



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ACEITE DE ALGA RICO EN
OMEGA-3 EN LA RESPUESTA CONDUCTUAL Y
NEUROFISIOLÓGICA EN PARKINSONISMO EXPERIMENTAL EN
RATAS WISTAR**

TESIS

Que para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias en Alimentos

Presenta:

Alejandra Barroso Hernández

Asesores:

Rosa María Oliart Ros

Óscar López Franco

H. VERACRUZ, VER.

Junio 2020



"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

H. Veracruz, Veracruz, **05/diciembre/2019**
Div. Estudios de Posgrado e Investigación
OFICIO: ITV/DEPI/No.511/2019
Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

**C. ALEJANDRA BARROSO HERNÁNDEZ
PRESENTE**

Por este conducto se le comunica que su tesis de Doctorado en Ciencias en Alimentos titulada:

"Efecto de la suplementación de aceite de alga rico en omega-3 en la respuesta conductual y neurofisiológica en parkinsonismo experimental en ratas wistar"

Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
Antorcha y Luz de Fuego Permanente®

EL. H. JURADO


BENIGNO ORTIZ MUÑIZ
JEFE DE LA DIV. EST. POSG. E INVEST.

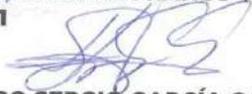

DRA. ROSA MARÍA OLIART ROS
PRESIDENTE



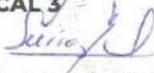

DR. VÍCTOR JOSÉ ROBLES OLVERA
SECRETARIO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN


DR. ÓSCAR LÓPEZ FRANCO
VOCAL 1


DR. HUGO SERGIO GARCÍA GALINDO
VOCAL 2


DRA. PATRICIA G. MENDOZA GARCÍA
VOCAL 3


DRA. MIRNA LEONOR SUÁREZ QUIROZ
SUPLENTE 1

c. p. Expediente del Estudiante
Archivo



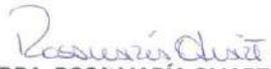


"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

El presente trabajo de tesis titulado: **"Efecto de la suplementación de aceite de alga rico en omega-3 en la respuesta conductual y neurofisiológica en parkinsonismo experimental en ratas wistar"** presentado por el (la) C. **Alejandra Barroso Hernández** ha sido aprobado por su comité tutorial como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

DIRECTORA


DRA. ROSA MARÍA OLIART ROS

CO-DIRECTOR


DR. ÓSCAR LÓPEZ FRANCO

REVISOR


DR. VÍCTOR JOSÉ ROBLES OLVERA

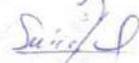
REVISOR


DR. HUGO SERGIO GARCÍA GALINDO

REVISOR


DRA. PATRICIA G. MENDOZA GARCÍA

REVISOR


DRA. MIRNA LEONOR SUÁREZ QUIROZ

BOM*



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar
C.P. 91897, Veracruz, Ver. Tel. (229) 934 1500
www.veracruz.tecnm.mx



**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ACEITE DE ALGA RICO EN
OMEGA-3 EN LA RESPUESTA CONDUCTUAL Y
NEUROFISIOLÓGICA EN PARKINSONISMO EXPERIMENTAL EN
RATAS WISTAR**

Por:

Alejandra Barroso Hernández

Trabajo de tesis propuesto a la

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN ALIMENTOS
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ**

Como requisito parcial para
obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

Junio 2020

H. Veracruz, