR1 en el SNC	23
Figura 6. Metodología de ensayo de muerte mediante IncuCyte en células N2a.....	31
Figura 7. ROI de un área estándar de un proceso neuronal seleccionado para cuantificación	32
Figura 8. ROI del área del soma neuronal seleccionado para cuantificación.....	33
Figura 9. DHA promueve la sobrevivencia en células N2A a densidades de 2000 y 4000 células por pocillo	37
Figura 10. DHA promueve la sobrevivencia de células N2A a través del receptor GPR40.....	38
Figura 11. Cuantificación de la arborización y numero de intersecciones en cultivo primario de neuronas corticales en presencia de concentraciones de DHA menores a 25 μ M.....	40
Figura 12. Cuantificación de la arborización y numero de intersecciones en cultivo primario de neuronas corticales en presencia de concentraciones de 25 μ M y 50 μ M DHA	41
Figura 13. Cuantificación de la arborización y numero de intersecciones en cultivo primario de neuronas corticales incubadas con DHA y GW1100	43
Figura 14. Inmunoreactividad de la proteína sináptica SV2 en los procesos neuríticos de neuronas corticales bajo diferentes concentraciones de DHA	45
Figura 15. Cambios en la inmunoreactividad de SV2 producidos por diferentes concentraciones de DHA en somas de neuronas corticales	46
Figura 16. Inmunoreactividad de SV2 en los procesos neuríticos de neuronas corticales bajo diferentes concentraciones de DHA en presencia de GW1100.....	48
Figura 17. Pérdida de la morfología neuronal inducida por 100 μ M de DHA, en presencia y en ausencia de GW1100.....	50

2. Abreviaturas

DHA: Ácido docosahexaenoico

SNC: Sistema nervioso central

GPR40: Receptor 40 ligado a proteína G

ALA: Ácido α -linoleico

ARA: Ácido araquidónico

EPA: Ácido eicosapentaenoico

22:6-PL: 22:6-fosfolípidos

NPD1: Neuroprotectina D1

PC12: Células de feocromocitoma de médula espinal de rata

OLA: Ácido oleico

DPA: Ácido docosapentaenoico

GLUR-1: Subunidad del receptor AMPA

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

PSD-95: Proteína de andamiaje de la densidad post-sináptica 95

PSD-93: Proteína de andamiaje de la densidad post-sináptica 93

LTP: Potenciación a largo plazo

GAP-43: Proteína 43 asociada al crecimiento o plasticidad del cono axonal

NGF: Factor de crecimiento nervioso

RXR: Receptor X de retinoide

CREB: Factor de transcripción

NPCs: Células progenitoras neurales humanas

AP: Ácido Palmítico

[PI (3)K]/AKt: Vía de señalización fosfatidilinositol 3-quinasa

FS: Fosfatidilserina

GPCRs: Receptores transmembrana acoplados a proteínas G

GPR41: Receptor 41 ligado a proteína G

FFAR3: Receptor 3 de ácidos grasos libres

GPR43: Receptor 43 ligado a proteína G

FFAR2: Receptor 2 de ácidos grasos libres

GPR120: Receptor 120 ligado a proteína G

FFAR4: Receptor 4 de ácidos grasos libres

FFAR1: Receptor 1 de ácidos grasos libres

LCFAs: Ácidos grasos de cadena media - larga

AC: Adenilato ciclasa

DAG: Diacilglicerol

IP3: Inositol trifosfato

LPS: Lipopolisacárido

PI3K: Fosfatidilinositol 3 -quinasa

PKC: Proteína quinasa C

PKD: Proteína quinasa D

PLC: Fosfolipasa C

TNF: Factor de necrosis tumoral

EC₅₀: Concentración media máxima eficaz

TAK-875: Agonista selectivo sintético de GPR40

PLC/IP3/DAG: Vía de señalización Fosfolipasa C/ Inositol trifosfato/ Diacilglicerol

GADPH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana

GW1100: Antagonista específico de GPR40

GW9508: Agonista sintético de GPR40

HEK-293: Célula embrionaria humana de riñón 293

C57BL/6: Cepa endogámica de ratón para investigación

MEM: Medio esencial mínimo

DIV: Días de incubación *in vitro*

N2a: Línea celular de neuroblastoma cerebral de ratón

SV2: Proteína 2 de vesícula sináptica

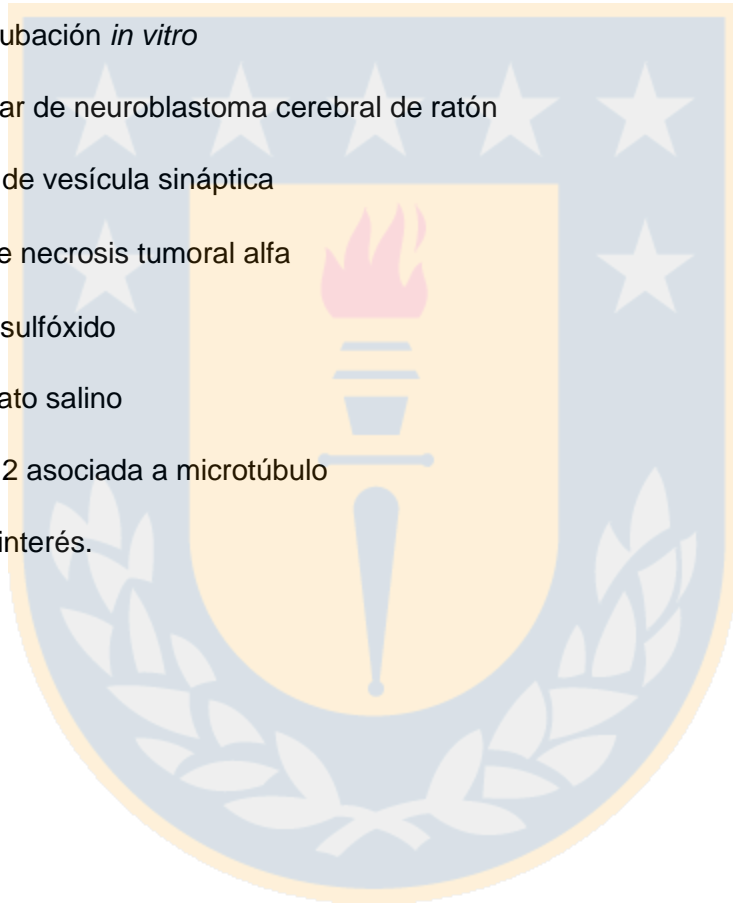
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

DMSO: Di-metil-sulfóxido

PBS: Buffer fosfato salino

MAP2: Proteína 2 asociada a microtúbulo

ROI: Región de interés.



3. Resumen

En las tres últimas décadas, la señalización mediada por ácidos grasos ha tomado gran relevancia. En este contexto, el ácido docosahexaenoico (DHA) ha reunido especial interés debido a sus propiedades benéficas para el funcionamiento del sistema nervioso central (SNC). Diversos estudios han demostrado que el DHA favorece la expresión de marcadores de crecimiento axonal y de proteínas sinápticas, y, además, estimula el crecimiento de ramificaciones neuríticas. Por el contrario, niveles disminuidos de DHA se han asociado a alteraciones en la neurogénesis y en el crecimiento neurítico. Evidencia reciente ha propuesto que la activación del receptor GPR40 por DHA, sería un mecanismo clave en las acciones tróficas de DHA, sin embargo, estas evidencias son escasas y requieren ser ampliadas. A partir de estos antecedentes, nuestra hipótesis plantea que la activación del receptor GPR40 es necesaria para los efectos benéficos del DHA en procesos de supervivencia, de crecimiento neurítico y de sinaptogénesis de células neuronales en cultivo *in vitro*. Es por esto, que estudiamos la relevancia de la activación del receptor GPR40 en los efectos tróficos de DHA en procesos de supervivencia, de crecimiento neurítico y de sinaptogénesis en cultivos primarios de neuronas corticales y en células N2A. Utilizando técnicas automatizadas, a través, de mediciones en tiempo real, obtuvimos que DHA ejerce un efecto positivo en la supervivencia de células N2A, de manera concentración dependiente. Los análisis de Sholl realizados a imágenes de microscopía de super resolución, sugieren que DHA estimula el crecimiento neurítico. Finalmente, análisis de intensidad de fluorescencia, a partir, de inmunocitoquímicas realizadas a neuronas corticales, arrojaron que DHA promueve la expresión del marcador presináptico SV2. Lo que respecta a GPR40, nuestros hallazgos utilizando un inhibidor selectivo para este receptor, mostraron que los efectos benéficos de DHA son en gran parte mediados por GPR40. En conclusión, reprodujimos hallazgos previamente publicados por otros grupos respecto a los efectos de DHA en los eventos de desarrollo neuronal que estudiamos y también, reforzamos el concepto de DHA como un nutriente fundamental para el desarrollo neuronal. Nuestros hallazgos utilizando el inhibidor de GPR40, GW1100, aportan evidencias novedosas respecto a un mecanismo de transducción específico implicado en la señalización gatillada por DHA y ácidos grasos en células del sistema nervioso central. Futuros experimentos contribuirían en el estudio de las vías de transducción implicadas en los efectos de DHA mediados por GPR40 y esclarecer las complejas vías de señalización involucradas en los efectos benéficos y tóxicos del DHA en el sistema nervioso central.

4. Abstract

In the last three decades, signaling driven by fatty acids has become very important. In this context, docosahexaenoic acid (DHA) has been widely recognized for its beneficial properties on central nervous system functions (CNS). Different studies have shown that DHA promote the expression of axonal growth markers and synaptic proteins, and stimulates the growth of neuritic branches. On the other hand, the reduction on DHA levels has been associated with alterations in neurogenesis and neuritic growth. Recent evidence proposes that GPR40 receptor activation by DHA would be a key mechanism in the trophic actions of DHA, however, this evidence is scarce and needs to be expanded. In line with these antecedents, we hypothesize that GPR40 receptor activation is necessary for the beneficial effects of DHA, in survival processes, neuritic growth, and synaptogenesis on cultured neuronal cells *in vitro*. For this reason, we studied the relevance of GPR40 receptor activation in the trophic effects of DHA in survival processes, neuritic growth, and synaptogenesis on mice cultured cortical neurons and N2A cells. Using automatized techniques, through real-time measurements with IncuCyte S3 equipment, we observed that DHA has a positive effect on the survival of N2A cells, in a concentration-dependent manner. Sholl's analyzes performed on super-resolution microscopy images suggest that DHA stimulates neurite outgrowth on cortical neurons in culture. Finally, fluorescence intensity assay, based on immunocytochemistry performed on cortical neurons, demonstrated that DHA promotes the expression of SV2 presynaptic marker. About GPR40, our findings using a selective inhibitor for this receptor, showed that beneficial effects of DHA are largely mediated by GPR40. In conclusion, we reproduced findings previously published by other groups about DHA effects on neuronal developmental events and also reinforce the concept of DHA, as a fundamental nutrient for neuronal development. Our findings using the GPR40 inhibitor, GW1100, provide novel evidence about specific pathways involved in the beneficial and toxic effects of DHA in the central nervous system cells. Future experiments Will contribute to the study of transduction pathways implicated in DHA effects through GPR40 and clarify the complex signaling pathways into DHA benefits and toxics effects in the CN

5. Introducción

5.1. Aspectos generales del ácido docosahexaenoico (DHA)

El ácido docosahexaenoico (DHA) ($C_{22}H_{32}O_2$), es un ácido graso poliinsaturado de cadena larga, compuesto por 22 carbonos y 6 dobles enlaces en configuración Cis, junto con un ácido carboxílico terminal ($-CO_2H$) (Calder, 2016). El DHA es denominado omega-3 por presentar un primer doble enlace en el carbono 3, desde el carbono omega (Calder, 2016) [Figura1]. El DHA es incorporado principalmente a través del consumo de alimentos de origen marino (pescado, aceite de krill, etc). Sin embargo, y aunque en bajo rendimiento, el DHA también puede ser sintetizado a partir del ácido α -linoleico (ALA). Estudios diversos han mostrado que menos del 1 % del ALA es convertido en DHA (Calder, 2016; Echeverría et al., 2017).

La recomendación nutricional diaria de DHA para adultos es de 250 mg (DHA + ácido eicosapentaenoico (EPA) (Marshall, 2011; Li et al., 2021). Para embarazadas y nodrizas, se sugiere el consumo de 100 a 200 mg de DHA adicionales (Flock et al., 2013). Con respecto al consumo de DHA en la población chilena, se indica la siguiente guía alimentaria: “Consumir al menos 2 veces por semana pescado al horno o a la plancha” (Mosteiro, 2009). La ingesta de DHA se considera segura y los efectos secundarios reportados son menores: sabor a pescado, náuseas, gases intestinales, entre otros (Flock et al., 2013). Sin embargo, aun no se ha establecido un máximo diario tolerable (Flock et al., 2013).

El DHA se encuentra de manera abundante en el sistema nervioso central y periférico. Este ácido graso, se encuentra concentrado principalmente en los fosfolípidos de las membranas neuronales y gliales, constituyendo un 25 % del total de ácidos grasos presentes en la corteza cerebral, 30 % en la retina y 60 % en las células fotorreceptoras (Valenzuela B et al., 2013; Calder, 2016; Echeverría et al., 2017)

El DHA contribuye a la mantención y a la integridad funcional de las membranas celulares (Martínez & Mougán, 1998; Echeverría et al., 2017). De modo interesante, diversos estudios han demostrado que la disminución en los niveles de DHA genera alteraciones en la neurogénesis, el crecimiento neurítico y en la neurotransmisión (Dyall, 2015; Tang et al., 2018). Al respecto, investigaciones realizadas en ratas envejecidas con deficiencia de omega 3 mostraron que la administración de DHA por 7 semanas, incrementó la neurogénesis en el hipotálamo (Kawakita et al., 2006). Otros estudios complementarios han sugerido que la progresión de la neurogénesis se encuentra relacionado con el tipo y

la cantidad de ácido grasos que tenga el tejido (Tang et al., 2018). Por ejemplo, en el caso del ácido araquidónico (ARA) y DHA, se ha observado que pese a que ambos son ácidos grasos, sus efectos sobre la mantención y diferenciación de neuroesferas de células madres, fueron significativamente diferentes (Sakayor et al., 2011).

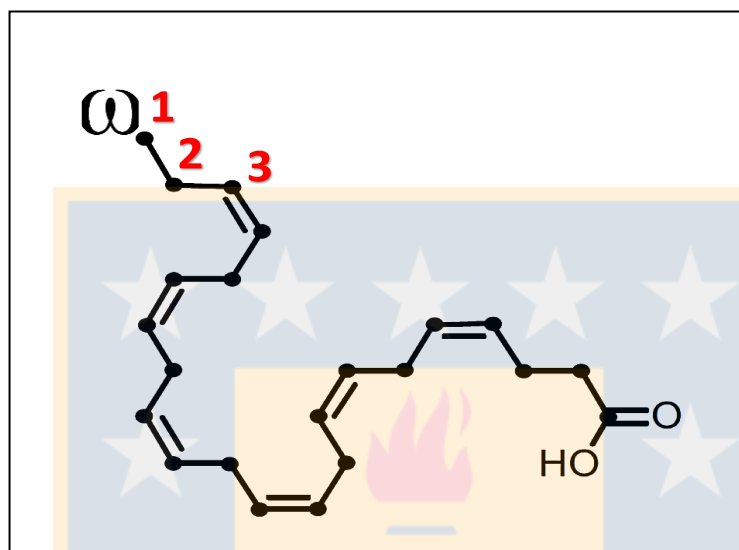


Figura 1. Estructura química del ácido docosahexaenoico (DHA). Modificado de Bazan et al., 2011.

5.2. Efectos del DHA en el sistema nervioso central

El DHA contribuye a la correcta función de los sistemas inmune, cardiovascular y nervioso (Hachem et al., 2016), principalmente modulando la expresión de genes, la inflamación y el estrés oxidativo (Dyall & Michael-Titus, 2008; Pan et al., 2015). Sin embargo, los mecanismos involucrados en la movilización de DHA hacia el sistema nervioso central (SNC) no se encuentran completamente dilucidados (Horrocks & Farooqui, 2004). Investigaciones han sugerido que el DHA sería absorbido desde la circulación sanguínea por células endoteliales, para luego ser transferido al sistema nervioso central [Figura 2] (Bazan et al., 2011.) Posteriormente, el DHA sería distribuido entre astrocitos y neuronas, mediante mecanismos aun en estudio.

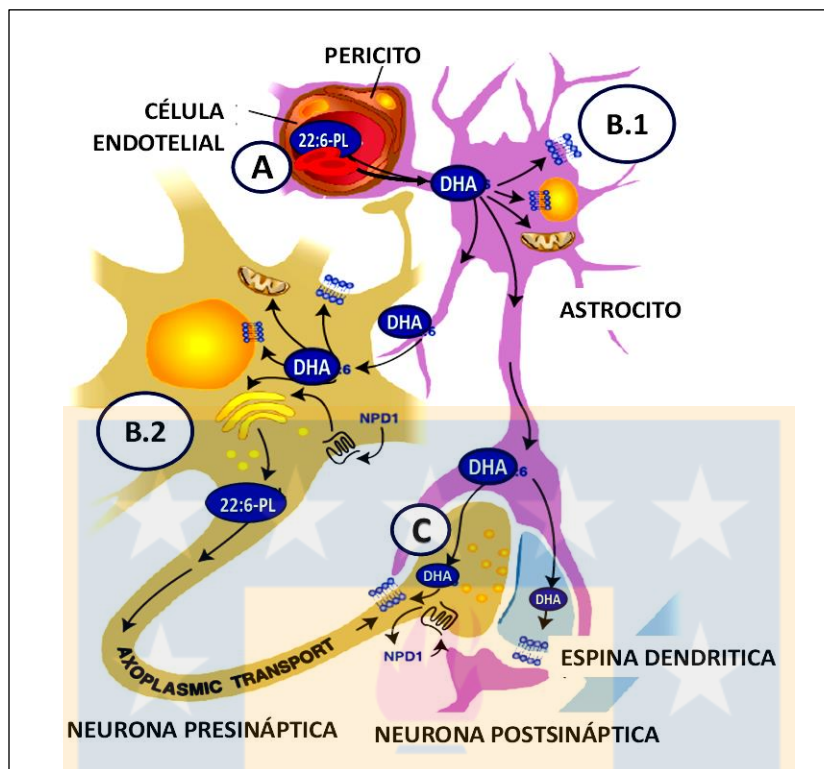


Figura 2. Modelo de incorporación de DHA (22:6) al SNC, a través, de la unidad neurovascular y su disposición dentro de neuronas y astrocitos. (A) 22:6-fosfolípidos (22:6-PL) son absorbidos por células endoteliales desde la circulación y son transferidos a los astrocitos. DHA es incorporado en los astrocitos (B.1) y transferido a neuronas (B.2), en donde se encuentra disponible para su conversión a neuroprotectina D1 (NPD1). **(C)** Luego del paso por el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, DHA es transportado a la terminal sináptica para incorporarse a elementos sinápticos. Dentro de la ruta de incorporación de DHA, aún falta por dilucidar la caracterización molecular de los transportadores y receptores involucrados. Las flechas, que se presentan en la imagen, representan las posibles rutas para DHA. Modificado de (Bazan et al., 2011).

La movilización de DHA a través de la unidad neurovascular y de su posterior ingreso a neuronas y astrocitos [Figura 2] permitiría sus efectos beneficiosos en diferentes trastornos del SNC, como por ejemplo: depresión, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, dolor crónico, entre otros (Horrocks & Farooqui, 2004; S. C. Dyall & Michael-Titus, 2008; Valenzuela B et al., 2013). Al respecto, evidencias en ratones han mostrado que DHA modula la sensibilidad al dolor inducida por mediadores inflamatorios en el test de formalina (Nakamoto et al., 2012). Otros estudios han mostrado que la suplementación de DHA durante 1 semana, en ratas bajo estrés con deficiencia de ácidos grasos omega 3, mejoró índices conductuales alterados (Takeuchi et al., 2003). A pesar de ello, los

mecanismos específicos por los cuales DHA ejercería tales efectos no están totalmente definidos y se encuentran en investigación (Valenzuela et al., 2013).

5.3. Participación del DHA en procesos de desarrollo y sobrevivencia neuronal

El desarrollo del sistema nervioso implica la génesis de neuronas y células gliales (Xavier et al., 2014), el desarrollo neuronal depende de procesos proliferativos, de migración, de diferenciación y de supervivencia, dentro de los cuales destacan diferentes hitos biológicos imprescindibles, que se encuentran implicados de manera directa, con la formación de diferentes estructuras del sistema (Semple et al., 2013; Silbereis et al., 2016). Conceptualmente, los hitos biológicos que constituyen el desarrollo neuronal se definen en. i. Proliferación: hito que se caracteriza por la producción de nuevas células (Silbereis et al., 2016), ii. Migración: hito en el cual, las células se mueven hacia sus destinos, dentro del cerebro (Silbereis et al., 2016). iii. Diferenciación: durante este hito, las neuronas adquieren su morfología con características únicas, gracias a la formación del axón y las dendritas (Kiernan & Rajakumar, 2013; Silbereis et al., 2016), iv. Mielinización: la característica principal de este hito es el recubrimiento de mielina en algunos axones. Este hito es clave en la maduración funcional del SNC (Silbereis et al., 2016). v. Agrupamiento neuronal y sinaptogénesis: en este hito, se produce la asociación de las células nerviosas entre sí, con la finalidad de formar diferentes estructuras dentro del sistema nervioso (Valiente & Marín, 2010). El proceso de agrupación neuronal contribuye a formar las conexiones sinápticas primarias, lo cual se denomina sinaptogénesis (Waites et al., 2005)

Respecto al rol de DHA durante el desarrollo neuronal, diversos antecedentes muestran que esta molécula ejerce efectos neurotróficos, similares a los generados por las neurotrofinas. Por ejemplo, la suplementación de DHA y ácido araquidónico a cultivos de células PC12 promovió el crecimiento neurítico inducido por el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Ikemoto et al., 1997). Relacionado a ello, experimentos realizados en ratas envejecidas con deficiencia de omega 3 mostraron que la administración de DHA, incrementó la neurogénesis en el hipotálamo (Kawakita et al., 2006). Al respecto, DHA, también aumentó significativamente los niveles de biomarcadores tempranos de neurogénesis (Egr3 y PC3) dentro de la primera hora post-suplementación (Dagai et al., 2009). En lo que respecta a la diferenciación, se ha demostrado que la incubación de células madre neurales por 4 días con 10 μ M de DHA fue capaz de promover la presencia de

neuronas maduras (Kawakita et al., 2006). A su vez, la aplicación de DHA también promovió la diferenciación neuronal en células madre de rata transfectadas con el gen del receptor de ácidos grasos GPR40 (Ma et al., 2010). Finalmente, DHA también mostró efectos positivos sobre la supervivencia neuronal. La aplicación de una concentración de 10 μM de DHA redujo la apoptosis de neuronas diferenciadas a partir de células madre de rata (Kawakita et al., 2006). Además, el tratamiento crónico (24-48 hrs) de DHA (2.5 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM) promovió la viabilidad de células progenitoras neurales (Zhao et al., 2019).

5.4. Efectos de DHA en la sinaptogénesis

La sinaptogénesis es un concepto que agrupa a un conjunto de cambios bioquímicos y morfológicos que permiten la formación de sinapsis funcionales entre neuronas (Andersen, 2003). La característica principal de la sinaptogénesis es una sobreproducción de sinapsis (Semple et al., 2013). La sobreproducción de sinapsis se debe a que las neuronas al nacer, experimentan un periodo de gran arborización, y por consiguiente, un alza de sus contactos sinápticos (Shen & Cowan, 2010; Petzoldt & Sigrist, 2014). Posteriormente, se produce una fase de poda sináptica o de refinamiento (Andersen, 2003), la cual es esencial para la función sináptica (Tönnies & Trushina, 2017) . A su vez, la función sináptica se encuentra regulada por diversos componentes pre- y postsinápticos, implicados en la sinapsis (Murai & Pasquale, 2004).

Diversos estudios sugieren que la administración de DHA promueve la expresión de diferentes proteínas sinápticas, como es el caso de la sinapsina I, la cual se expresa en los terminales pre-sinápticos (Ziv & Garner, 2004). La sinapsina I se encuentra asociada a la membrana de las vesículas sinápticas (Südhof et al., 1989) y ha sido identificada como un componente molecular crítico relacionado a la sinaptogénesis y la maduración funcional de la sinapsis (Lu et al., 1992; Chin et al., 1995). En este contexto, la administración de 1 μM de DHA, durante 10 días, generó un aumento significativo en el número de “*punctas*” sinápticas de sinapsina I (sinapsina asociada con vesículas sinápticas) en cultivos primarios hipocampales (Cao et al., 2009). De manera interesante, el mismo estudio mostró que el aumento de la expresión de sinapsina I fue dependiente de la administración de DHA. Por otra parte, la administración de ARA, ácido oleico (OLA) o ácido docosapentaenoico (DPA) no logró modular la expresión de sinapsina I (Cao et al., 2009). Otros estudios mostraron que el DHA modula los niveles de expresión de proteínas post-sinápticas, tales como

GLUR-1 y PSD-95, en el hipocampo de gerbos adultos (Sakamoto et al., 2007). GLUR-1 corresponde a una subunidad del receptor AMPA (Kasai et al., 2003) y PSD-95 a una proteína de andamiaje de la densidad post-sináptica (El-Husseini et al., 2000). Ambas proteínas están asociadas con el crecimiento de las espinas dendríticas y con la amplitud de respuestas post-sinápticas (Matsuzaki et al., 2004). Coincidentemente, el mismo estudio mostró que la aplicación de DHA además elevó los niveles de expresión de actina, proteína de citoesqueleto capaz de regular estructuras sinápticas y espinas dendríticas (Sakamoto et al., 2007). De modo interesante, otros investigadores identificaron 18 proteínas pre y post sinápticas (espectrina beta 2, dinamina-1, PSD-93, entre otras) que disminuyeron su expresión producto del déficit de DHA a nivel cerebral en ratones (Sidhu et al., 2011). Sin embargo, la administración de un contenido adecuado de DHA (2.5% de ácido linoleico + 0,9 % DHA), durante 2 meses, contrarrestó parcialmente la alteración de la expresión de algunas proteínas sinápticas, regulando positivamente 9 proteínas relacionadas con reciclaje vesicular y neurotransmisión en ratones (Sidhu et al., 2016). En relación a estos resultados, la administración de DHA (15 $\mu\text{g/g}$ i.p), también logró contrarrestar el deterioro de la sinaptogénesis producido por sevofluorano, aumentando los niveles de expresión de PSD95, sinaptofisina y β -actina en el hipocampo de los ratones tratados (Tao et al., 2016). Por otra parte, se demostró que DHA fue capaz de promover la síntesis de membranas sinápticas, elevando el número y la densidad de las espinas dendríticas en un 18% (Sakamoto et al., 2007).

En línea con sus efectos a nivel de proteínas sinápticas, el DHA también ha demostrado ejercer efectos funcionales relacionados a fenómenos de plasticidad sináptica. Por ejemplo, una investigación realizada en rebanadas de hipocampo mostró que la inhibición de la potenciación a largo plazo (LTP) inducida por bromoenol lactona (un inhibidor de la fosfolipasa independiente de calcio A2) fue revertida por una aplicación aguda de 30 μM de DHA (Mazzocchi-Jones, 2015). Otros estudios han reportado que la suplementación con DHA produjo un aumento significativo en el crecimiento neurítico, sinaptogénesis, niveles de proteínas sinápticas y potenciación a largo plazo (LTP) en cultivos primarios hipocámpales (Cao et al., 2009).

5.5. Efectos de DHA en la arborización neuronal

El proceso de arborización se define como un proceso de maduración en el cual las dendritas son elaboradas con una estructura altamente ramificada y estereotipada (Lanoue & Cooper, 2019). La arborización ocurre bajo un estricto control espacio temporal, regulado por una compleja interacción entre factores extrínsecos e intrínsecos (Jan & Jan, 2010; Lanoue & Cooper, 2019). La finalidad de la arborización es que cada neurona reciba axones desde neuronas presinápticas y a su vez, puedan proyectar su axón a otras células nerviosas. Durante la arborización también se produce el desarrollo de neuritas como también de espinas dendríticas. El crecimiento axónico está determinado por el cono de crecimiento, el cual guía el crecimiento de la neurita hacia las neuronas con las que ha de establecer contactos (Gallo, 2013). Durante su proceso de elongación, la neurita puede sufrir arborización dendrítica (Rösner et al., 2007). El árbol dendrítico posee una estructura única para cada subtipo de neurona, lo que permite una diversidad relevante para las funciones del SNC (Lanoue & Cooper, 2019). La morfología neuronal esencial incluye el soma, tamaño del cuerpo celular, ramificación desde el axón, largo del axón y el número de dendritas (Ascoli, 2006; Scorcioni et al., 2008; Friedman, 2020).

En el contexto de la morfología neuronal, diferentes estudios han reportado que la aplicación de DHA (25 μ M, 24-48 hrs. de incubación) estimuló el crecimiento, el largo y las ramificaciones de neuronas corticales (Cao et al., 2005). Estudios adicionales reportaron que otros ácidos grasos (tales como OLA, ARA, ácido docosapentaenoico (DPA) no tuvieron mayores efectos en la morfología neuronal (Novak et al., 2008; Cao et al., 2009). De manera interesante, DHA logró restablecer el largo neurítico de una población neuronal de hipocampo de rata con déficit dietario de DHA, alcanzando las características del grupo control (Calderon & Kim, 2004). Por otra parte, neuronas corticales tratadas con DHA mostraron un aumento del crecimiento axonal (Mita et al., 2016). Coincidentemente, estudios han mostrado que la aplicación de DHA además aumentó la expresión de marcadores de crecimiento del cono axonal (GAP-43) (Cao et al., 2005). Además, la aplicación de DHA (4 μ M) a cultivos de neuronas hipocampales generó un aumento en la complejidad de las arborizaciones dendríticas (Chang et al., 2015; Carbone et al., 2020). En línea con estas evidencias, la suplementación de DHA a cultivos de células PC12 promovió y aceleró el crecimiento neurítico inducido por factor de crecimiento nervioso (NGF) (Ikemoto et al., 1997; Darios & Davletov, 2006; Dagai et al., 2009).

Diferentes líneas de investigación han sugerido que los efectos del DHA sobre la morfología neuronal estarían asociados con la activación de diversos tipos de receptores. En este contexto destacan las investigaciones que mostraron que DHA actúa como ligando del receptor X de retinoide (RXR), el cual pertenece a la familia de receptores nucleares de hormonas activados por ligando (Heyman et al., 1992; Urquiza et al., 2000). Sin embargo, ensayos en neuronas hipocampales mostraron que la aplicación de una concentración de 10 μ M de DHA activa el crecimiento neurítico mediante mecanismos independientes del RXR (Calderon & Kim, 2007). En este punto, es importante destacar que se han descubierto otras familias de receptores activados por ácidos grasos y por DHA (ver sección 5.7 y 5.8), los cuales han sido relacionados con los efectos neurotróficos de una amplia gama de ácidos grasos.

5.6. Efectos de DHA en la sobrevivencia de células nerviosas

El DHA, ha sido caracterizado como el ácido graso con mayor influencia en procesos implicados en el desarrollo cerebral (Uauy & Dangour, 2006). Al respecto, estudios recientes sugieren que los efectos de DHA se deben a sus acciones a nivel del transcriptoma (Zhao et al., 2019). En este contexto, se ha sugerido que DHA regularía la vía de activación de CREB (W. N. Zhao et al., 2019), la cual posee un rol esencial en fenómenos de plasticidad sináptica y de regulación de la sobrevivencia celular (Shaywitz & Greenberg, 1999). Experimentos a nivel molecular realizados en células progenitoras neurales humanas (NPCs) mostraron que la incubación con DHA regula la vía de CREB de manera concentración dependiente, observándose un efecto significativo en la señalización de CREB a una concentración de 25 μ M y 50 μ M de DHA (Zhao et al., 2019). Interesantemente, OLA (omega-9), a diferencia del DHA (omega-3), no estimuló la actividad de CREB, sugiriendo que la regulación de esta vía no está dada por este tipo de ácido graso (Zhao et al., 2019). Otros estudios han mostrado que la incubación con concentraciones micromolares de DHA previno la muerte natural en neuronas corticales (Cao et al., 2005), disminuyó la apoptosis de neuronas diferenciadas a partir de células madre de rata (Kawakita et al., 2006) y rescató la viabilidad de NPCs humanas (Zhao et al., 2019). De manera interesante, la co-administración de DHA con ácido palmítico (AP) fue capaz de generar efectos sinérgicos en la sobrevivencia celular. Estudios realizados con células PC12 diferenciadas con NGF, incubadas con ácido palmítico (AP) y pretratadas con DHA, presentaron una marcada disminución en la actividad de la caspasa 3 (Montero et al.,

2020). A su vez, la aplicación de DHA (60 μ M) por 24 horas previno la pérdida de viabilidad inducida por peróxido de hidrogeno en células PC12 (Clementi et al., 2019; Torres et al., 2020).

Por otra parte, otros autores han propuesto que la vía de señalización fosfatidilinositol 3-quinasa [PI₃K]/AKt está relacionada a los efectos benéficos de DHA (Akbar et al., 2005). Experimentos realizados en células Neuro 2A enriquecidas con DHA mostraron efectos anti apoptóticos mediados por la vía [PI₃K]/AKt (Akbar et al., 2005). Coincidentemente, una dieta deficiente en DHA disminuyó la fosfatidilserina (FS) en el hipocampo de ratas y aumentó la susceptibilidad de apoptosis en estas células (Akbar et al., 2005). Estos resultados sugieren que la aplicación de DHA modifica el contenido de ácidos grasos en la membrana plasmática, lo que a su vez afectaría la señalización AKt, impactando positivamente en la supervivencia neuronal (Akbar et al., 2005).

5.7. GPCRs como receptores de ácidos grasos

En las últimas décadas, diferentes familias de proteínas han sido identificadas y caracterizadas como mediadores de procesos de señalización gatillados por ácidos grasos (Falomir-Lockhart et al., 2019). Dentro de estas proteínas, destacan los receptores transmembrana acoplados a proteínas G, denominados como GPCRs (Jones et al., 2020). Los GPCRs poseen 7 dominios transmembrana y comprenden una amplia familia de proteínas de receptores de membrana (Jones et al., 2020). Estos receptores son capaces de unir ligandos diversos a nivel extracelular, desencadenando la activación de vías de transducción intracelular y respuestas celulares (Hara et al., 2013) [Figura3]. Los GPCRs se encuentran ampliamente expresados en el SNC y coordinan un extenso rango de funciones fisiológicas (Alavi et al., 2018; Falomir-Lockhart et al., 2019). A partir de los GPCRS, se desprende un subgrupo denominado: "GPCRs huérfanos". Conceptualmente, los GPCRs huérfanos son aquellos GPCRs para los cuales no se ha identificado un ligando endógeno (Itoh et al., 2003). Estos receptores huérfanos fueron denominados como GPRs, seguidos de un número (Falomir-Lockhart et al., 2019). En base a esta nomenclatura, se ha detectado los siguientes receptores de ácidos grasos: GPR40 (FFAR1); GPR120(FFAR4); GPR41(FFAR3) y GPR43(FFAR2) (Den Besten et al., 2013; Kimura et al., 2020). Estudios farmacológicos han sugerido que el GPR41(FFAR3) y el GPR43(FFAR2) son activados por ácidos grasos de cadena corta, mientras que el GPR120(FFAR4) y el GPR40 (FFAR1) son

activados por ácidos grasos de cadena media y larga (Hara et al., 2013; Kimura et al., 2020) [Figura 3]. Así, cada uno de estos GPCRs actúa como sensor de ácidos grasos de ciertos largos de su cadena carbonada (Hara et al., 2013).

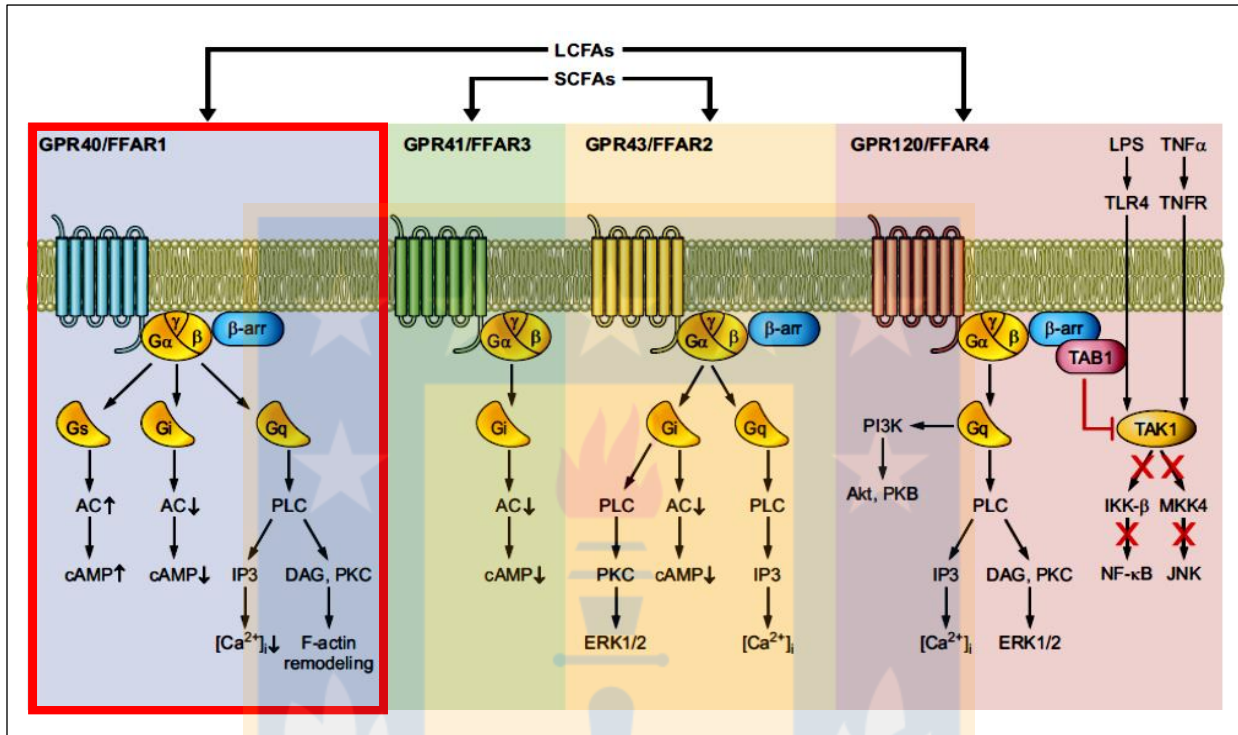


Figura 3. Representación esquemática de la especificidad de diferentes ligandos por sus respectivos receptores de ácidos grasos y sus vías de señalización respectivas. Los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) activan a los receptores GPR41(FFAR3) y GPR43(FFAR2). Los ácidos grasos de cadena media - larga (LCFAs) activan a los receptores GPR120(FFAR4) y GPR40 (FFAR1). En la imagen, se observa el receptor GPR40/FFAR1 y su vía de señalización respectiva, dentro del recuadro, en color rojo. Además, se indican las vías de señalización intracelular para cada receptor. AC; adenilato ciclasa, DAG; diacilglicerol, IP3; Inositol trifosfato, LPS; lipopolisacárido, PI3K; fosfatidilinositol 3 -quinasa, PKC; proteína quinasa C, PKD; proteína quinasa D, PLC; fosfolipasa C, TNF; factor de necrosis tumoral. Modificado de (Kimura et al., 2020)

5.8. Receptor de ácidos grasos libre, GPR40.

El receptor GPR40, también conocido como receptor de ácidos grasos libres (FFA1), deja de ser huérfano al revelarse que su activación era dada por ácidos grasos de cadena media (entre 6-12 carbonos) y larga (12 carbonos o más), saturados (siendo de 2-6 carbonos inactivos e importando el largo de la cadena) e insaturados (Itoh et al., 2003; Kimura et al., 2020). En el caso particular de GPR40, se destacó que junto con el largo de

la cadena carbonada, el ácido carboxílico terminal de la estructura también es un componente esencial para llevar a cabo la activación del receptor (Briscoe et al., 2003; Itoh et al., 2003; Offermanns, 2014). Las familias de ácidos grasos omega -6 y omega 3, lo que incluye el DHA, activan el GPR40 con valores de EC_{50} cercanos al rango micromolar entre 1 a 15 μM (Offermanns, 2014) [Figura 4]. Dentro del grupo de ácidos grasos insaturados, el DHA es el agonista más potente de GPR40 (Offermanns, 2014), mientras que en el grupo de los ácidos grasos saturados, el ácido palmítico es el que presenta mayor afinidad por GPR40 (Kimura et al., 2020).

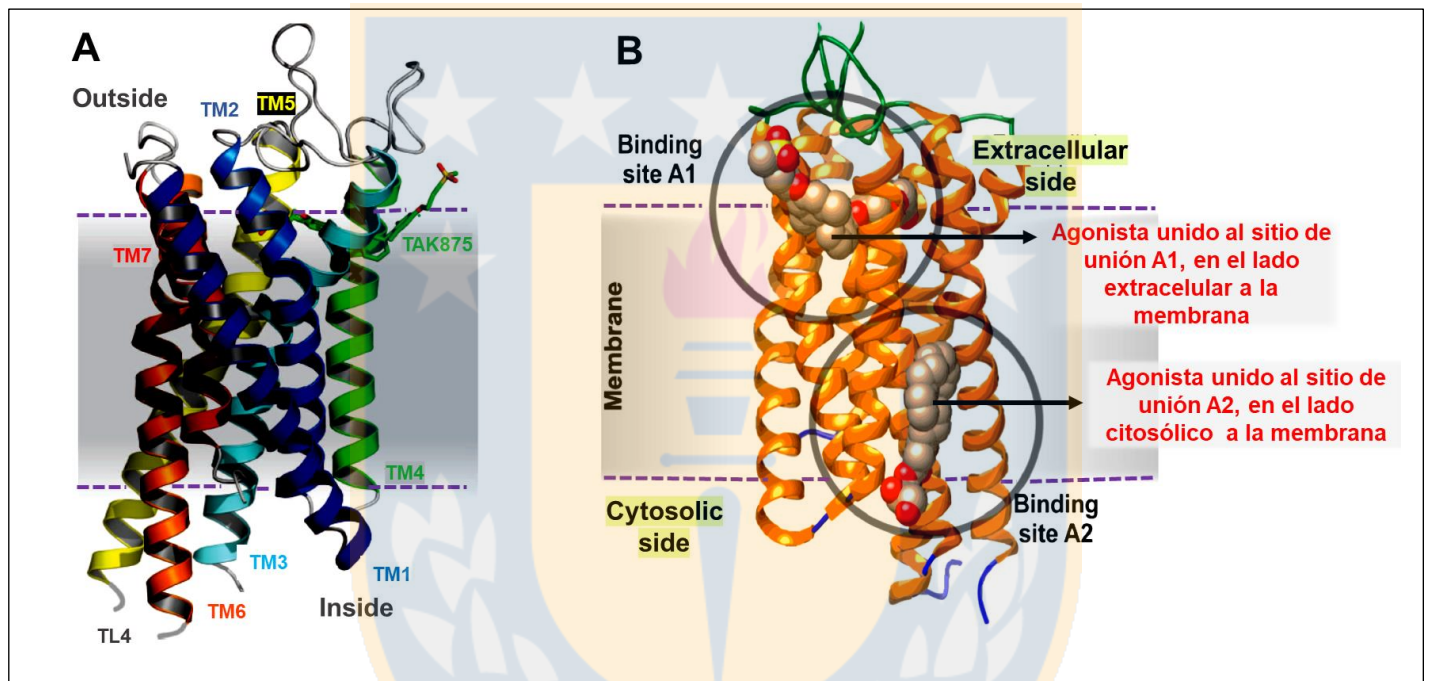


Figura 4. Estructura del receptor GPR40/FFAR1 y representación de sus sitios de unión a ligandos. (A) Representación de GPR40/FFAR1, incluyendo dominios intracelular y extracelular. La posición relativa de la membrana se muestra delimitada por una línea punteada en color morado. Cada uno de los 7 dominios transmembrana del receptor está compuesto por una hélice alfa que se encuentra representada por un color distinto. (B) Representación de los sitios de unión a ligandos de GPR40/FFAR1 (PDB-ID:4PHU). Se destacan 2 sitios de unión para ligando, en lados opuestos de la membrana y entre sí, en donde se observa que el agonista de GPR40, TAK-875, se une al sitio de unión alostérico ubicado entre TM3 (color celeste) y TM4 (color verde). Modificado de Falomir-Lockhart et al., 2019; Srivastava et al., 2014.

Los estudios iniciales reportaron que GPR40 se acoplaba a la proteína G_q (Itoh et al., 2003; Shapiro et al., 2005; Stoddart et al., 2007). Sin embargo, otras líneas de evidencias han sugerido que el GPR40 puede acoplarse a tanto a G_i (Itoh et al., 2003; Schröder et al.,

2011) como a G_s (Feng et al., 2006). Estos hallazgos sugieren que la señalización intracelular gatillada por la activación de GPR40 es altamente compleja [Figura 3-4]. Sin embargo, la vía de señalización PLC/IP3/DAG ha sido tradicionalmente utilizada para evaluar la actividad de GPR40. Por ejemplo, experimentos realizados en células madre de rata transfectadas con el gen de GPR40 mostraron que la vía de señalización PLC/IP3 es gatillada por DHA (1-10 μM), estimulando la movilización de calcio intracelular (Ma et al., 2010) (Figura 3). La reproducibilidad de las fluctuaciones en las concentraciones de calcio intracelular gatillada por la activación del GPR40 ha permitido el cálculo del EC₅₀ de DHA en GPR40 expresados en diversos sistemas. Estos estudios han revelado que el EC₅₀ para el GPR40 de diversas especies (humano, ratón, rata) expresado en líneas celulares se encuentra en el rango micromolar bajo, fluctuando entre concentraciones de 1 a 15 μM (Itoh et al., 2003).

La expresión de GPR40 es extensa y se ha detectado en células pancreáticas, papilas gustativas y cerebro, entre otros (Briscoe et al., 2003). En el cerebro, GPR40 se expresa principalmente en neuronas de la corteza cerebral, hipotálamo, médula espinal, entre otras muchas áreas (Nakamoto et al., 2012; Alavi et al., 2018) (Figura 5). De manera interesante, las evidencias experimentales sugieren que GPR40 participa mediando la acción de DHA en diferentes procesos fisiológicos a nivel del sistema nervioso central (Alavi et al., 2018). Por ejemplo, la inyección i.c.v. de DHA a ratones, estimuló la secreción de β-endorfinas, induciendo anti-nocicepción. Estas evidencias sugieren que la activación de GPR40 por DHA estimularía la liberación de β-endorfinas, contribuyendo al control nociceptivo (Nakamoto et al., 2012). Por otra parte, diversos estudios muestran que la señalización de GPR40 en el hipocampo contribuye a la regulación de la depresión relacionada al comportamiento (Nishinaka et al., 2014).

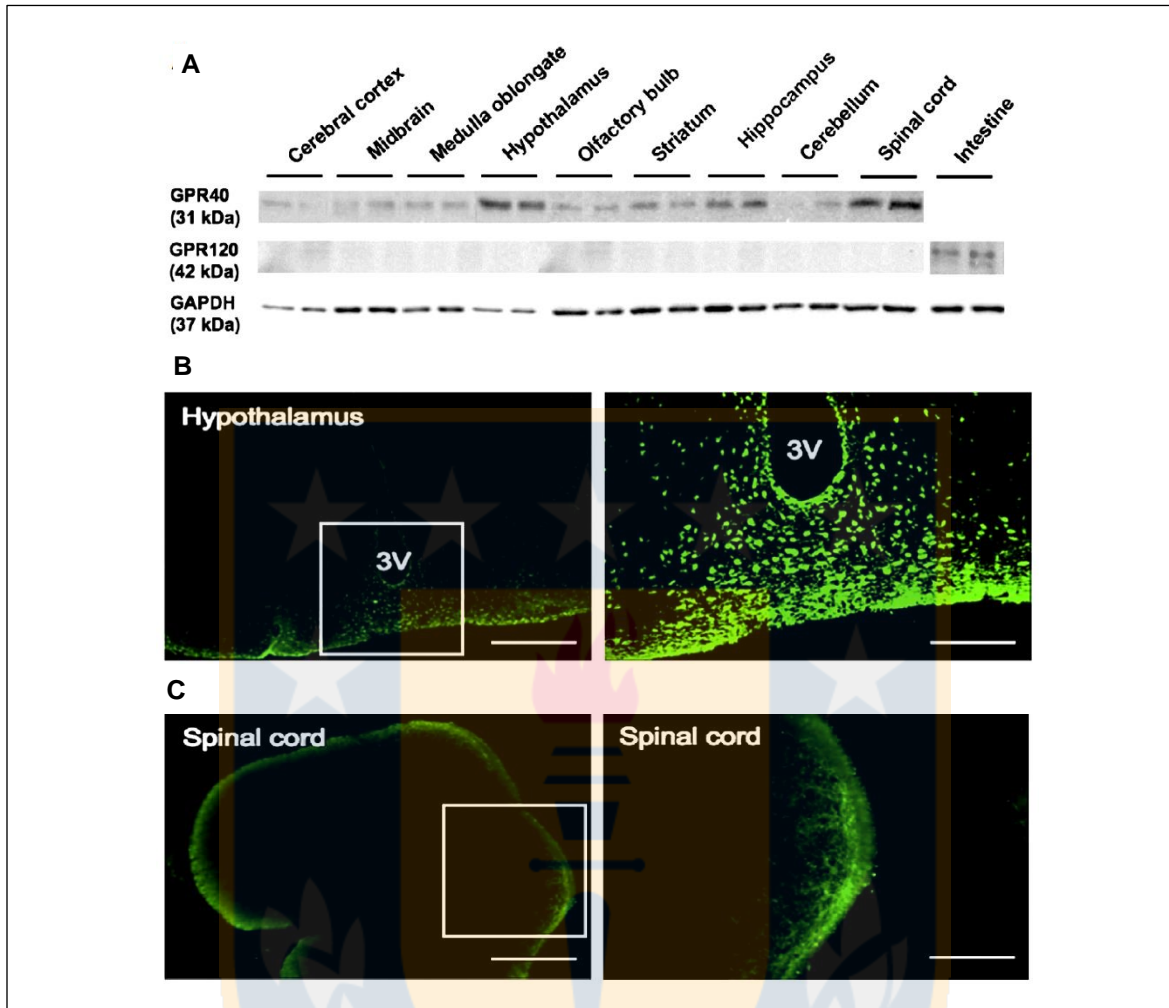
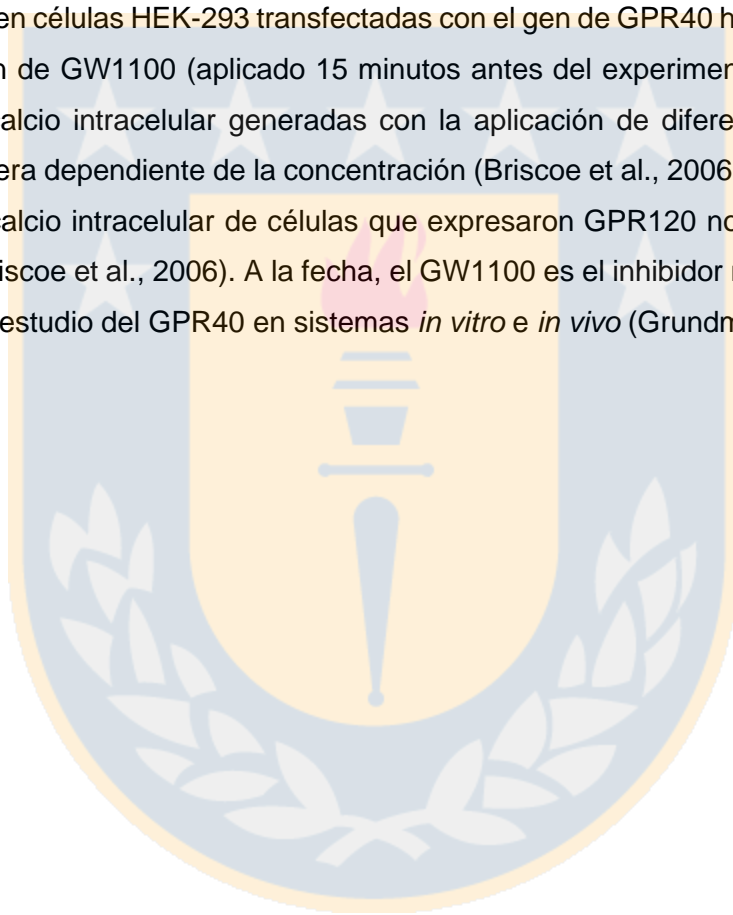


Figura 5. Expresión de GPR40/FFAR1 en el SNC. (A) Expresión de GPR40/FFAR1 y GPR120/FFAR4 en tejido de cerebro, medula espinal e intestino de ratón ddY macho. Se utilizó como control interno GAPDH. (B) imágenes de inmunofluorescencia a un corte coronal de cerebro de ratón, donde se observa la expresión de la proteína GPR40 (en verde) en el núcleo arcuato, correspondiente al hipotálamo. (C) Esta inmunofluorescencia marca la expresión de la proteína GPR40 (en verde) en la medula espinal. Escala = 50 μ m. Extraído de Nakamoto et al., 2012.

Otras líneas de investigación han sugerido que la expresión de GPR40 estaría relacionada a efectos neurotróficos. Por ejemplo, una concentración de 1.5 μ M de DHA fue capaz de promover el crecimiento neurítico de células madre de rata transfectadas con el gen GPR40 (Ma et al., 2010). A su vez, estudios en células hipotalámicas mostraron que una mayor supervivencia celular correlacionaba con la expresión de GPR40 (Engel et al., 2020). A pesar de estas evidencias, no es claro si el GPR40 es necesario y suficiente para explicar

los efectos benéficos del DHA en la supervivencia celular, sinaptogénesis y desarrollo neuronal.

De modo interesante, el progreso farmacológico con foco en el GPR40 ha permitido la generación de agonistas y antagonistas específicos (Grundmann et al., 2021). La molécula GW1100 (ethyl 4-[5-{{2-(ethyloxy)-5-pyrimidinyl}methyl}-2-{{(4-fluorophenyl)methyl}thio}-4-oxo-1(4H) pyrimidinyl] benzoate) fue el primer antagonista específico de GPR40 caracterizado y posee la capacidad de inhibir la actividad agonista de GW9508 (agonista sintético de GPR40) y del ácido linoleico (Briscoe et al., 2006; Hara, 2016). Estudios en células HEK-293 transfectadas con el gen de GPR40 humano mostraron que la aplicación de GW1100 (aplicado 15 minutos antes del experimento) disminuyó las respuestas de calcio intracelular generadas con la aplicación de diferentes ligandos del GPR40, de manera dependiente de la concentración (Briscoe et al., 2006). Por el contrario, las señales de calcio intracelular de células que expresaron GPR120 no fueron alteradas por GW1100 (Briscoe et al., 2006). A la fecha, el GW1100 es el inhibidor más comúnmente utilizado para el estudio del GPR40 en sistemas *in vitro* e *in vivo* (Grundmann et al., 2021).



6. Hipótesis y Objetivos

6.1. Hipótesis

La señalización mediada por ácidos grasos ha tomado gran relevancia en las últimas décadas. En este contexto, el ácido docosahexaenoico (DHA) ha reunido especial interés debido a sus propiedades benéficas para el funcionamiento del SNC. Diversos estudios han demostrado que el DHA favorece la expresión de marcadores de crecimiento axonal y de proteínas sinápticas, y, además, estimula el crecimiento de ramificaciones neuríticas. Por el contrario, niveles disminuidos de DHA se han asociado a alteraciones en la neurogénesis y en el crecimiento neurítico. Evidencia experimental reciente ha propuesto que la activación del receptor GPR40 por DHA sería un mecanismo clave para sus efectos benéficos en el SNC. Sin embargo, aún no es claro si la actividad neurotrófica de DHA requiere de la activación del GPR40. A partir de esta interrogante general, planteamos la siguiente hipótesis:

“La activación del receptor GPR40 es necesaria para los efectos benéficos del DHA en procesos de supervivencia, de crecimiento neurítico y de sinaptogénesis de células neuronales en cultivo in vitro”.

6.2. Objetivo general

“Estudiar la relevancia de la activación del receptor GPR40 en los efectos tróficos de DHA en procesos de supervivencia, de crecimiento neurítico y de sinaptogénesis en cultivos primarios de neuronas corticales y en células N2A”.

6.3. Objetivos específicos

6.3.1. Supervivencia

Determinar los efectos de diferentes concentraciones de DHA en la supervivencia de células N2A en cultivo *in vitro*, en presencia y en ausencia de GW1100, mediante mediciones en tiempo real con el equipo IncuCyte S3.

6.3.2. Crecimiento neurítico

Determinar los efectos de diferentes concentraciones de DHA en el crecimiento neurítico y la arborización neuronal de neuronas corticales en cultivo, en presencia y en ausencia de GW1100, mediante la utilización de inmunocitoquímica, microscopía confocal y análisis de Sholl.

6.3.2. Sinaptogénesis

Determinar los efectos de diferentes concentraciones de DHA en la expresión de la proteína sináptica SV2 en neuronas corticales en cultivo, en presencia y en ausencia de GW1100, mediante la utilización de inmunocitoquímica, microscopía de super resolución y análisis cuantitativos de intensidad de fluorescencia.



7. Metodología

7.1. Cultivos celulares

Los cultivos celulares utilizados, se mantuvieron bajo incubación termo-regulada a 37° C, 5% de CO₂ y 95 % de humedad. Los recuentos de células y estimación de la viabilidad se realizaron a partir del método de exclusión, utilizando azul de tripán al 0,2%.

7.1.1. Cultivos primarios de neuronas corticales

Las células obtenidas desde cortezas de embriones de ratón C57BL/6 (E18.5) se sembraron en placas de 12 pocillos, pre-tratadas con poli-lisina a una densidad de 320.000 células/mL. Los cultivos se mantuvieron en medio esencial mínimo (MEM), suplementado con suero de caballo (10%), DNasa (4 µg/mL) y L-Glutamina (2mM) durante las primeras 24 hrs. Transcurrido este tiempo, se cambió por un medio de alimentación, que contiene MEM, suplementado con suero de caballo (2%), suero fetal bovino (2%) y N3 (0,5%). N3 es un suplemento que contiene BSA (1 mg/mL), putrescina (4mg/mL), insulina (1,25 mg/mL), selenito de sodio (1 µg/mL), TH3 (2 µg/mL), progesterona (1,25 µg/mL) y corticosterona (4 µg/mL) (Nakamichi et al., 2019). Las neuronas se utilizaron luego de 9 días de incubación *in vitro* (DIV). Al noveno DIV, se les aplicaron diferentes tratamientos (DHA, GW1100, control y vehículos respectivos) por 24 hrs. Al día número 10 de incubación, las neuronas corticales fueron utilizadas para los ensayos inmunocitoquímicos (Sáez-Orellana et al., 2018).

7.1.2. Cultivo de células N2a

La línea celular N2a proviene de neuroblastoma cerebral de ratón. Estas células se caracterizan por su morfología ameboide y crecimiento adherente. Las células de Neuroblastoma de ratón, N2a (CCL-131) se obtuvieron de American Type Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) y fueron cultivadas en placas de Petri de 10 cm de diámetro con 10 ml de medio de cultivo y con cambios de medio cada 2 días. El medio de cultivo utilizado fue, medio Eagle modificado de Bulbecco (DMEM), suplementado con mezcla de nutrientes F12 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU), suero fetal bovino al 5 % (FBS), penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, glutamina 2 mM y fungizona 2,5 µg/ml (GIBCO) (Salazar et al., 2016). Las células en cultivo fueron expandidas en proporción 1:10, al alcanzar el 85 % de confluencia. Posteriormente, se realizó el recuento de células. En los experimentos en IncuCyte, las células fueron sembradas mediante pipeteo reverso, en

placa de 96 pocillos (Corning) a diferentes densidades (2000- 4000-10.000-20.000 células por pocillo) con 100 μ L de medio por pocillo. Los experimentos fueron realizados 24 y 48 hrs, posteriores a la siembra. Los cultivos de células N2a fueron utilizadas para ensayos de muerte celular en tiempo real utilizando el sistema IncuCyte.

7.2. Tratamientos

7.2.1. Incubación de neuronas corticales con DHA e inhibidor del receptor de ácidos grasos GPR40, GW1100

Para evaluar los efectos de DHA (ácido docosahexaenoico, Cayman Chemical Company, East Ellsworth RD, Michigan, USA) sobre el desarrollo neurítico e inmunoreactividad de la proteína 2 de vesícula sináptica, SV2, y las implicancias del receptor de ácidos grasos (GPR40) en cultivos primarios de neuronas corticales, se aplicaron diferentes concentraciones de DHA en presencia o ausencia de 10 μ M de GW1100 (Cayman Chemical Company, East Ellsworth RD, Michigan, USA) (Engel et al., 2020, Grundmann et al., 2021). Las concentraciones de DHA (en μ M) utilizadas fueron los siguientes: 0.5, 5, 25, 50 y 100. El inhibidor GW1100 fue co-aplicado con diferentes concentraciones de DHA. En todos los experimentos se utilizó como vehículo para DHA, etanol 100% y DMSO como vehículo para GW1100. Se utilizaron cultivos sin tratamiento, como control negativo. Los tratamientos fueron aplicados al día 9 de cultivo, posterior a ello, los cultivos corticales se incubaron durante 24 hrs, y se evaluaron al día siguiente (i.e. 10 DIV). Cada uno de los tratamientos aplicados a las células, fue calculado en base al volumen por pocillo, que, en este caso, corresponde a 1000 μ L, para una placa de 12 pocillos. Las condiciones fueron realizadas en duplicado. Finalmente, las neuronas corticales pretratadas por 24 hrs, fueron utilizadas para la realización de inmunocitoquímicas al día 10 (DIV).

7.2.2. Incubación de células N2a con DHA e inhibidor GW1100:

Para evaluar los efectos de DHA (ácido docosahexaenoico, Cayman Chemical Company, East Ellsworth RD, Michigan, USA) en sobrevivencia celular y las implicancias del receptor de ácidos grasos (GPR40) en tales efectos, se aplicaron diferentes concentraciones de DHA en presencia o en ausencia de 10 μ M de GW1100 (Cayman Chemical Company, East Ellsworth RD, Michigan, USA) a cultivos de células N2a. Para ello, generamos un “*plate map*” de trabajo, constituido por 13 condiciones diferentes, distribuidas en una placa de 96 pocillos (Corning, USA). Las concentraciones de DHA (en μ M) utilizadas fueron los

siguientes: 0.5, 5, 25, 50 y 100. Para todas las concentraciones de DHA utilizadas, se realizaron experimentos en presencia de 10 μ M de GW1100 (Engel et al., 2020). Como control positivo de muerte celular, se utilizó el Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) a una concentración de 10 ng/ml. Como control negativo de muerte celular se utilizó el cultivo indemne y la incubación con los respectivos vehículos: etanol 100% para DHA, DMSO en el caso de GW1100 y PBS estéril para TNF- α . Los tratamientos fueron aplicados 24 hrs-48 hrs, posteriores a la siembra. Cada uno de los tratamientos aplicados a las células, fue calculado en base al volumen por pocillo, que, en este caso, correspondió a 100 μ L, para una placa de 96 pocillos. Las condiciones fueron realizadas en duplicado, triplicado y quintuplicado, por cada experimento realizado de manera independiente. Finalmente, las células tratadas fueron analizadas en tiempo real en el sistema IncuCyte por 36 a 48 hrs.

7.3. Inmunocitoquímica.

Luego de los tratamientos descritos en las secciones anteriores, las neuronas corticales fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 15 min, a temperatura ambiente. La permeabilización y bloqueo se realizó de manera simultánea con una solución de suero de caballo al 10% en PBS y Tritón X-100 al 0.1%, durante 15 min. Se utilizaron los anticuerpos primarios anti-SV2 (1:200, mouse, Hybridoma Bank), y anti-MAP2 (1:200, rabbit, Synaptic Systems), los cuales se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Como anticuerpos secundarios se utilizaron asociados a fluoróforos: AlexaFluor 488 (1:200, anti-mouse, Jackson Inmuno Research), Cy3 (1:200, anti-rabbit, Jackson Inmuno Research), por 1 h a temperatura ambiente. El montaje de las muestras se realizó con un medio de montaje fluorescente Dako (DAKO, Agilent, USA). Las imágenes fueron obtenidas desde un microscopio confocal de alta resolución espacio-temporal SP8 LIGHTNING, LEICA, perteneciente al Centro de Microscopía Avanzada (CMA BIO BIO). Las imágenes fueron captadas en 3 canales (rojo, verde y azul). Las imágenes obtenidas se analizaron con el software FIJI de ImageJ (FIJI, an open-source platform for biological-image análisis. National Institutes of Health, United States government organization). En total se evaluaron 15-20 neuronas por condición.

7.4. Análisis y cuantificación de células en tiempo real mediante IncuCyte:

7.4.1. Ensayo de muerte celular:

La muerte celular en tiempo real fue determinada mediante IncuCyte S3 Live-Cell imaging (Essen BioScience, Ann Arbor, MI) perteneciente al Centro de Microscopia avanzada (CMA BIO BIO). Para ello, se realizó la siembra a diferentes densidades de células N2a (2000- 4000-10.000-20.000 células por pocillo), en placas estériles de 96 pocillos (Corning), con 100 μ L de medio por pocillo. Los experimentos fueron realizados 24 y 48 hrs, posteriores a la siembra. Para aplicar los tratamientos, se aspiró el medio de cultivo de cada pocillo, en orden y de manera cuidadosa. Posteriormente, se aplicaron 100 μ L medio con los tratamientos respectivos y luego se agregó a cada pocillo 30 nM de Sytox Green (Molecular Probes #S7020). Finalmente, las placas tratadas fueron colocadas en IncuCyte, por un tiempo de 36 - 48 hrs. Las células muertas, identificadas por la fluorescencia intracelular de Sytox Green, fueron contadas automáticamente cada 1 hr de incubación mediante el software para análisis v2019B, el cual se basa en filtros específicos de: tamaño, excentricidad e intensidad de fluorescencia (Jara et al., 2021). Los resultados fueron expresados en porcentaje de muerte celular, para su análisis posterior. La metodología utilizada se resume en la Figura 6.

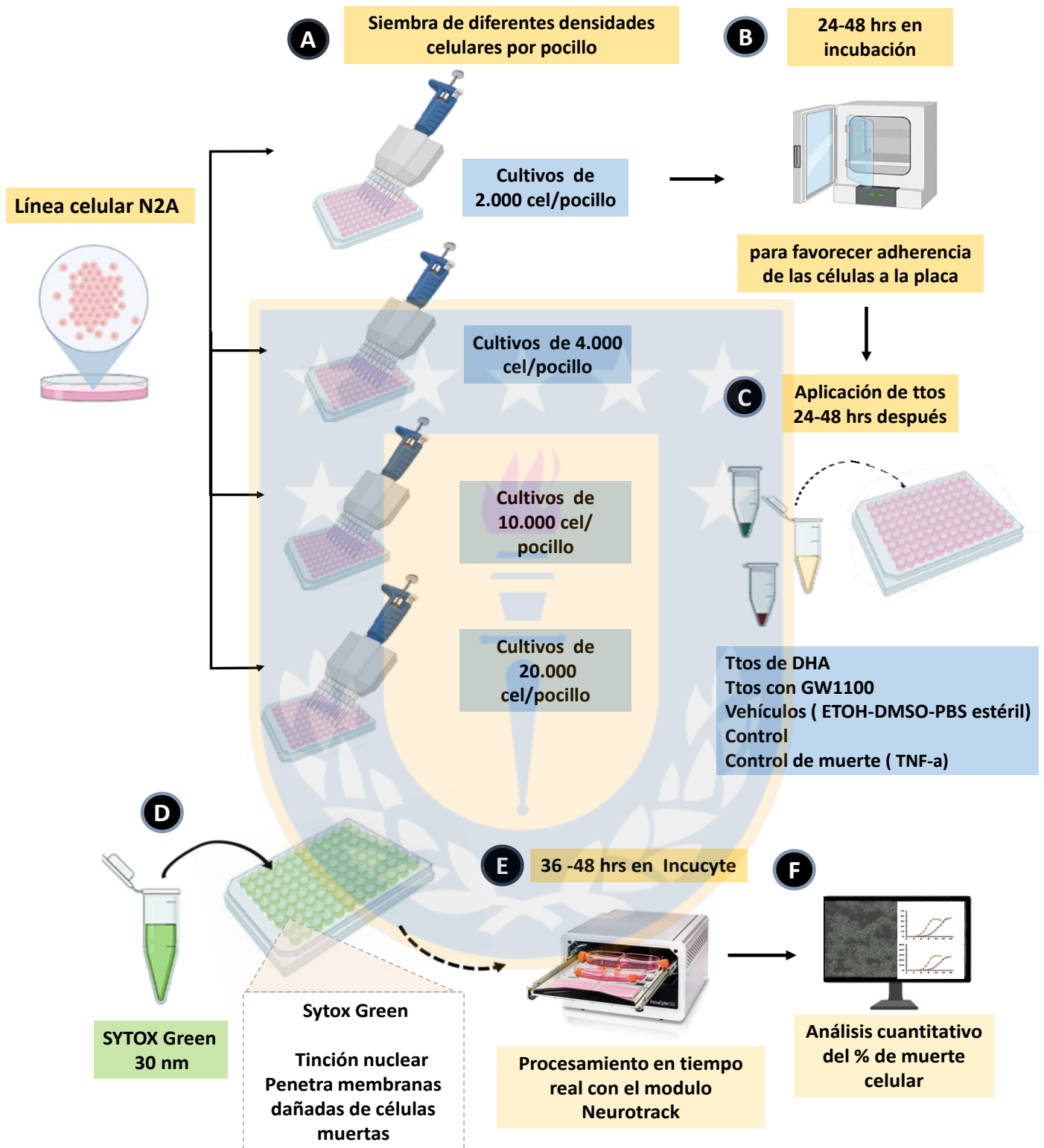


Figura 6. Metodología de ensayo de muerte mediante IncuCyte en células N2a.

7.4.2. Análisis de Sholl:

Para analizar la morfología y arborización neuronal, se analizaron imágenes desde microscopía confocal de neuronas corticales de 10 DIV, previamente incubadas con diferentes concentraciones de DHA, inhibidor de GPR40 (GW1100) y vehículos respectivos (etanol 100% para DHA y DMSO para GW1100). De igual forma, se utilizaron cultivos de neuronas corticales no tratadas como control. Posteriormente, se realizó la cuantificación por neurona, del número de intersecciones que se generan en numerosos radios circunferenciales de 10 μM , según lo descrito por Sholl, D. (Sholl, 1953). Se evaluaron 15 neuronas por condición.

7.4.2. Cuantificación de los niveles de proteína 2 de vesícula sináptica (SV2) en neuronas corticales de ratón:

Este análisis fue realizado de forma independiente a nivel de los procesos neuronales y el soma. En ambos casos se realizó a través del análisis *off-line* de las imágenes de inmunocitoquímica obtenidas mediante microscopía confocal (Aumentos en 40x con un zoom de 1.85), usando el programa FIJI de ImageJ (FIJI, an open-source platform for biological-image análisis. National Institutes of Health, United States government organization). Para el análisis de los procesos, se eligió un Z representativo de cada imagen, la cual se deconvolucionó para el análisis del canal correspondiente a SV2 (verde). A partir, del plano elegido se analizaron áreas o regiones de interés (ROIs) en los procesos primarios de neuronas (Figura 7). Se evaluaron 2 procesos primarios por neurona seleccionada para medir y cuantificar.

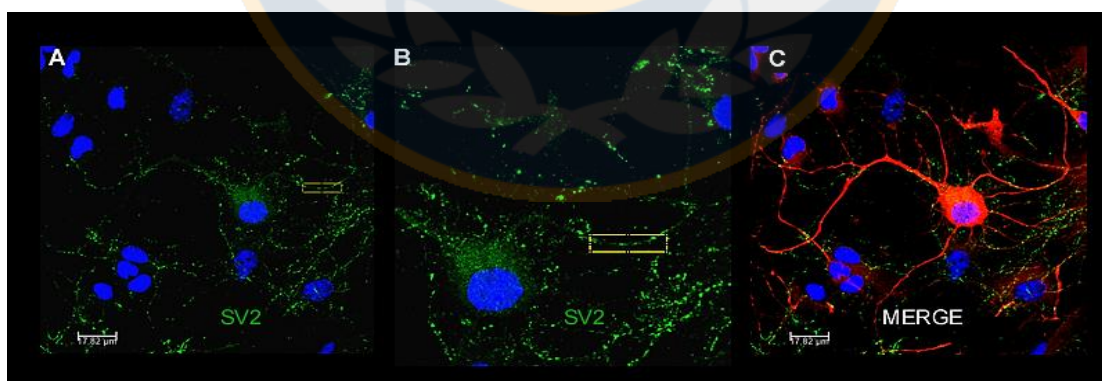


Figura 7. ROI de un área estándar de un proceso neuronal seleccionado para cuantificación. (A) Neurona seleccionada para realizar la cuantificación de SV2. **(B)** ROI de un área estándar, seleccionada a partir de un proceso primario neuronal. Posteriormente el área fue cuantificada y el promedio obtenido por cada proceso neuronal fue analizado y graficado. **(C)** Superposición de los canales para la fluorescencia de SV2/MAP2/DAPI de la neurona seleccionada para cuantificación. Barra de tamaño: A-C: 17,5 μM

Para la cuantificación a nivel del soma se seleccionó la imagen con el canal de interés (SV2- verde) y luego se realizó apilamiento de las imágenes en el plano Z, con la finalidad de obtener una imagen constituida por todos los planos originales. Posteriormente, se construyó un área o región de interés (ROI) que abarca el área del soma. Este ROI se generó a partir de la diferencia de 2 ROIs (Figura 8). El primer ROI se generó a mano alzada delimitando la periferia o contorno celular. El segundo ROI, fue generado de forma circular sobre el primer ROI, para limitar el soma. Posteriormente se calculó la diferencia entre el primer y el segundo ROI, con la finalidad de eliminar señales de canales que produzcan interferencia que provienen del fondo de la imagen y que no son parte del área de interés para la cuantificación final. Los resultados fueron normalizados, para posteriormente ser graficados.

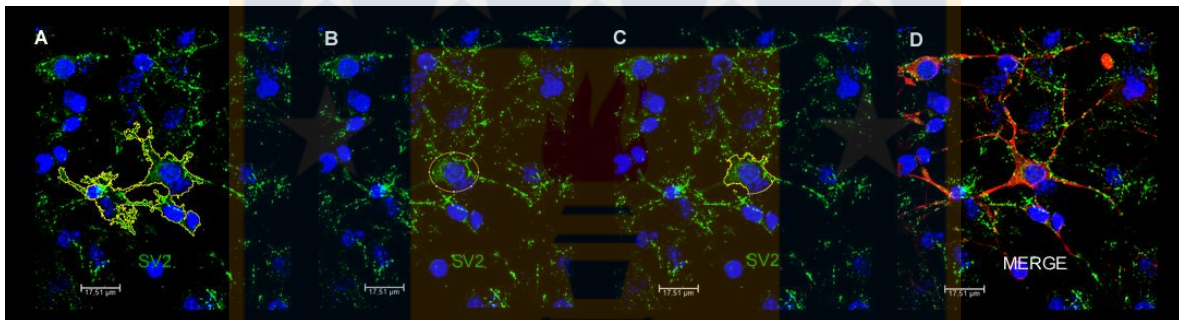


Figura 8. ROI del área del soma neuronal seleccionado para cuantificación. (A) ROI 1 generado a mano alzada y que cubre la periferia del soma. **(B)** ROI 2 generado de forma circular y que delimita el área del soma con el de las neuritas. **(C)** ROI 3 producto de las diferencias de los 2 ROIs trazados anteriormente. A partir del área del ROI 3, el área fue cuantificada y el promedio obtenido fue analizado y graficado. Barra de tamaño: A-C: 17,5 μ M.

7.5. Toma y procesamiento de imágenes

Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal de súper resolución espacio-temporal SP8 LIGHTNING, LEICA, perteneciente al Centro de Microscopía Avanzada (CMA BIO BIO). Este equipo, posee un escáner resonante de 8 kHz, que permite adquisición de hasta 30 fps a 512x512, una resolución hasta 130 nm laterales. A su vez, este microscopio se encuentra equipado con 4 líneas de láser (405, 488, 561 y 633 nm) y 4 detectores espectrales, 3 de los cuales son detectores híbridos (HyD) de alta sensibilidad y el restante es un PMT para aplicaciones tradicionales. También, posee diversos lentes objetivos de 10 a 63x de aumento. Las imágenes fueran tomadas en 3 canales: verde - correspondiente a SV2, rojo - correspondiente a MAP2, azul - DAPI. (4',6-diamidino-2-

fenilindol), con un aumento de 40x, zoom de 1.85, exposición de 512 segundos y generadas en 1064 x1064 de tamaño, a 32 bits. A partir de estas, se pudieron procesar y desarrollar diferentes modelos 3D y proyecciones de canal (específicamente de SV2). El procesamiento de las imágenes de microscopía confocal y proyección 3D se realizó mediante el programa Leica Application Suite X (LAS X) (Leica Microsystems, GmbH, Alemania). En la proyección de neuronas 3D se agregó un cuarto canal mediante el software Imaris (Bitplane). Las imágenes de fluorescencia y contraste de fase obtenidas desde el sistema IncuCyte se obtuvieron mediante el programa neurotrack y fueron procesadas con el software v2019B. Adicionalmente, se aplicó la función “*cell by mask*” para observar la presencia o ausencia de procesos celulares delimitando los márgenes de cada célula en color rojo.

7.6. Estadística

Para los análisis de cuantificación de SV2 en soma y procesos neuronales se utilizaron un total de 15-20 neuronas por condición, desde 3 experimentos independientes realizados en duplicado. Estos resultados fueron graficados como promedio \pm error estándar y expresados como porcentaje con respecto al control sin tratamiento. El análisis estadístico se efectuó mediante ANOVA de una vía y se consideraron valores estadísticamente significativos: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ y $****p < 0.0001$ versus control. Para los análisis de Sholl se evaluaron 15 neuronas por condición y cada uno de los resultados corresponden al promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes, realizados en duplicado. El análisis estadístico *post-hoc* fue realizado utilizando la prueba de Bonferroni $*** p < 0.001$. Para los análisis de muerte celular mediante el sistema IncuCyte, los resultados fueron expresados en porcentaje y se graficaron a partir del promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes, realizados en duplicado, triplicado y quintuplicado, por cada condición. El análisis estadístico *post-hoc* fue realizado utilizando la prueba de Bonferroni $*** p < 0.001$. Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad Prism, CA, USA).

8. Resultados

8.1. Acciones del DHA en la supervivencia en células N2A en presencia y en ausencia del inhibidor del GPR40, GW1100.

La muerte celular en tiempo real fue determinada mediante IncuCyte S3 Live-Cell imaging (Essen BioScience, Ann Arbor, MI) inmediatamente después de haber aplicado los tratamientos respectivos a cada pocillo. Los tratamientos fueron: DHA (0,5 μ M, 5 μ M, 25 μ M), DHA con el inhibidor de GRP40, GW1100 (0,5 μ M DHA + 10 μ M GW1100, 5 μ M DHA + 10 μ M GW1100, 25 μ M DHA + 10 μ M GW1100, y 10 μ M GW1100). Se realizaron además controles con los respectivos vehículos. (Etanol 100% para DHA, DMSO para GW1100 y PBS estéril para TNF- α). De igual forma, comparamos los efectos de DHA con cultivos tratados con TNF- α (control positivo de muerte celular) y con cultivos no tratados (control). La señal fluorescente intracelular de Sytox Green permitió identificar las células muertas automáticamente, en periodos de 1 hora según filtros específicos tamaño, excentricidad e intensidad de fluorescencia (Jara et al., 2021).

La estandarización de nuestro modelo de trabajo comenzó con mediciones de muerte de células N2A a densidades de 2.000 y 4.000 células por pocillo. Las células fueron incubadas con diferentes tratamientos 24 hrs después de realizar la siembra. Las primeras mediciones de muerte celular se realizaron durante 48 horas consecutivas. En ambas densidades de células, observamos un menor porcentaje de muerte celular en los pocillos tratados con DHA. En el cultivo con una densidad de 4.000 células por pocillo, observamos una disminución significativa de la muerte celular en los tratamientos de 0.5 μ M (43.7 \pm 2.8%), 5 μ M (54.7 \pm 5.0%) y 25 μ M (65.5 \pm 1.2%), respecto del control (100 \pm 4.4%) (Figura 9-A). En el caso de los cultivos con una densidad de 2.000 células por pocillo, la tendencia de disminución de la muerte celular se repitió de manera similar (Figura 9-B). Por otra parte, el tratamiento con GW1100, en ausencia de DHA aplicado exógenamente, generó resultados dispares en la muerte celular (2.000 células por pocillo; 127.3 \pm 7.6% - 4.000 células por pocillo; 86.0 \pm 4.3%).

Sin embargo, en este set de experimentos observamos un alto porcentaje de muerte celular en los controles negativos (2.000 células por pocillo: 43.74 \pm 2.8% - 4.000 células por pocillo: 80.81 \pm 3.5%) (datos no mostrados). A partir de estos resultados, concluimos que nuestros tratamientos tienen efectos interesantes sobre la viabilidad de células N2A,

pero que, se requieren modificaciones metodológicas que logren disminuir la muerte celular basal de las células para lograr un mejor rango dinámico de medición. A consecuencia de esta situación, se aumentó la densidad celular de los cultivos a 10.000 y 20.000 células por pocillo y se incrementó el tiempo de incubación de las células luego del pasaje respectivo a 48 horas. Además, incorporamos tratamientos de TNF- α (10 ng/ml) como un control positivo de muerte celular y disminuimos el tiempo de los ensayos en el sistema IncuCyte a 36 horas. Como consecuencia de estas modificaciones, observamos que una densidad celular de 20.000 células por pocillo mejoró significativamente la viabilidad de las células en condiciones basales, lo que logró optimizar nuestros análisis posteriores con diferentes tratamientos.

Los resultados utilizando células N2A a una densidad de 20.000 células por pocillo mostraron que la condición basal solo presentó variaciones significativas de la viabilidad durante las primeras 14 horas (0 h: $4.2 \pm 0.8\%$; 6 h: $7.6 \pm 1.1\%$; 10h: $13.7 \pm 1.4\%$; 14h: $18.6 \pm 1.7\%$) (Figura 10-B). Posterior a las 14 horas no se presentaron diferencias significativas, por lo que el porcentaje de muerte celular hacia el final de 36 horas de medición se mantuvo estable (15h: $19.1 \pm 1.8\%$; 24h: $20.3 \pm 2.4\%$; 36h: $25.0 \pm 2.8\%$) (Figura 10-B). En el caso de las células incubadas con TNF- α , observamos un alto porcentaje de muerte celular el cual alcanzó un $50.1 \pm 3.3\%$ a las 10 horas post incubación, manteniéndose hasta el término del análisis en tiempo real (Figura 10 A-B). De este modo, estos análisis mostraron que se logró ajustar una ventana temporal de muerte celular estable, lo que permitió ajustar un control de muerte celular eficiente.

En esta ventana temporal de 36 hrs, evaluamos los efectos de diferentes concentraciones de DHA en la sobrevida de células N2A. Concentraciones de 0.5 μM de DHA ($48.7 \pm 1.1\%$), 5 μM de DHA ($52.6 \pm 1.3\%$) y 25 μM de DHA ($51.4 \pm 1.5\%$) disminuyeron significativamente el porcentaje de muerte celular respecto del control ($100 \pm 6.3\%$) (Figura 10 A-C). No se detectaron diferencias significativas en el efecto de las tres concentraciones de DHA mencionadas sobre la muerte celular, al compararlas entre si (Figura 10 A-C). La evaluación de los efectos de DHA en presencia de GW1100 mostró que la inhibición del GPR40 aumentó la muerte celular (DHA 0.5 μM + GW1100: $179.9 \pm 12\%$; DHA 5 μM +GW1100: $112.7 \pm 6.3\%$), en comparación a sus respectivos controles (Figura 10 A-C). La sobrevida de células incubadas con 25 μM de DHA y GW1100 ($77.6 \pm 2.4\%$), a pesar de aumentar el porcentaje de muerte celular, no fue estadísticamente significativa en comparación de su condición control (Figura 10-C). De manera muy interesante, el

tratamiento de las células con GW1100, en ausencia de DHA exógeno, mostró un efecto importante sobre la viabilidad, induciendo de manera significativa la muerte celular (Figura 10 A-B-C).

De este modo, nuestros resultados indican que DHA promueve la supervivencia en células N2A, al menos en parte, a través de la activación del receptor GPR40. Además, observamos que la activación endógena del receptor GPR40, al menos en nuestras condiciones experimentales, poseería un rol importante en la viabilidad celular basal.

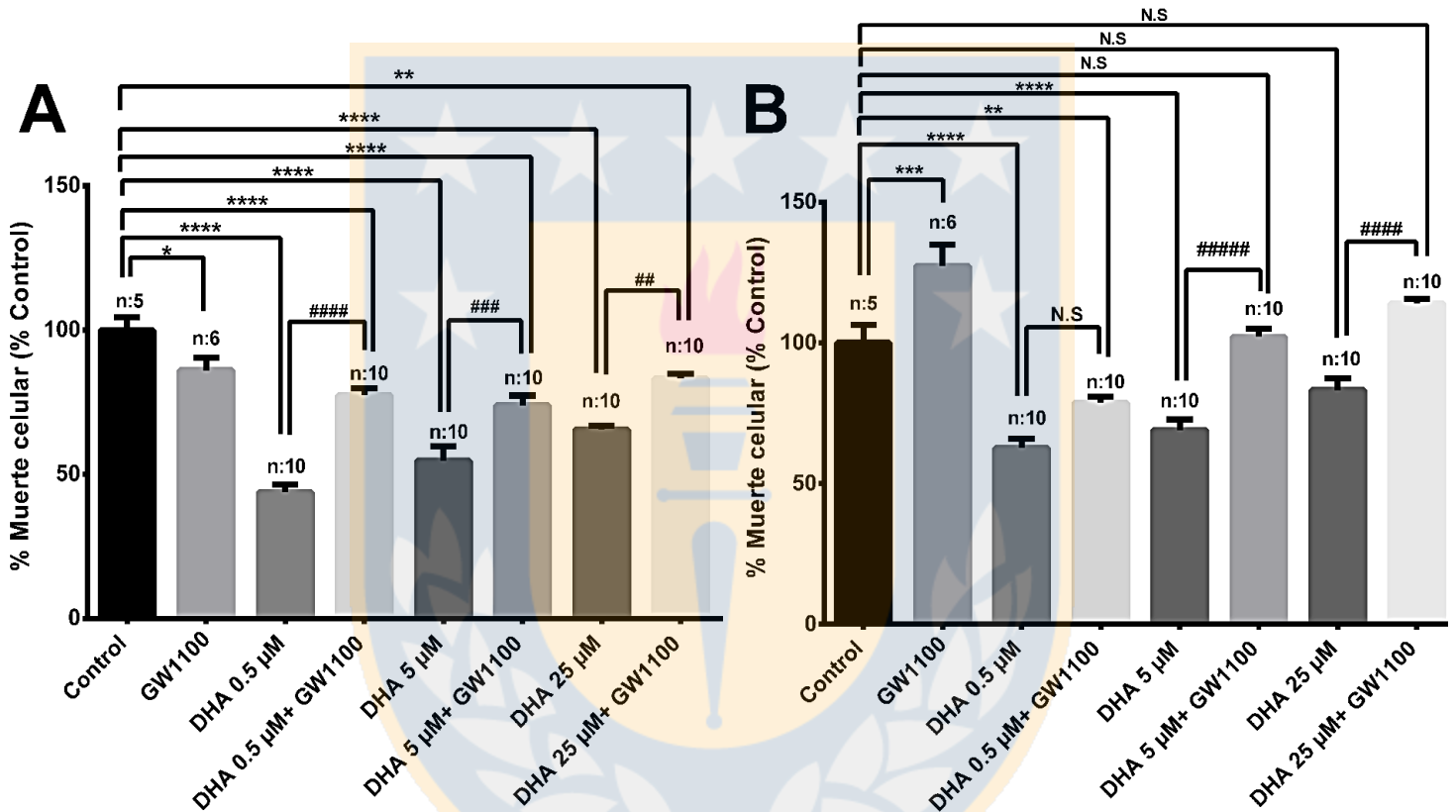


Figura 9. DHA promueve la supervivencia en células N2A a densidades de 2000 y 4000 células por pocillo. (A) % de muerte celular en cultivos de células N2A a una densidad de 4.000 células por pocillo. **(B)** % de muerte celular en cultivos de celular N2A a una densidad de 2.000 células por pocillo. **(A-B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia expresada como porcentaje de muerte en relación con el control sin tratamiento. Células N2A fueron incubadas con DHA (0.5 μM - 5 μM - 25 μM) en presencia y ausencia de GW1100 (10 μM). Los valores son expresados como porcentaje del control sin tratamiento (condición control). ANOVA de una vía ****p<0.001; *p<0.5 versus Control y ##### p<0.001; # p< 0.5 versus 0.5 μM - 5 μM - 25 μM. Los datos fueron obtenidos de 2 experimentos independientes. El número de replicas experimentales (n) corresponde al número de réplicas de las condiciones específicas en pocillos individuales.

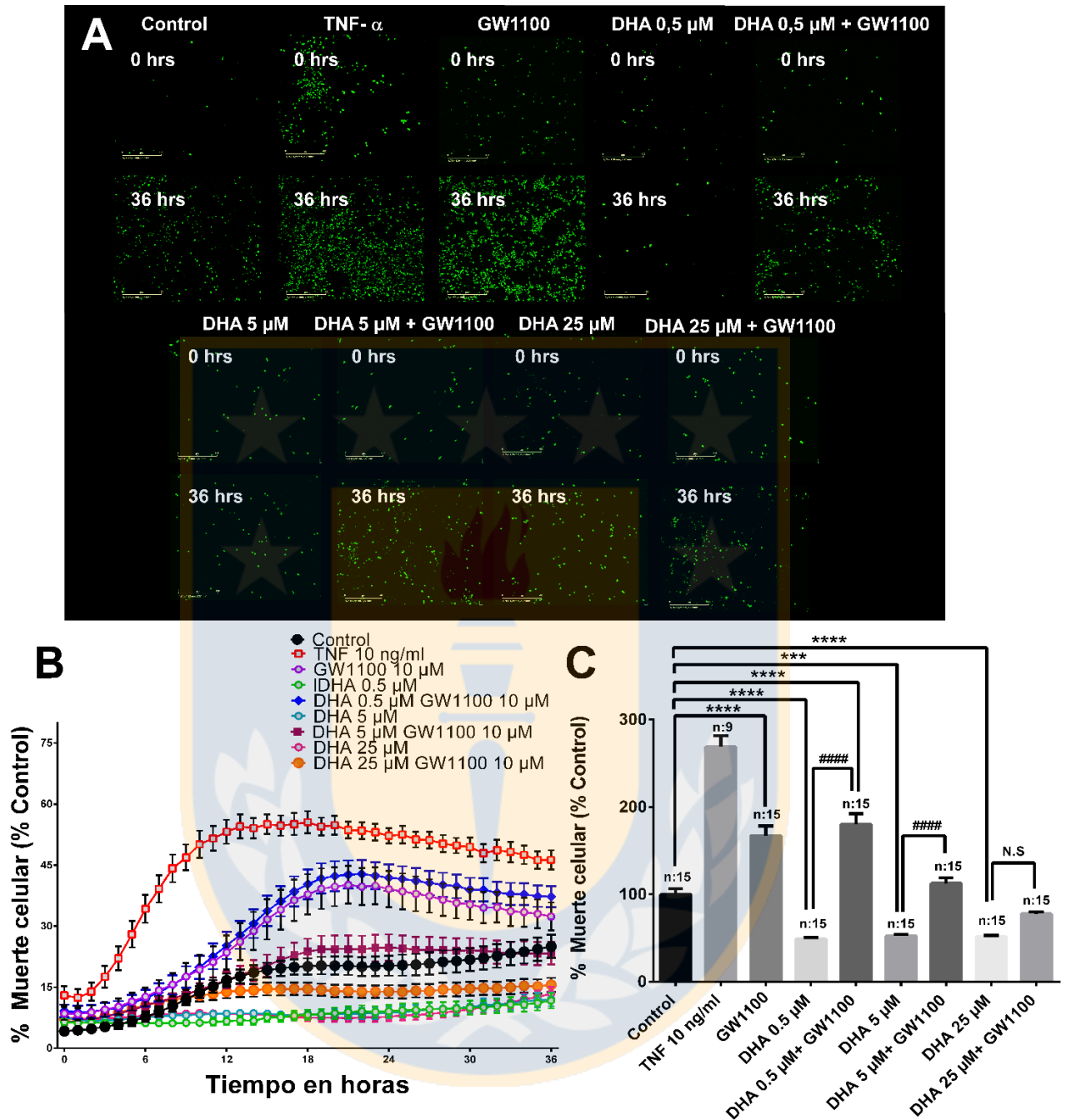


Figura 10. DHA promueve la supervivencia de células N2A a través del receptor GPR40. (A) Imágenes representativas adquiridas desde Incucyte S3 (20x) a cultivos celulares N2A, tratadas durante 36 hrs con DHA (0.5 μ M, 5 μ M, 25 μ M), en ausencia y presencia de GW1100 (10 μ M). La muerte celular fue cuantificada a través de la fluorescencia emitida por Sytox green (verde). Barra de tamaño, 400 μ M. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en tiempo real, expresada en porcentaje de muerte durante 36 horas continuas de medición. (C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en tiempo real, expresada como porcentaje de muerte en relación con el control sin

tratamiento. Los valores son expresados como porcentaje del control sin tratamiento. ANOVA de una vía **** $p < 0.001$; * $p < 0.5$ versus Control y ##### $p < 0.001$; # $p < 0.5$ versus 0.5 μM - 5 μM - 25 μM . Los datos fueron obtenidos de 3 set de experimentos independientes. El número de replicas experimentales (n) corresponde al número de réplicas de las condiciones específicas en pocillos individuales.

8.2. Efectos del DHA en el crecimiento neurítico y arborización neuronal en neuronas corticales en presencia y ausencia de GW1100.

Para estudiar crecimiento y arborización neuronal, se llevó a cabo la cuantificación del número de intersecciones de los procesos neuronales en radios circunferenciales de 10 micras de distancia entre cada uno, en base al análisis de Sholl (Figura 11-A). Los resultados mostraron diferencias significativas en el número de intersecciones desde el soma, en cultivos de neuronas corticales incubados con 25 μM de DHA, tendencia que se mantuvo durante todo el radio de estudio (10-100 micras), en comparación al control. Tratamientos de 0.5 μM y 5 μM DHA no mostraron efectos significativos (Figura 11). La mayor arborización se observó a 40 micras de distancia desde el soma, con un total de 14 procesos en neuronas tratadas con 25 μM de DHA, a diferencia de 8 procesos cuantificados en la condición control (Figura 11 A-B). De manera interesante, las neuronas corticales incubadas con 50 μM de DHA mostraron una arborización similar a las neuronas incubadas a concentraciones menores de DHA y a las neuronas control, (Figuras 11 y 12). Sin embargo, al comparar los efectos en la arborización y crecimiento neuronal de 25 μM y 50 μM de DHA a una distancia de 40 micras, se observó una arborización de 8 procesos en neuronas a 50 μM de DHA y 14 procesos en neuronas a 25 μM de DHA, lo cual sugiere que la arborización, en un segmento específico, es afectada negativamente a concentraciones de DHA mayores a 50 μM . (Figuras 11 y 12).

A su vez, realizamos un análisis estadístico del número de puntos de ramificación (PR) por condición, expresado en porcentaje en relación con el control. Las neuronas incubadas con 25 μM presentaron una mayor cantidad de PR (147.2 % \pm 3.1) en comparación con el control (100 \pm 3.49 %) (Figura 11-C). Concentraciones de DHA de 0.5 μM (98.44 % \pm 3.1), 5 μM (100.7 \pm 3.1%) y 50 μM (89.2 \pm 3.1%) no promovieron cambios significativos en el número de PR (Figura 11-C y 12 -C).

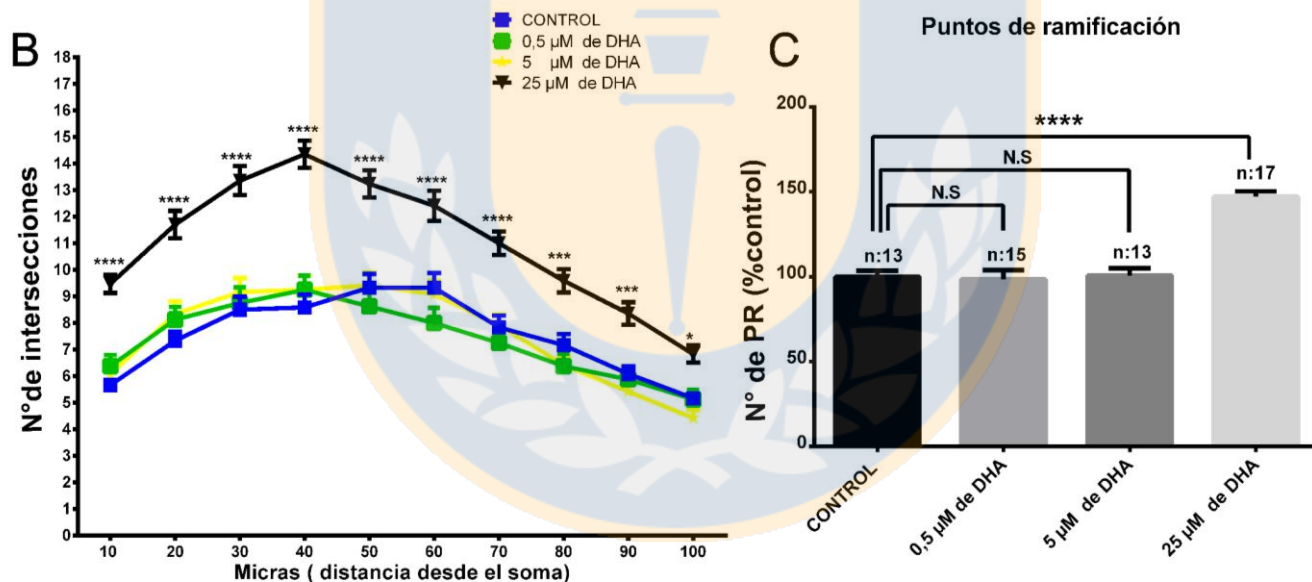
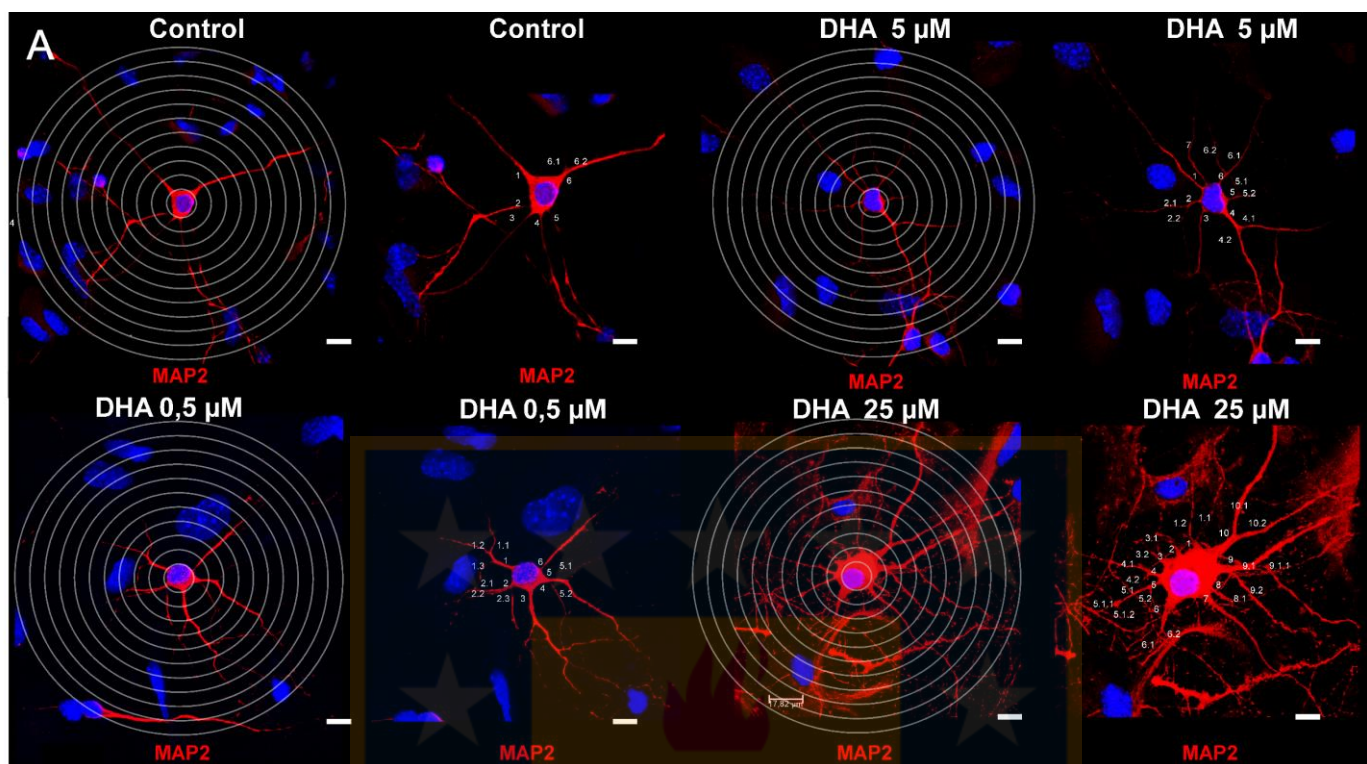


Figura 11. Cuantificación de la arborización y número de intersecciones en cultivo primario de neuronas corticales en presencia de concentraciones de DHA menores a 25 μM . (A) Esquemas de los radios circunferenciales (10 μm) aplicados de acuerdo con el método de Sholl. Barra de tamaño: 10 μm . (B) Gráfico del número de intersecciones presentes a diferentes radios circunferenciales en neuronas corticales incubadas con 0.5 μM (cuadrados verdes), 5 μM (estrellas amarillas), 25 μM (triángulos invertidos negros) y control (cuadrados azules). Los resultados corresponden al promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes, con un total de 13-17 neuronas analizadas por condición. El análisis estadístico fue realizado utilizando la prueba

de Bonferroni *** $p < 0,001$. **(C)** El gráfico representa el número total de puntos de ramificación (PR) en neuronas corticales de ratón, bajo las mismas condiciones que en **(A)**, expresado en porcentaje en relación con el control. ANOVA de una vía **** $p < 0,001$; * $p < 0,5$ versus Control.

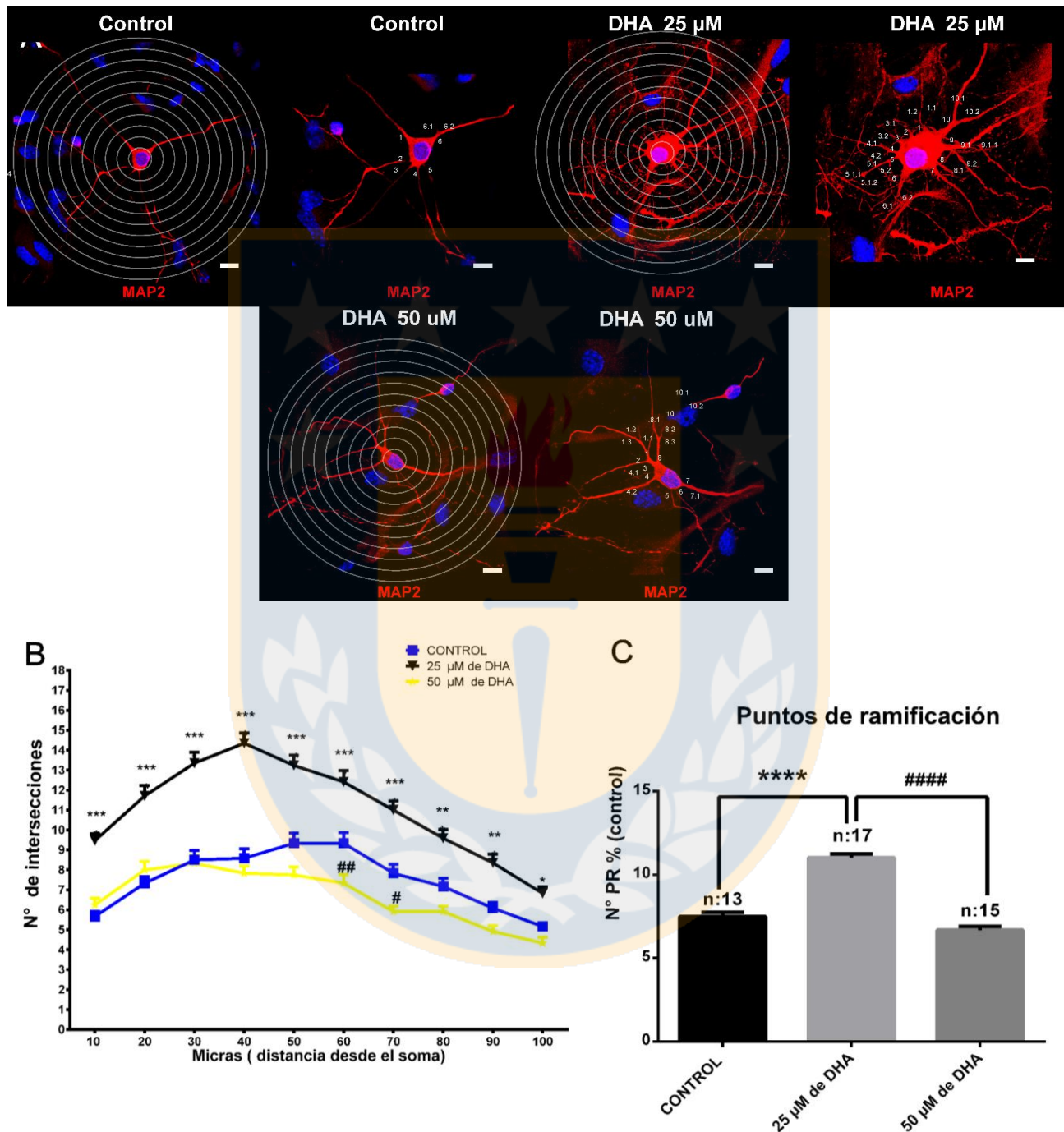


Figura 12. Cuantificación de la arborización y número de intersecciones en cultivo primario de neuronas corticales en presencia de concentraciones de 25 μM y 50 μM DHA. (A) Esquemas de los radios circunferenciales (10 μm) aplicados de acuerdo con el método de Sholl. Barra de tamaño: 10 μm. **(B)** Gráfico del número de intersecciones presentes a diferentes radios

circunferenciales en neuronas corticales incubadas con 25 μM (triángulos invertidos negros), 50 μM (estrellas amarillas) y control (cuadrados azules). Los resultados corresponden al promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes, con un total de 13-17 neuronas analizadas por condición. El análisis estadístico fue realizado utilizando la prueba de Bonferroni *** $p < 0.001$. **(C)** El gráfico representa el número total de puntos de ramificación (PR) en neuronas corticales de ratón, bajo las mismas condiciones que en **(A)**, expresado en porcentaje en relación con el control. ANOVA de una vía **** $p < 0.001$; * $p < 0.5$ versus Control y #### $p < 0.001$; # $p < 0.5$ versus 25 μM .

Posteriormente, evaluamos los efectos de DHA en presencia y ausencia del inhibidor de GPR40, GW1100, en ensayos independientes a los mostrados en las Figuras 11 y 12. Para estos ensayos, se cuantificaron los efectos de 5 μM y 25 μM de DHA en presencia de GW1100. En estos experimentos observamos que las neuronas tratadas con GW1100 y 5 μM de DHA no presentaron diferencias en su arborización, en comparación con el control (Figura 13-A). Por otra parte, el tratamiento con GW1100 en ausencia de DHA exógeno no generó cambios significativos en la arborización ni en el número de ramificaciones (Figura 13 A-B). Las neuronas que fueron tratadas con 5 μM de DHA mostraron mayor número de procesos, en comparación con las neuronas tratadas con 5 μM de DHA+GW1100, las cuales presentaron una tendencia limitada, pero significativa, a la disminución entre las 20 y 40 micras de distancia radial desde el soma. La cuantificación del número PR entre estas dos condiciones no mostró diferencias significativas (Figura 13 -C). Los efectos de 25 μM de DHA produjeron un aumento significativo en la arborización de neuronas corticales, lo cual sugiere un buen nivel de reproducibilidad de nuestros ensayos. La aplicación del inhibidor de GPR40 generó una disminución significativa en el aumento de la arborización neuronal promovida por 25 μM DHA. Por ejemplo, a las 50 micras de distancia, el número de procesos neuronales es de 13 para neuronas incubadas con 25 μM de DHA y de 5 procesos para aquellas neuronas tratadas con 25 μM + GW1100. El inhibidor GW1100 también alteró significativamente el aumento en la PR inducido por 25 μM DHA (Figura 13).

En conjunto, nuestros resultados indican que la aplicación de 25 μM de DHA fue eficaz en aumentar el número de procesos neuríticos y la arborización neuronal. Además, nuestras observaciones indican que la activación del receptor GPR40 es necesaria para estos efectos. Sin embargo, la activación del receptor GPR40 parece no ser un elemento crítico para el crecimiento de procesos neuríticos y la arborización neuronal en nuestras condiciones basales de cultivo.

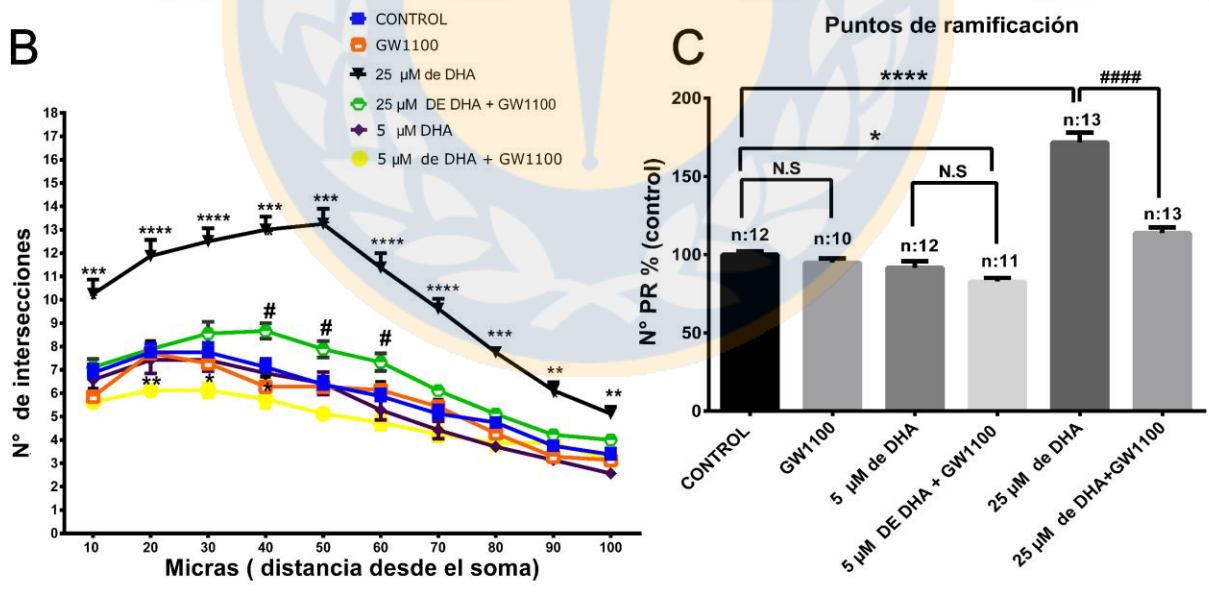
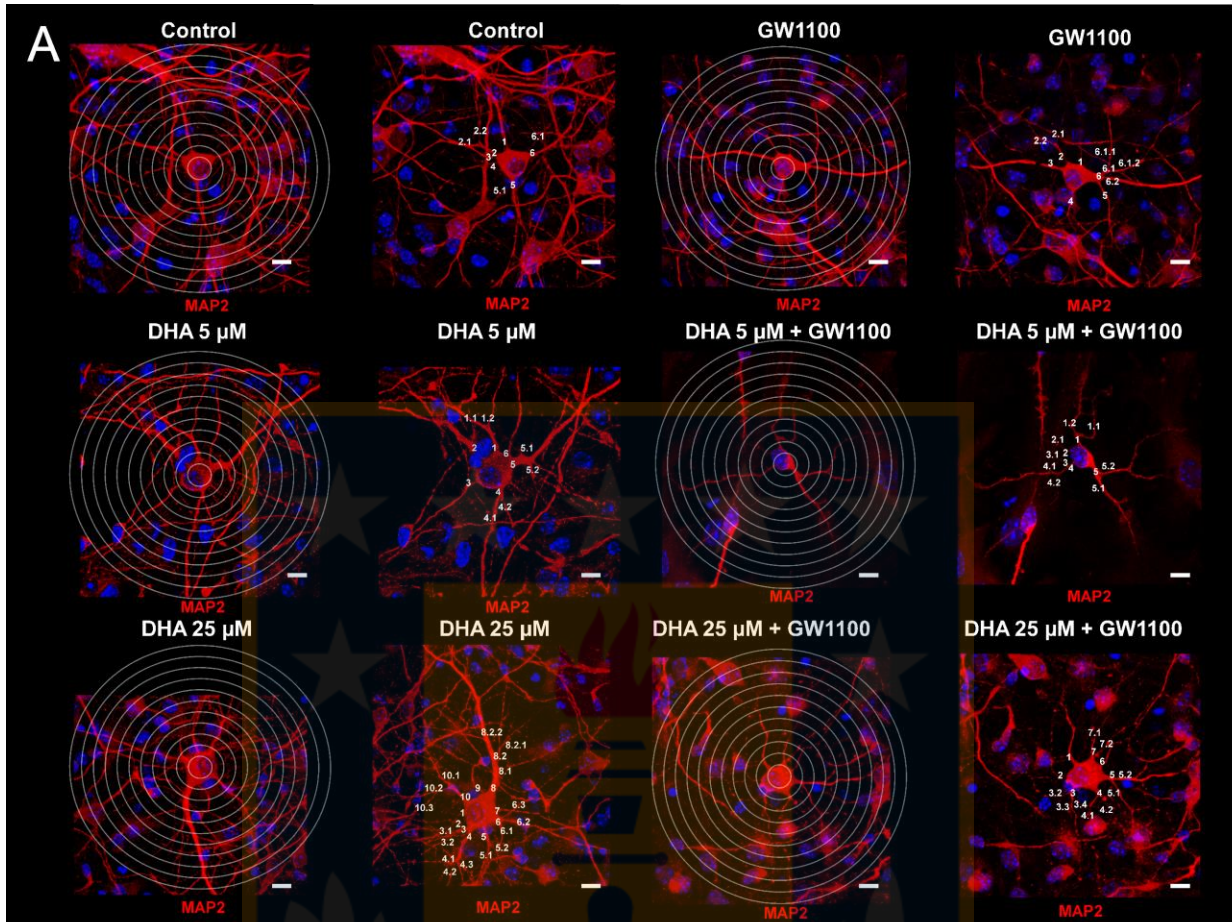


Figura 13. Cuantificación de la arborización y número de intersecciones en cultivo primario de neuronas corticales incubadas con DHA y GW1100. (A) Esquemas de los radios circunferenciales (10 μm) aplicados de acuerdo con el método de Sholl. Barra de tamaño:10 μm. **(B)** Gráfico del número de intersecciones presentes a diferentes radios circunferenciales en neuronas

corticales incubada con 25 μM (triángulos invertidos negros), 25 μM +GW1100 (círculos verdes), 5 μM (rombos morados), 5 μM +GW1100 (círculos amarillos), GW1100 (cuadrados naranjos) y su control (cuadrados azules). Los resultados corresponden al promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes, con un total de 11-13 neuronas analizadas por condición. El análisis estadístico fue realizado utilizando la prueba de Bonferroni *** $p < 0.001$. **(C)** El gráfico representa el número total de puntos de ramificación (PR) en neuronas corticales de ratón, bajo las mismas condiciones que en **(A)**, expresado en porcentaje en relación con el control. ANOVA de una vía **** $p < 0.001$; * $p < 0.5$ versus Control y ##### $p < 0.001$; # $p < 0.5$ versus 25 μM .

8.3. Efectos del DHA en la expresión de la proteína sináptica SV2 en neuronas corticales, en presencia y en ausencia de GW1100.

La proteína SV2 ha sido identificada como un componente molecular esencial de la vesícula sináptica (Stout et al., 2019). Utilizando inmunocitoquímica y análisis de intensidad de fluorescencia evaluamos los efectos de distintas concentraciones de DHA en la expresión de SV2 en neuronas corticales. Neuronas corticales incubadas con concentraciones de 0.5 μM , 5 μM y 25 μM de DHA presentaron una mayor detección de inmunoreactividad para SV2, en comparación con condiciones controles (Figura 14). Ensayos utilizando 50 μM DHA también mostraron un aumento significativo, pero modesto, en la señal para SV2. Sin embargo, 100 μM DHA no mostró diferencias significativas (Figura 14).

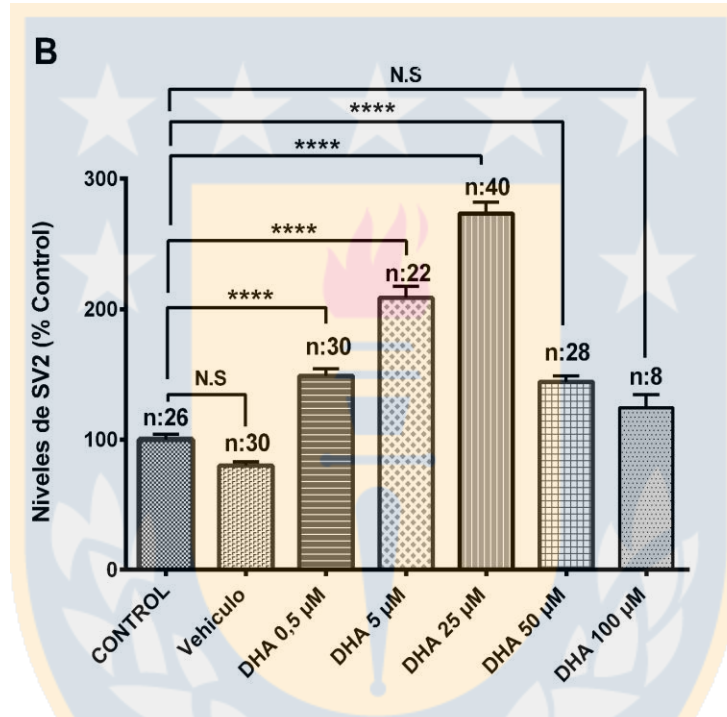
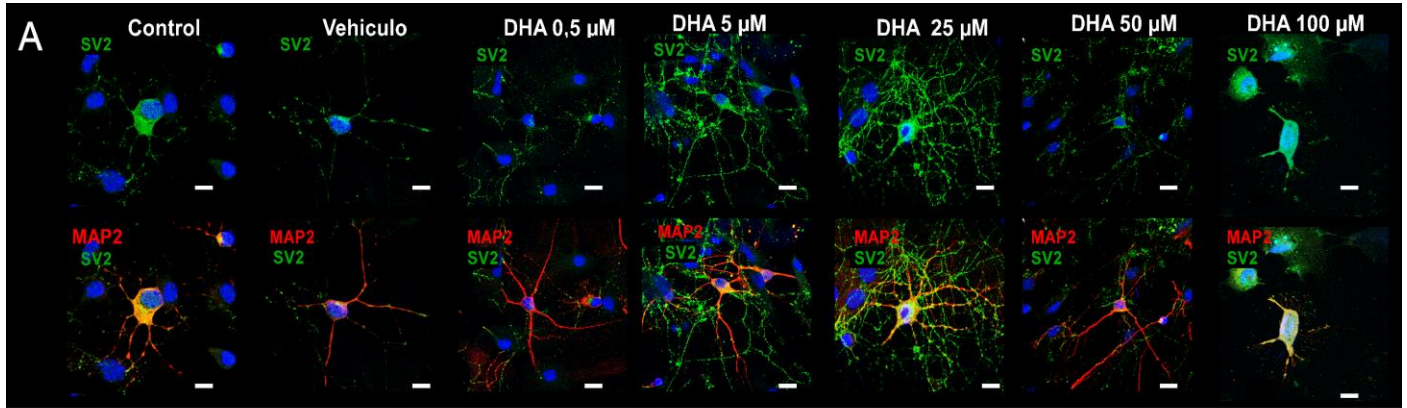


Figura 14. Inmunoreactividad de la proteína sináptica SV2 en los procesos neuríticos de neuronas corticales bajo diferentes concentraciones de DHA. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal (40X), de neuronas corticales (10 DIV) tratadas durante 24 h con DHA (0.5 μM, 5 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM). En rojo se detectó la señal para MAP2. Barra de tamaño, 10 μM **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia para SV2 en los procesos neuronales, expresada como porcentaje del control sin tratamiento. *, ANOVA de una vía, * $p < 0.05$ y **** $p < 0.0001$ versus control).

Al evaluar la inmunoreactividad de SV2 en los procesos neuronales, notamos que algunas concentraciones de DHA modificaron de modo importante la intensidad de la señal para SV2 en el soma de las neuronas. Concentraciones de DHA de 0.5 μM ($208.7 \pm 10.3\%$) y 5 μM ($213.7 \pm 9.6\%$) promovieron significativamente la expresión de SV2 a nivel del soma respecto del control sin tratamiento ($100 \pm 7.1\%$) o del vehículo ($109.5 \pm 7.5\%$) (Figura 15 A-B). A 25 μM de DHA, no se observaron cambios significativos en la expresión de SV2 en el soma, alcanzando una inmunoreactividad similar a la basal (Figura 15B). Concentraciones mayores de DHA aumentaron marginalmente la inmunoreactividad a nivel del soma de SV2 (Figura 15B). En conjunto, nuestros resultados sugieren que concentraciones bajas de DHA (0.5 μM y 5 μM) promoverían la síntesis de SV2 en el soma neuronal y que solo concentraciones mayores (25 μM y 50 μM) promoverían su síntesis y transporte hacia los procesos neuronales.

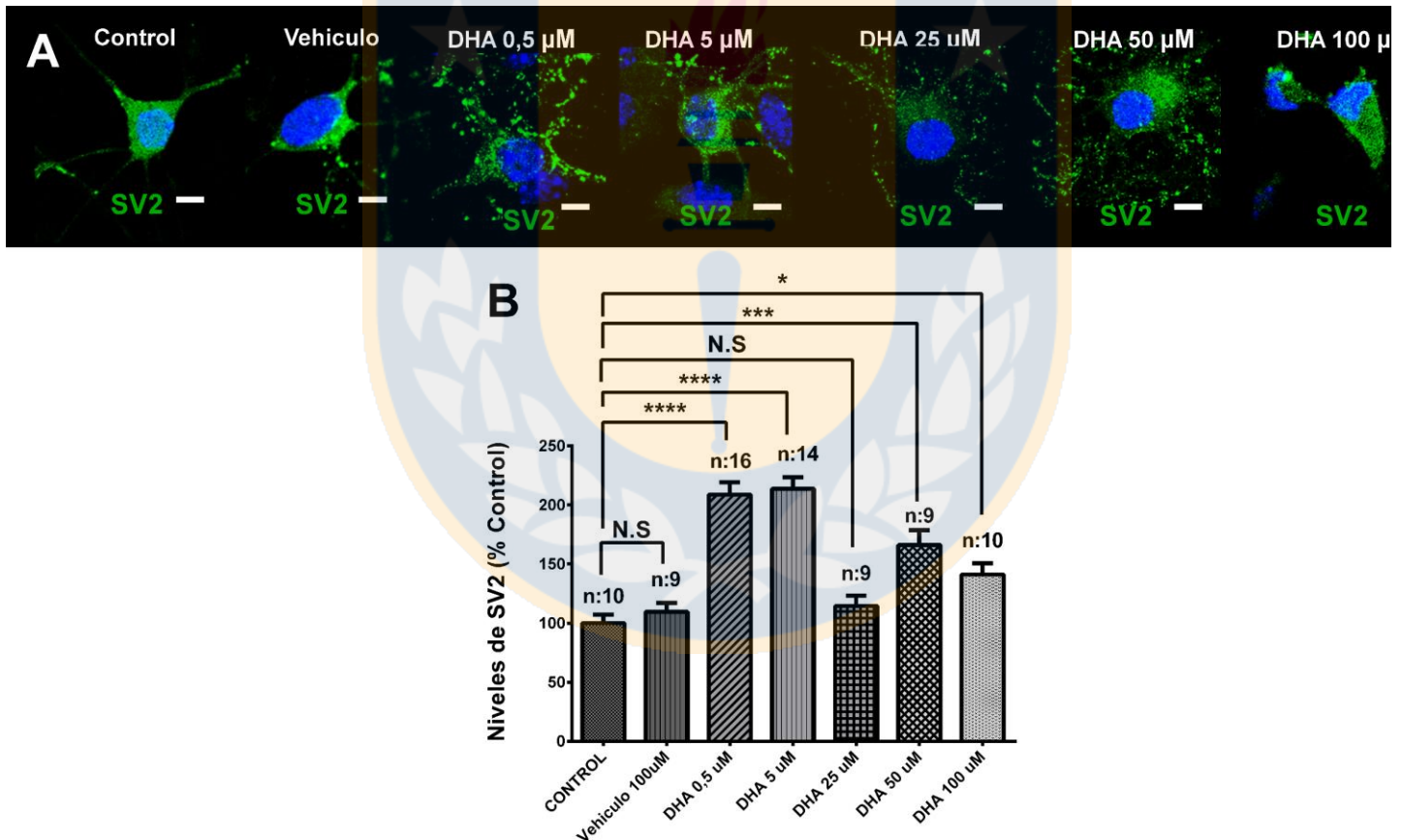


Figura 15. Cambios en la inmunoreactividad de SV2 producidos por diferentes concentraciones de DHA en somas de neuronas corticales. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal (40X), de neuronas corticales (10 DIV) tratadas durante 24 h con DHA. La

inmunoreactividad SV2 (en verde) fue detectada a nivel del soma. Barra de tamaño para cada imagen en A: 10 μ M **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia presente en los somas neuronales, expresada como porcentaje del control sin tratamiento. *, ANOVA de una vía, * $p < 0.05$ y **** $p < 0.0001$ versus control).

Finalmente, realizamos experimentos independientes para evaluar el efecto de DHA en la inmunoreactividad de SV2 en los procesos neuronales en presencia del inhibidor de GPR40, GW1100. Las neuronas co-incubadas con 5 μ M o 25 μ M de DHA en conjunto con GW1100 mostraron que el inhibidor de GPR40 revirtió el aumento de la inmunoreactividad de SV2 generado por DHA (5 μ M: $133 \pm 5.1\%$ vs $85.3 \pm 2.6\%$, 25 μ M: $246.3 \pm 9\%$ vs $84.25 \pm 2.5\%$) (Figura 16 A-B). De manera interesante, observamos que la presencia de GW1100 durante 24 horas disminuyó la inmunoreactividad basal de SV2 a un $72.23 \pm 2.0\%$, en relación con el control ($100 \pm 5.2\%$) (Figura 16 A-B).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que los efectos positivos de DHA en la expresión de SV2 son mediados por la activación de GPR40. A su vez, estos experimentos sugieren que el receptor GPR40 sería un componente importante para la correcta expresión de esta proteína presináptica en las condiciones basales de nuestros cultivos.

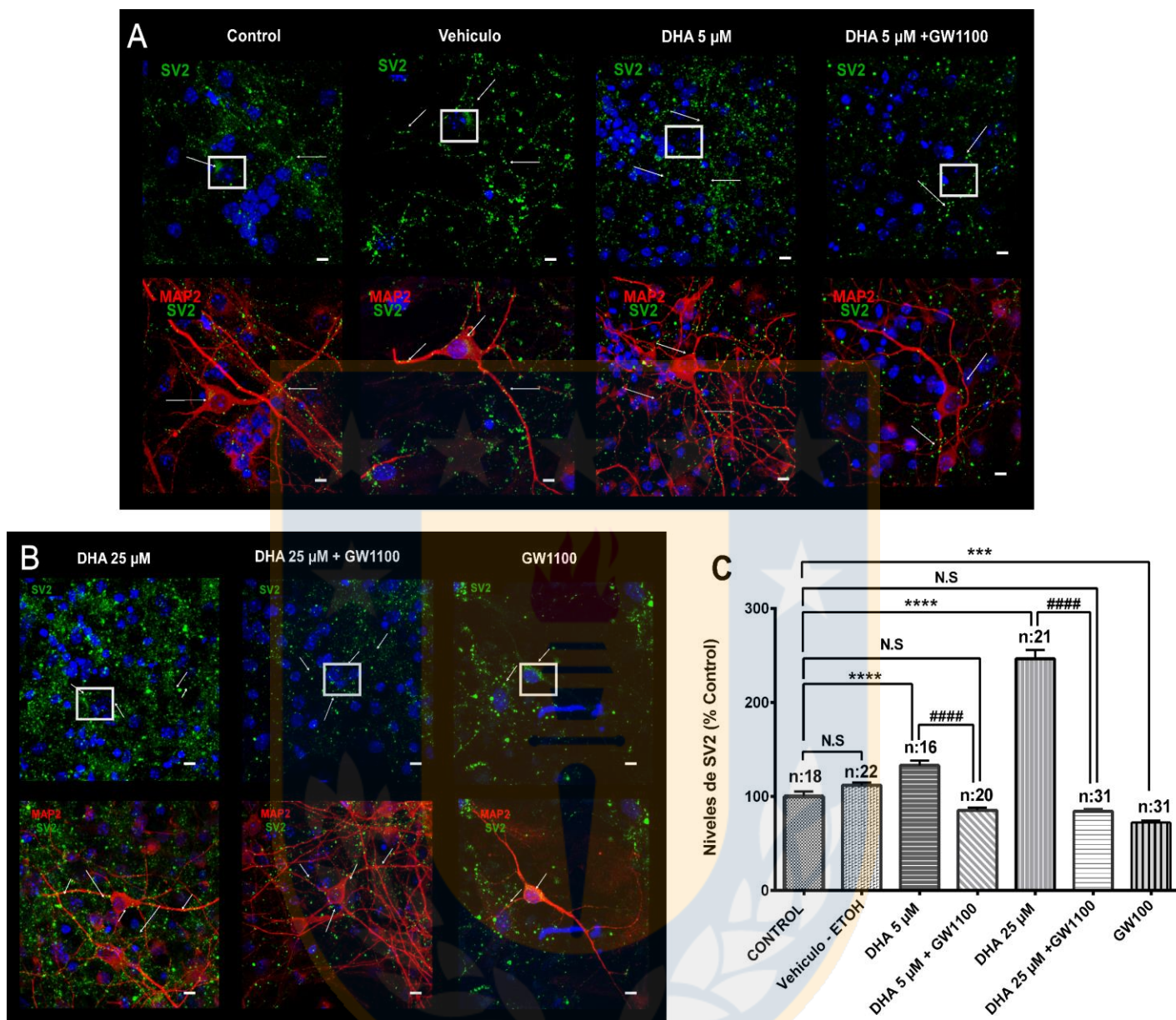


Figura 16. Inmunoreactividad de SV2 en los procesos neuríticos de neuronas corticales bajo diferentes concentraciones de DHA en presencia de GW1100. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal (63X), de neuronas corticales (10 DIV) tratadas durante 24 h con DHA (5 μM, 5 μM+GW1100). **(B)** Imágenes representativas de microscopía confocal (63X), de neuronas corticales (10 DIV) tratadas durante 24 h con DHA (25 μM, 25 μM+GW1100). La inmunoreactividad SV2 (verde) fue detectada en los procesos celulares. Barra de tamaño, 10 μm. **(C)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia, expresada como porcentaje del control sin tratamiento. ANOVA de una vía ****p<0.001; *p<0.5 versus Control y ##### p<0.001; # p<0.5 versus 25 μM.

8.4. La aplicación de 100 μM de DHA provoca alteraciones morfológicas en neuronas corticales.

Utilizando protocolos similares a los anteriormente descritos, la cuantificación de la expresión de SV2 a una concentración de 100 μM de DHA no fue posible de realizar, ya que DHA indujo una evidente pérdida de la morfología neuronal y de los procesos neuronales. El marcaje con MAP2 mostró que esta concentración generó somas neuronales redondeados y una disminución importante en el largo de las prolongaciones (Figura 17). Estas observaciones fueron corroboradas mediante microscopía de campo claro, la que mostró una pérdida significativa de las prolongaciones neuríticas. Finalmente, experimentos preliminares sugirieron que la aplicación de GW1100 no fue capaz de revertir los defectos morfológicos inducidos por 100 μM de DHA en los cultivos de neuronas corticales



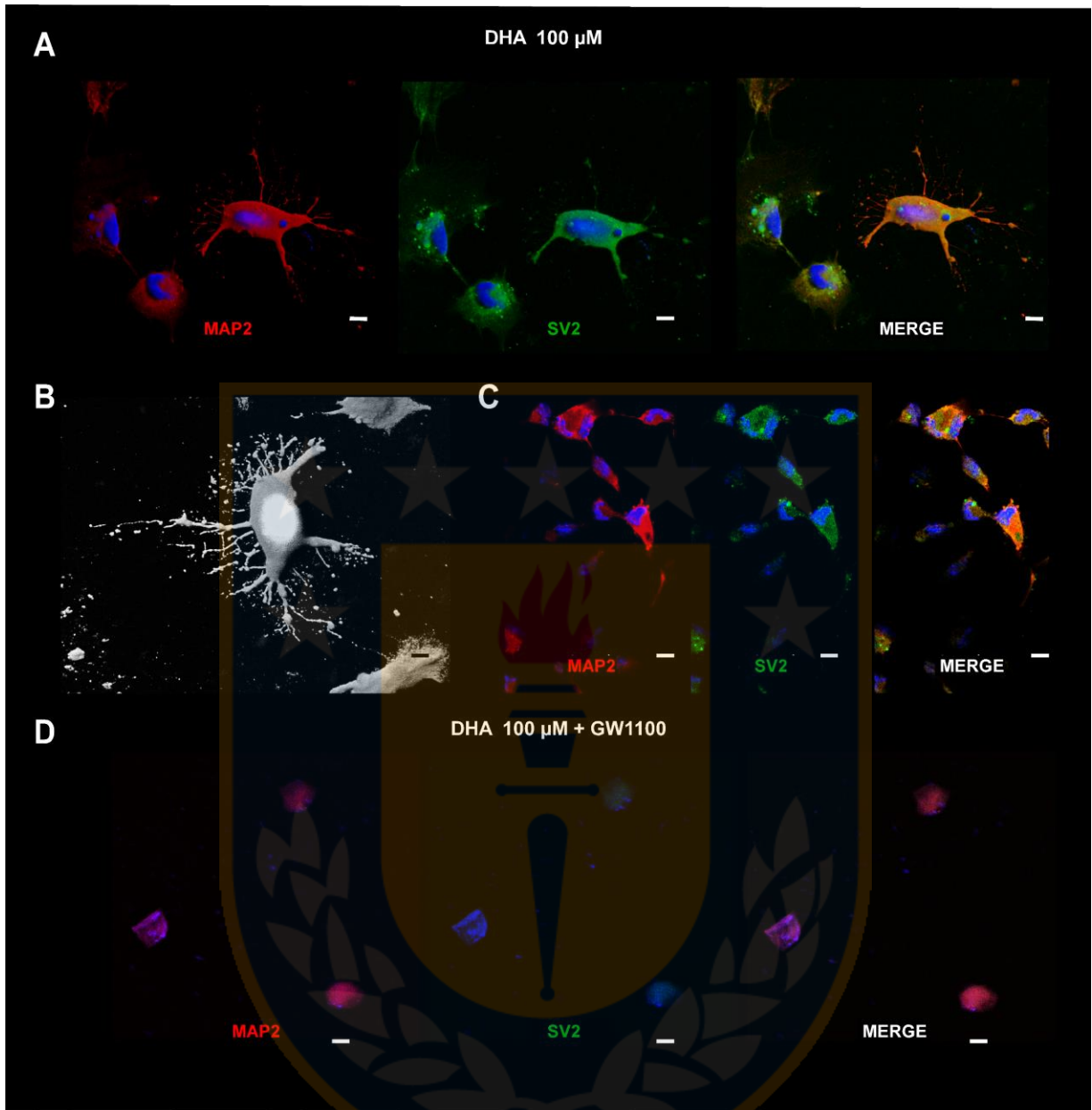


Figura 17. Pérdida de la morfología neuronal inducida por 100 μM de DHA, en ausencia y en presencia de GW1100. (A) Imágenes representativas de microscopía de confocal (63X), de neuronas corticales (10 DIV) tratadas durante 24 h con DHA (100 μM). **(B)** Imagen representativa de microscopía de campo claro (63x), de la única neurona encontrada a una concentración de 100 μM y que conservó parcialmente su morfología característica, con un acortamiento de los procesos neuronales. **(C)** Imagen que muestra cuerpos neuronales con carencia de procesos. **(D)** Imágenes representativas de microscopía confocal (63X), de neuronas corticales (10 DIV) tratadas durante 24 h con DHA en presencia de GW1100 (100 μM +GW1100). Imagen muestra mayor pérdida de la morfología neuronal en relación al tratamiento con DHA (100 μM) en ausencia de GW1100, lográndose distinguir algunos cuerpos neuronales con carencia de procesos GW1100. Barra de tamaño, 10 μm .

9. Discusión

Diferentes familias de ácidos grasos han sido destacadas por desempeñar importantes funciones fisiológicas (Calder, 2016; Kimura et al., 2020). El DHA ha adquirido un especial interés debido a sus efectos a nivel celular y fisiológico en el sistema nervioso central (Bazan et al., 2011; Calder, 2016; Kimura et al., 2020). Evidencias experimentales a nivel celular han mostrado que DHA favorece la expresión de marcadores de crecimiento axonal y de proteínas sinápticas, estimula el crecimiento de ramificaciones neuríticas y promueve la sobrevivencia celular (Ziv & Garner, 2004; Cao et al., 2005; Cao et al., 2009; Chang et al., 2015; Mita et al., 2016; Carbone et al., 2020). Coincidentemente, restricciones dietarias de ácidos grasos han mostrado ser perjudiciales para el desarrollo neuronal *in vivo* (Calderon & Kim, 2004; Simon C. Dyllal, 2015; Tang et al., 2018).

Los mecanismos de acción involucrados en las acciones benéficas del DHA a nivel molecular en células del sistema nervioso aún no se encuentran dilucidados. En este contexto, se ha propuesto que la activación del receptor GPR40 por DHA sería un mecanismo clave para explicar algunos de los efectos benéficos de DHA en la sobrevivencia celular, morfología neuronal, y maduración sináptica. Sin embargo, las evidencias experimentales que relacionan al GPR40 con estas acciones tróficas son escasas y requieren ser ampliadas. El presente trabajo de tesis se centró en estudiar la relevancia de la activación del receptor GPR40 en los efectos positivos del DHA en procesos de supervivencia, de crecimiento neurítico y de sinaptogénesis en cultivos primarios de neuronas corticales y en células N2A. Con el objetivo de realizar una discusión centrada en los objetivos específicos planteados, se analizarán y discutirán los resultados más importantes del trabajo experimental de manera secuencial en tres secciones temáticas.

9.1. Efectos de DHA en la supervivencia de células N2A

Nuestros ensayos de muerte (sección 8.1) lograron determinar que DHA disminuyó significativamente el porcentaje de muerte celular de cultivos de células N2A, con respecto al control. Evidencias previas han descrito que la aplicación de DHA promueve la supervivencia celular en diferentes tipos celulares y paradigmas experimentales. Por ejemplo, estudios en células N2A mostraron que la incubación con 12.5 μM de DHA durante 24 horas disminuyeron significativamente la fragmentación del ADN (Kim et al., 2001) e inhibió la

inducción de caspasas y posterior apoptosis inducida por AraC (Wu et al., 2007). Otros autores, evaluaron el efecto protector de DHA en células PC12 usando un modelo de daño oxidativo con peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Estos autores observaron que el pre-tratamiento con 60 μM DHA (24 hrs), previene de manera significativa la pérdida de viabilidad celular inducida por H_2O_2 , sugiriendo la vía de regulación antioxidante NFE2L2 como posible mecanismo (Clementi et al., 2019). A su vez, la incubación con concentraciones en un rango de 25 μM - 50 μM de DHA, previnieron la muerte de neuronas corticales (Cao et al., 2005). Una investigación reciente evaluó el efecto de diferentes concentraciones de DHA sobre la viabilidad celular de células progenitoras neurales utilizando metodologías análogas a las de nuestro trabajo. Estos autores observaron que una concentración de 25 μM de DHA promovió significativamente la viabilidad de células progenitoras neurales, en relación con la condición control (Zhao et al., 2019) utilizando el sistema IncuCyte y mediciones de 24-48 horas.

Los mecanismos moleculares relacionados a los efectos benéficos del DHA en la viabilidad celular han mostrado ser diversos y no se encuentran definidos. Un estudio pionero en el área mostró que los efectos anti-apoptóticos de DHA en células N2A estarían relacionados con la vía de señalización fosfitidilinositol 3-quinasa [PI(3)K]/AKt (Akbar et al., 2005). Por otro lado, otros estudios han mostrado que DHA estimuló la activación del factor de transcripción CREB, promoviendo la sobrevivencia (Zhao et al., 2019), mientras que otros han propuesto la participación de la vía antioxidante NRF2 (Clementi et al., 2019). En este contexto, nuestros estudios mostraron que la activación del receptor GPR40 es clave para los efectos positivos del DHA en la viabilidad de células N2A (Figura 10). Interesantemente, la aplicación del inhibidor GW1100 disminuyó significativamente la viabilidad basal (*i.e.* ausencia de DHA exógenamente aplicado), lo que sugiere un rol relevante del GPR40 en la regulación de la sobrevivencia de estas células en nuestro sistema experimental. La evidencia respecto a la activación del GPR40 indica que concentraciones mayores a 1 μM de DHA serían suficientes para activar el GPR40 (Itoh et al., 2003; Ma et al., 2010; Kimura et al., 2020), lo cual sugiere que nuestras condiciones experimentales lograrían una activación robusta del receptor. Nuestros resultados además sugieren que 0.5 μM de DHA serían suficientes para lograr la activación del GPR40 y la subsecuente actividad protectora de DHA sobre la muerte celular.

En conjunto, podemos concluir que DHA ejerce un efecto protector ante la muerte celular mediado por GPR40 en células N2A. Nuestros resultados sugieren que la activación del GPR40 por DHA como un mecanismo emergente para explicar, al menos en parte, los efectos positivos de DHA en la sobrevivencia celular. Solo estudios muy recientes en células hipotalámicas han mostrado que la expresión de GPR40 correlaciona positivamente con una mayor sobrevivencia celular (Engel et al., 2020). Sin embargo, los resultados de este trabajo deben ser ampliados a otros sistemas y estrategias de estudio para confirmar de manera definitiva la participación de GPR40 en la regulación de la viabilidad celular.

9.2. Acciones del DHA en el crecimiento neurítico y la arborización

Evidencias experimentales de diferentes grupos de investigadores han mostrado que DHA es capaz de promover el crecimiento neurítico y la arborización (Kawakita et al., 2006). Por ejemplo, Cao y colaboradores reportaron que la aplicación crónica de DHA a una concentración de 25 μM , durante 24-48 horas, estimuló el crecimiento, el largo y el número de ramificaciones neuronales de neuronas corticales de ratón (Cao et al., 2005). Por otra parte, otros investigadores han mostrado que DHA aumentó el crecimiento axonal (Mita et al., 2016) y la complejidad de las arborizaciones dendríticas (Carbone et al., 2020) en neuronas corticales e hipocámpales, respectivamente. Nuestros resultados en neuronas corticales en cultivo lograron reproducir, al menos cualitativamente, los hallazgos previos de estos investigadores. Sin embargo, solo la aplicación de 25 μM de DHA (por 24 horas) logró generar cambios significativos en la complejidad de arborización y en el número de puntos de ramificación en nuestro modelo experimental (Figura 11). A la luz de las evidencias previas, posiblemente incubaciones más prolongadas con concentraciones menores de DHA (0.5 μM o 5 μM) serán capaces de inducir efectos detectables en estos parámetros. A pesar de ello, consideramos que nuestros resultados son coincidentes con la literatura publicada y refuerzan los efectos tróficos del DHA en la morfología neuronal.

Los mecanismos involucrados en los efectos descritos anteriormente no están dilucidados. A la fecha, se han propuesto tres vías de señalización relevantes para la acción de DHA en la morfología neuronal: el receptor de retinoide RXR, la señalización BDNF/TrkB y el receptor GPR40 (Calderon & Kim, 2007; Ma et al., 2010; Bhatia et al., 2011).

Nuestros resultados apoyan la idea de que la activación del receptor GPR40 es necesaria para los efectos positivos del DHA en la arborización y crecimiento neurítico (Figura 13). De modo interesante, el inhibidor GW1100 bloqueó significativamente el

aumento en la arborización y los puntos de ramificación estimulado por la aplicación exógena de 25 μM DHA, pero se mostró incapaz de afectar el desarrollo morfológico basal de las neuronas corticales en nuestro sistema. Nuestros resultados se ajustan cualitativamente a la única investigación realizada en torno a esta temática (Ma et al., 2010), quienes determinaron que 1.5 μM de DHA fue capaz de promover el crecimiento neurítico de células madre de rata transfectadas con el gen GPR40.

Este grupo de experimentos demuestra que la aplicación exógena de DHA, al menos en un rango específico de concentraciones, promueve la morfología normal de neuronas corticales, impactando directamente en el crecimiento de los procesos neuronales y complejidad de la arborización. Además, podemos concluir que GPR40 sería un mediador crítico para estos efectos. En el contexto de esta área de investigación, nuestras observaciones aparecen como muy novedosas y con excelentes proyecciones futuras. Sin embargo, experimentos adicionales en otros sistemas que incluyan, por ejemplo, moduladores farmacológicos y estrategias moleculares adicionales, son requeridos para confirmar la relevancia del GRP40 en estos procesos.

9.3. Efectos de DHA en la expresión de la proteína sináptica SV2.

La proteína SV2 es una proteína constitutiva de vesícula sináptica que está involucrada principalmente en el almacenamiento de neurotransmisores y tráfico vesicular (Stout et al., 2019). Además, SV2 ha sido caracterizada como un componente molecular relacionado con el desarrollo y función de las sinapsis, por lo que su cuantificación es tomada como un indicador sugerente de sinapsis funcionales (Bajjalieh et al., 1994; Crèvecoeur et al., 2013). Experimentos de otros grupos de investigación han demostrado que la suplementación de DHA incrementa la expresión de proteínas pre y postsinápticas. Por ejemplo, la incubación de cultivos hipocámpales con 1 μM de DHA, durante 10 días, produjo un aumento significativo en la expresión de sinapsina I, proteína que, al igual que SV2, también se encuentra asociada a vesícula sináptica (Cao et al., 2009). Otros autores han reportado que la administración de DHA contrarrestó el deterioro sináptico producido por el anestésico sevofluorano, aumentando los niveles de expresión de la proteína vesicular sinaptofisina en el hipocampo de ratones (Tao et al., 2016). En la misma línea, ensayos con neuronas de hipocampo disociadas mostraron que DHA incrementó la expresión de la proteína sináptica Bassoon (Carbone et al., 2020). Nuestros resultados lograron, al menos cualitativamente, reproducir estos hallazgos a través de la cuantificación de la

inmunoreactividad a SV2 en neuronas corticales. En nuestros ensayos, concentraciones de DHA promovieron la expresión de SV2 en los procesos neuríticos de manera dependiente de la concentración de DHA (Figura 14). La relación concentración respuesta obtenida mostró una forma de campana, con un aumento significativo de la expresión de SV2 entre 0.5 y 25 μM (alcanzando un máximo a 25 μM), para luego descender a incrementos modestos, similares a la señal basal, a concentraciones de 50 y 100 μM .

En nuestros experimentos, se observó además que DHA influyó en la distribución subcelular de SV2. Concentraciones de 0.5 y 5 μM de DHA mostraron un aumento significativo de la inmunoreactividad somática a SV2, mientras que 25 μM no logró generar cambios. Coincidentemente, estudios previos han mostrado que una de las isoformas de SV2, SV2C, se expresa en somas de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio (Dunn et al., 2017) y en somas de neuronas espinales GABAérgicas (Dunn et al., 2019). Aunque ciertamente nuestros resultados son limitados y requieren de ensayos adicionales, los hallazgos del presente trabajo sugieren que concentraciones bajas de DHA (< 5 μM) preferentemente promoverían la síntesis de SV2 en el soma neuronal y concentraciones mayores (específicamente 25 μM) promoverían su síntesis y transporte hacia los procesos neuronales.

El efecto positivo de DHA sobre la expresión de SV2 fue particularmente dependiente de la activación del receptor GPR40. Nuestros resultados mostraron que el inhibidor GW1100 revirtió significativamente el aumento de la inmunoreactividad de SV2 promovido por 5 y 25 μM (Figura 16). Además, se observó que la presencia de GW1100 durante 24 horas disminuyó la inmunoreactividad basal de SV2 en aproximadamente 1/3 en relación con la condición control sin tratamiento (Figura 16). Este conjunto de resultados relacionados con GPR40 y la expresión de proteínas sinápticas no han sido reportados a la fecha, y por ende, proporcionan información novedosa y relevante que refuerza el potencial rol de DHA en la maduración sináptica. La relevancia del receptor GPR40 coincide con estudios de su localización celular, la cual ha mostrado que GPR40 se expresa en dendritas y botones sinápticos en neuronas neonatales (Yamashima, 2008). Aunque ciertamente experimentos adicionales son necesarios, los resultados obtenidos sugieren una relevancia crítica de la activación de GPR40 en la maduración sináptica del sistema nervioso central.

9.4. Acciones de 100 μ M de DHA en la morfología neuronal.

Un hallazgo particularmente intrigante de esta tesis fue descubrir que la aplicación de 100 μ M de DHA (24 horas) provoca alteraciones morfológicas importantes en las neuronas, reduciendo el largo de las prolongaciones y generando somas neuronales redondeados (Figura 17). Esta morfología típica limitó el estudio de la cuantificación de la señal de SV2 de nuestro estudio. De manera interesante, un estudio reciente realizado en una línea celular de microglia (BV-2) mostró que 200 μ M DHA generó alteraciones morfológicas similares a las mostradas en nuestro sistema de neuronas corticales (Srikanth et al., 2018). Estos autores además reportaron que 200 μ M DHA generó un aumento de citoquinas inflamatorias y activación de caspasas, promoviendo una muerte celular programada conocida como piroptosis (Srikanth et al., 2018). Sin embargo, las evidencias experimentales discutidas más arriba no coinciden con los hallazgos descritos por Darios & Davletov, quienes no reportaron alteraciones morfológicas significativas al examinar los efectos de 200 μ M DHA en cultivos de células PC12 a las que se les administró factor de crecimiento nervioso (NGF) (Darios & Davletov, 2006). En conjunto, estas evidencias sugieren que DHA ejerce efectos diferenciales que son, al menos en parte, dependientes de la concentración utilizada y del modelo celular examinado. Debido a que no existen reportes que examinen sistemáticamente los efectos de concentraciones altas de DHA en neuronas, los hallazgos de esta tesis pudieran ser un punto de partida para, por ejemplo, examinar mecanismos de muerte celular en neuronas causadas por diferentes ácidos grasos.

10. Conclusiones

Los resultados de esta tesis lograron determinar que DHA promueve la expresión del marcador presináptico SV2 y estimula el crecimiento neurítico de neuronas corticales en cultivo. Por otra parte, se logró determinar que DHA ejerce un efecto positivo en la sobrevivencia de células N2A. Los efectos positivos de DHA en estos ensayos fueron dependientes de la concentración. En líneas generales, la aplicación de DHA a concentraciones menores de 25 μM fueron capaces de producir efectos benéficos significativos en neuronas y en células N2A, mientras que 100 μM DHA generó un efecto neurotóxico significativo. De manera interesante, nuestros hallazgos utilizando un inhibidor selectivo del receptor GPR40 mostraron que los efectos benéficos de DHA en viabilidad celular, crecimiento neurítico, arborización y expresión de SV2 son en gran parte mediados por GPR40.

En conjunto, nuestros resultados en neuronas corticales y en células N2A lograron reproducir cualitativamente los hallazgos previamente publicados por otros grupos respecto a los efectos de DHA en viabilidad, crecimiento neurítico y expresión de marcadores sinápticos. Así, la buena correlación entre nuestros resultados y las evidencias previas refuerzan el concepto de DHA como un nutriente fundamental para el desarrollo neuronal. Por otra parte, y dado que los mecanismos moleculares implicados en los efectos benéficos de DHA en el sistema nervioso no están dilucidados completamente, nuestros hallazgos utilizando el inhibidor GW1100 aportan evidencias novedosas respecto a un mecanismo de transducción específico implicado en la señalización gatillada por DHA y ácidos grasos en células del sistema nervioso central.

Sin embargo, el conjunto de experimentos logrados es limitado y requiere ser expandido. Futuros experimentos enfocados en la profundización de las vías de transducción implicadas en los efectos de DHA mediados por GPR40 son necesarios para confirmar las observaciones en nuestros modelos experimentales. Asimismo, experimentos adicionales con agonistas, antagonistas y moduladores alostéricos de GPR40 en preparaciones neuronales podrán contribuir a esclarecer las complejas vías de señalización involucradas en los efectos benéficos y tóxicos del DHA en el sistema nervioso central.

11. Bibliografía

- Akbar, M., Calderon, F., Wen, Z., & Kim, H. Y. (2005). Docosahexaenoic acid: A positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(31), 10858–10863. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502903102>
- Alavi, M. S., Shamsizadeh, A., Azhdari-Zarmehri, H., & Roohbakhsh, A. (2018). Orphan G protein-coupled receptors: The role in CNS disorders. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *98*(September 2017), 222–232. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.056>
- Andersen, S. L. (2003). Trajectories of brain development: Point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *27*(1–2), 3–18. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00005-8](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00005-8)
- Ascoli, G. A. (2006). Mobilizing the base of neuroscience data: The case of neuronal morphologies. *Nature Reviews Neuroscience*, *7*(4), 318–324. <https://doi.org/10.1038/nrn1885>
- Bajjalieh, S. M., Frantz, G. D., Weimann, J. M., McConnell, S. K., & Scheller, R. H. (1994). Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *Journal of Neuroscience*, *14*(9), 5223–5235. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-09-05223.1994>
- Bazan, N. G., Molina, M. F., & Gordon, W. C. (n.d.). *Docosahexaenoic Acid Signalolipidomics in Nutrition : Significance in Aging , Neurodegenerative Diseases*. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104635>
- Bazan, N. G., Musto, A. E., & Knott, E. J. (2011). Endogenous signaling by omega-3 docosahexaenoic acid-derived mediators sustains homeostatic synaptic and circuitry integrity. *Molecular Neurobiology*, *44*(2), 216–222. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8200-6>
- Bhatia, H. S., Agrawal, R., Sharma, S., Huo, Y. X., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2011). Omega-3 fatty acid deficiency during brain maturation reduces neuronal and behavioral plasticity in adulthood. *PLoS ONE*, *6*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028451>
- Briscoe, C. P., Peat, A. J., McKeown, S. C., Corbett, D. F., Goetz, A. S., Littleton, T. R., ... Jenkinson, S. (2006). Pharmacological regulation of insulin secretion in MIN6

cells through the fatty acid receptor GPR40: Identification of agonist and antagonist small molecules. *British Journal of Pharmacology*, 148(5), 619–628. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706770>

- Briscoe, C. P., Tadayyon, M., Andrews, J. L., Benson, W. G., Chambers, J. K., Eilert, M. M., ... Muir, A. I. (2003). The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11303–11311. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211495200>
- Calder, P. C. (2016). Docosahexaenoic acid. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 69(1), 8–21. <https://doi.org/10.1159/000448262>
- Calderon, F., & Kim, H. (2004). *Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons*. 979–988. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02520.x>
- Calderon, F., & Kim, H. Y. (2007). Role of RXR in neurite outgrowth induced by docosahexaenoic acid. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 77(5–6), 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2007.10.026>
- Cao, D., Kevala, K., Kim, J., Moon, H. S., Jun, S. B., Lovinger, D., & Kim, H. Y. (2009). Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *Journal of Neurochemistry*, 111(2), 510–521. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06335.x>
- Cao, D., Xue, R., Xu, J., & T, Z. L. (2005). *Effects of docosahexaenoic acid on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures*. 16, 538–546. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.02.002>
- Carbone, B. E., Abouleish, M., Watters, K. E., Vogel, S., Ribic, A., Schroeder, O. H. U., ... Biederer, T. (2020). Synaptic Connectivity and Cortical Maturation Are Promoted by the ω -3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid. *Cerebral Cortex*, 30(1), 226–240. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz083>
- Chang, P. K. Y., Khatchadourian, A., McKinney, A. A., & Maysinger, D. (2015). Docosahexaenoic acid (DHA): A modulator of microglia activity and dendritic spine morphology. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0244-5>
- Chin, L. S., Li, L., Ferreira, A., Kosik, K. S., & Greengard, P. (1995). Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9230–9234. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9230>

- Clementi, M. E., Lazzarino, G., Sampaolese, B., Brancato, A., & Tringali, G. (2019). DHA protects PC12 cells against oxidative stress and apoptotic signals through the activation of the NFE2L2/HO-1 axis. *International Journal of Molecular Medicine*, 43(6), 2523–2531. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4170>
- Crèvecoeur, J., Foerch, P., Doupagne, M., Thielen, C., Vandenplas, C., Moonen, G., ... Rogister, B. (2013). Expression of SV2 isoforms during rodent brain development. *BMC Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-14-87>
- Dagai, L., Peri-Naor, R., & Birk, R. Z. (2009). Docosahexaenoic acid significantly stimulates immediate early response genes and neurite outgrowth. *Neurochemical Research*, 34(5), 867–875. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9845-z>
- Darios, F., & Davletov, B. (2006). Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature*, 440(7085), 813–817. <https://doi.org/10.1038/nature04598>
- Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2325–2340. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>
- Dunn, A. R., Hoffman, C. A., Stout, K. A., Ozawa, M., Dhamsania, R. K., & Miller, G. W. (2019). Immunochemical analysis of the expression of SV2C in mouse, macaque and human brain. *Brain Research*, 1702, 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.12.029>
- Dunn, A. R., Stout, K. A., Ozawa, M., Lohr, K. M., Hoffman, C. A., Bernstein, A. I., ... Miller, G. W. (2017). Synaptic vesicle glycoprotein 2C (SV2C) modulates dopamine release and is disrupted in Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(11), E2253–E2262. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616892114>
- Dyllal, S. C., & Michael-Titus, A. T. (2008). Neurological benefits of omega-3 fatty acids. *NeuroMolecular Medicine*, 10(4), 219–235. <https://doi.org/10.1007/s12017-008-8036-z>
- Dyllal, Simon C. (2015). Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: A review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(APR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00052>
- Echeverría, F., Valenzuela, R., Catalina Hernandez-Rodas, M., & Valenzuela, A.

- (2017). Docosahexaenoic acid (DHA), a fundamental fatty acid for the brain: New dietary sources. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 124(January), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.08.001>
- El-Husseini, A. E.-D., Schnell, E., Chetkovich, D. M., Nicoll, R. A., & Brecht, D. S. (2000). PSD-95 Involvement in Maturation of Excitatory Synapses. *Science*, 290(5495), 1364–1368. <https://doi.org/10.1126/science.290.5495.1364>
 - Engel, D. F., Bobbo, V. C. D., Solon, C. S., Nogueira, G. A., Moura-Assis, A., Mendes, N. F., ... Velloso, L. A. (2020). Activation of GPR40 induces hypothalamic neurogenesis through p38- and BDNF-dependent mechanisms. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68110-2>
 - Falomir-Lockhart, L. J., Cavazzutti, G. F., Giménez, E., & Toscani, A. M. (2019). Fatty Acid Signaling Mechanisms in Neural Cells: Fatty Acid Receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(April), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00162>
 - Feng, D. D., Luo, Z., Roh, S. G., Hernandez, M., Tawadros, N., Keating, D. J., & Chen, C. (2006). Reduction in voltage-gated K⁺ currents in primary cultured rat pancreatic β -cells by linoleic acids. *Endocrinology*, 147(2), 674–682. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0225>
 - Flock, M. R., Harris, W. S., & Kris-Etherton, P. M. (2013). Long-chain omega-3 fatty acids: Time to establish a dietary reference intake. *Nutrition Reviews*, 71(10), 692–707. <https://doi.org/10.1111/nure.12071>
 - Friedman, R. (2020). Measurements of neuronal morphological variation across the rat neocortex. *Neuroscience Letters*, 734(February), 135077. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135077>
 - Gallo, G. (2013). Mechanisms Underlying the Initiation and Dynamics of Neuronal Filopodia. From Neurite Formation to Synaptogenesis. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 301). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407704-1.00003-8>
 - Grundmann, M., Bender, E., Schamberger, J., & Eitner, F. (2021). Pharmacology of free fatty acid receptors and their allosteric modulators. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–38. <https://doi.org/10.3390/ijms22041763>
 - Hachem, M., G elo en, A., Van, A. Lo, Foumaux, B., Fenart, L., Gosselet, F., ... Bernoud-Hubac, N. (2016). Efficient Docosahexaenoic Acid Uptake by the Brain from a Structured Phospholipid. *Molecular Neurobiology*, 53(5), 3205–3215.

<https://doi.org/10.1007/s12035-015-9228-9>

- Hara, T. (2016). Ligands at Free Fatty Acid Receptor 1 (GPR40). In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 1, pp. 1–16). https://doi.org/10.1007/164_2016_59
- Hara, T., Kimura, I., Inoue, D., Ichimura, A., & Hirasawa, A. (2013). Free fatty acid receptors and their role in regulation of energy metabolism. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 164, 77–116. https://doi.org/10.1007/112_2013_13
- Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., Stein, R. B., Eichele, G., Evans, R. M., & Thaller, C. (1992). 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell*, 68(2), 397–406. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90479-V](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90479-V)
- Horrocks, L. A., & Farooqui, A. A. (2004). *Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function*. 70, 361–372. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2003.12.011>
- Ikemoto, A., Kobayashi, T., Watanabe, S., & Okuyama, H. (1997). *Membrane Fatty Acid Modifications of PC12 Cells by Arachidonate or Docosahexaenoate Affect Neurite Outgrowth But Not Norepinephrine Release*. 22(6), 671–678.
- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., ... Fujino, M. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. *Nature*, 422(6928), 173–176. <https://doi.org/10.1038/nature01478>
- Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2010). Branching out: Mechanisms of dendritic arborization. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(5), 316–328. <https://doi.org/10.1038/nrn2836>
- Jara, N., Ramirez, E., Ferrada, L., Salazar, K., Espinoza, F., González-Chavarría, I., & Nualart, F. (2021). Vitamin C deficient reduces proliferation in a human periventricular tumor stem cell-derived glioblastoma model. *Journal of Cellular Physiology*, 236(8), 5801–5817. <https://doi.org/10.1002/jcp.30264>
- Jones, A. J. Y., Gabriel, F., Tandale, A., & Nietlispach, D. (2020). Structure and dynamics of GPCRs in lipid membranes: physical principles and experimental approaches. *Molecules*, 25(20), 1–39. <https://doi.org/10.3390/molecules25204729>
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., & Nakahara, H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends in Neurosciences*, 26(7), 360–368. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00162-0](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00162-0)
- Kawakita, E., Hashimoto, M., & Shido, O. (2006). *DOCOSAHEXAENOIC ACID*

PROMOTES NEUROGENESIS IN VITRO AND IN VIVO. 139, 991–997.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.01.021>

- Kiernan & Rajakumar (2013). Kiernan, J.A., y Rajakumar, R.B. (2013). *The human nervous system. An anatomical viewpoint*. Baltimore: Lippincott Williams y Wilkins.
- Kim, H.-Y., Akbar, M., & Kim, K.-Y. (2001). Inhibition of Neuronal Apoptosis by Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Molecular Neuroscience*, 16(2–3), 223–228. <https://doi.org/10.1385/JMN:16:2-3:223>
- Kimura, I., Ichimura, A., Ohue-Kitano, R., & Igarashi, M. (2020). Free fatty acid receptors in health and disease. *Physiological Reviews*, 100(1), 171–210. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2018>
- Lanoue, V., & Cooper, H. M. (2019). Branching mechanisms shaping dendrite architecture. *Developmental Biology*, 451(1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.12.005>
- Li, J., Pora, B. L. R., Dong, K., & Hasjim, J. (2021). Health benefits of docosahexaenoic acid and its bioavailability: A review. *Food Science and Nutrition*, 9(9), 5229–5243. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2299>
- Lu, B., Greengard, P., & Poo, M. ming. (1992). Exogenous synapsin I promotes functional maturation of developing neuromuscular synapses. *Neuron*, 8(3), 521–529. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90280-Q](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90280-Q)
- Ma, D., Zhang, M., Larsen, C. P., Xu, F., Hua, W., Yamashima, T., ... Zhou, L. (2010). DHA promotes the neuronal differentiation of rat neural stem cells transfected with GPR40 gene. *Brain Research*, 1330, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.002>
- Marshall, T. A. (2011). Dietary guidelines for Americans, 2010: An update. *Journal of the American Dental Association*, 142(6), 654–656. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2011.0248>
- Martínez, M., & Mougan, I. (1998). Fatty acid composition of human brain phospholipids during normal development. *Journal of Neurochemistry*, 71(6), 2528–2533. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9832152>
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429(6993), 761–766. <https://doi.org/10.1038/nature02617>
- Mazzocchi-Jones, D. (2015). Impaired corticostriatal LTP and depotentiation

following iPLA2 inhibition is restored following acute application of DHA. *Brain Research Bulletin*, 111, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2014.12.010>

- Mita, T., Mayanagi, T., Ichijo, H., Fukumoto, K., Otsuka, K., Sakai, A., & Sobue, K. (2016). Docosahexaenoic acid promotes axon outgrowth by translational regulation of tau and collapsin response mediator protein 2 expression. *Journal of Biological Chemistry*, 291(10), 4955–4965. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.693499>
- Montero, M. L., Liu, J. W., Orozco, J., Casiano, C. A., & De Leon, M. (2020). Docosahexaenoic acid protection against palmitic acid-induced lipotoxicity in NGF-differentiated PC12 cells involves enhancement of autophagy and inhibition of apoptosis and necroptosis. *Journal of Neurochemistry*, 155(5), 559–576. <https://doi.org/10.1111/jnc.15038>
- Mosteiro, M. del C. (2009). *Guías alimentarias para la población infantil*. 1–50.
- Murai, K. K., & Pasquale, E. B. (2004). Eph receptors, ephrins, and synaptic function. *Neuroscientist*, 10(4), 304–314. <https://doi.org/10.1177/1073858403262221>
- Nakamichi, N., Matsumoto, Y., Kawanishi, T., Ishimoto, T., Masuo, Y., Horikawa, M., & Kato, Y. (2019). Maturation characterization of mouse cortical neurons three-dimensionally cultured in functional polymer FP001-containing medium. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 42(9), 1545–1553. <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00307>
- Nakamoto, K., Nishinaka, T., Matsumoto, K., Kasuya, F., Mankura, M., Koyama, Y., & Tokuyama, S. (2012). Involvement of the long-chain fatty acid receptor GPR40 as a novel pain regulatory system. *Brain Research*, 1432, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.11.012>
- Nishinaka, T., Yamashita, T., Nakamoto, K., Kasuya, F., & Tokuyama, S. (2014). Involvement of the Long-Chain Fatty Acid Receptor GPR40 in Depression-Related Behavior. *Journal of Pharmacological Sciences*, 125(1), 112–115. <https://doi.org/10.1254/jphs.14001sc>
- Novak, E. M., Dyer, R. A., & Innis, S. M. (2008). High dietary ω -6 fatty acids contribute to reduced docosahexaenoic acid in the developing brain and inhibit secondary neurite growth. *Brain Research*, 1237, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.07.107>
- Offermanns, S. (2014). Free Fatty Acid (FFA) and Hydroxy Carboxylic Acid (HCA) Receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54(1), 407–434.

<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135945>

- Pan, Y., Khalil, H., & Nicolazzo, J. (2015). The Impact of Docosahexaenoic Acid on Alzheimer's Disease: Is There a Role of the Blood-Brain Barrier? *Current Clinical Pharmacology*, 10(3), 222–241. <https://doi.org/10.2174/157488471003150820151532>
- Petzoldt, A. G., & Sigrist, S. J. (2014). Synaptogenesis. *Current Biology*, 24(22), R1076–R1080. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.024>
- Rösner, H., Möller, W., Wassermann, T., Mihatsch, J., & Blum, M. (2007). Attenuation of actinomyosinII contractile activity in growth cones accelerates filopodia-guided and microtubule-based neurite elongation. *Brain Research*, 1176(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.07.081>
- Sáez-Orellana, F., Fuentes-Fuentes, M. C., Godoy, P. A., Silva-Grecchi, T., Panes, J. D., Guzmán, L., ... Fuentealba, J. (2018). P2X receptor overexpression induced by soluble oligomers of amyloid beta peptide potentiates synaptic failure and neuronal dyshomeostasis in cellular models of Alzheimer's disease. In *Neuropharmacology* (Vol. 128). <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.10.027>
- Sakamoto, T., Cansev, M., & Wurtman, R. J. (2007). Oral supplementation with docosahexaenoic acid and uridine-5 ' -monophosphate increases dendritic spine density in adult gerbil hippocampus. 82. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.08.089>
- Sakayori, N., Maekawa, M., Numayama-tsuruta, K., & Katura, T. (2011). Distinctive effects of arachidonic acid and docosahexaenoic acid on neural stem/progenitor cells. 778–790. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2011.01527.x>
- Salazar, K., Martínez, M., Ulloa, V., Bertinat, R., Martínez, F., Jara, N., ... Nualart, F. (2016). SVCT2 Overexpression in Neuroblastoma Cells Induces Cellular Branching that is Associated with ERK Signaling. *Molecular Neurobiology*, 53(10), 6668–6679. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9553-z>
- Schröder, R., Schmidt, J., Blättermann, S., Peters, L., Janssen, N., Grundmann, M., ... Kostenis, E. (2011). Applying label-free dynamic mass redistribution technology to frame signaling of G protein-coupled receptors noninvasively in living cells. *Nature Protocols*, 6(11), 1748–1760. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.386>
- Scorcioni, R., Polavaram, S., & Ascoli, G. A. (2008). L-Measure: A web-accessible tool for the analysis, comparison and search of digital reconstructions of neuronal

morphologies. *Nature Protocols*, 3(5), 866–876.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.51>

- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*, 106–107, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>
- Shapiro, H., Shachar, S., Sekler, I., Hershfinkel, M., & Walker, M. D. (2005). Role of GPR40 in fatty acid action on the β cell line INS-1E. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335(1), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.042>
- Shaywitz, A. J., & Greenberg, M. E. (1999). CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 821–861. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.821>
- Shen, K., & Cowan, C. W. (2010). Guidance molecules in synapse formation and plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001842>
- SHOLL, D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *Journal of Anatomy*, 87(4), 387–406. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13117757><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1244622>
- Sidhu, V. K., Huang, B. X., Desai, A., Kevala, K., & Kim, H. Y. (2016). Role of DHA in aging-related changes in mouse brain synaptic plasma membrane proteome. *Neurobiology of Aging*, 41, 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.007>
- Sidhu, V. K., Huang, B. X., & Kim, H.-Y. (2011). Effects of Docosahexaenoic Acid on Mouse Brain Synaptic Plasma Membrane Proteome Analyzed by Mass Spectrometry and $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ Labeling. *Journal of Proteome Research*, 10(12), 5472–5480. <https://doi.org/10.1021/pr2007285>
- Silbereis, J. C., Pochareddy, S., Zhu, Y., Li, M., & Sestan, N. (2016). The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. *Neuron*, 89(2), 248. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.008>
- Srikanth, M., Chandrasaharan, K., Zhao, X., Chayaburakul, K., Ong, W. Y., & Herr, D. R. (2018). Metabolism of Docosahexaenoic Acid (DHA) Induces Pyroptosis in BV-

2 Microglial Cells. *NeuroMolecular Medicine*, 20(4), 504–514.
<https://doi.org/10.1007/s12017-018-8511-0>

- Srivastava, A., Yano, J., Hirozane, Y., Kefala, G., Gruswitz, F., Snell, G., ... Okada, K. (2014). High-resolution structure of the human GPR40 receptor bound to allosteric agonist TAK-875. *Nature*, 513(7516), 124–127. <https://doi.org/10.1038/nature13494>
- Stoddart, L. A., Brown, A. J., & Milligan, G. (2007). Uncovering the pharmacology of the G protein-coupled receptor GPR40: High apparent constitutive activity in guanosine 5'-O-(3-[35S]thio) triphosphate binding studies reflects binding of an endogenous agonist. *Molecular Pharmacology*, 71(4), 994–1005. <https://doi.org/10.1124/mol.106.031534>
- Stout, K. A., Dunn, A. R., Hoffman, C., & Miller, G. W. (2019). The Synaptic Vesicle Glycoprotein 2: Structure, Function, and Disease Relevance. *ACS Chemical Neuroscience*, 10(9), 3927–3938. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.9b00351>
- Südhöf, T. C., Czernik, A. J., Kao, H. T., Takei, K., Johnston, P. A., Horiuchi, A., ... Greengard, P. (1989). Synapsins: Mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. *Science*, 245(4925), 1474–1480. <https://doi.org/10.1126/science.2506642>
- Takeuchi, T., Iwanaga, M., & Harada, E. (2003). Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. *Brain Research*, 964(1), 136–143. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04113-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04113-6)
- Tang, M., Zhang, M., Wang, L., Li, H., Cai, H., Dang, R., ... Wu, Y. (2018). Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids Maternal dietary of n-3 polyunsaturated fatty acids affects the neurogenesis and neurochemical in female rat at weaning. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 128(November 2017), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.11.001>
- Tao, G., Luo, Y., Xue, Q., Li, G., Tan, Y., Xiao, J., & Yu, B. (2016). Docosahexaenoic Acid Rescues Synaptogenesis Impairment and Long-Term Memory Deficits Caused by Postnatal Multiple Sevoflurane Exposures. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4062579>
- Tönnies, E., & Trushina, E. (2017). Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and

Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4), 1105–1121.
<https://doi.org/10.3233/JAD-161088>

- Torres, P., Cacabelos, D., Pairada, J., Bauer, K. C., Boada, J., Fontdevila, L., ... Ayala, V. (2020). Gender-Specific Beneficial Effects of Docosahexaenoic Acid Dietary Supplementation in G93A-SOD1 Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice. *Neurotherapeutics*, 17(1), 269–281. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00808-2>
- Uauy, R., & Dangour, A. D. (2006). Nutrition in brain development and aging: Role of essential fatty acids. *Nutrition Reviews*, 64(5 SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1301/nr.2006.may.S24-S33>
- Valenzuela B, R., Morales P, J., Sanhueza C, J., & Valenzuela B, A. (2013). Ácido docosahexaenoico (DHA), un ácido graso esencial a nivel cerebral. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(4), 383–390. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182013000400009>
- Valiente, M., & Marín, O. (2010). Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 20(1), 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.12.003>
- Waites, C. L., Craig, A. M., & Garner, C. C. (2005). Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annual Review of Neuroscience*, 28, 251–274. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144336>
- Wu, Y., Tada, M., Takahata, K., Tomizawa, K., & Matsui, H. (2007). Inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on apoptosis induced by etoposide, okadaic acid and AraC in Neuro2a cells. *Acta Medica Okayama*, 61(3), 147–152. <https://doi.org/10.18926/AMO/32903>
- Xavier, A. L., Menezes, J. R. L., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2014). Fine-tuning the central nervous system: Microglial modelling of cells and synapses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1654). <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0593>
- Yamashima, T. (2008). A putative link of PUFA, GPR40 and adult-born hippocampal neurons for memory. *Progress in Neurobiology*, 84(2), 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.11.002>
- Zhao, W., Hylton, N. K., Wang, J., & Chindavong, P. S. (2019). Molecular and Cellular Neuroscience Activation of WNT and CREB signaling pathways in human neuronal cells in response to the Omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid (DHA). *Molecular and Cellular Neuroscience*, 99(June), 103386.

<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2019.06.006>

- Zhao, W. N., Hylton, N. K., Wang, J., Chindavong, P. S., Alural, B., Kurtser, I., ... Haggarty, S. J. (2019). Activation of WNT and CREB signaling pathways in human neuronal cells in response to the Omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid (DHA). *Molecular and Cellular Neuroscience*, 99(June). <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2019.06.006>
- Ziv, N. E., & Garner, C. C. (2004). Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(5), 385–399. <https://doi.org/10.1038/nrn1370>

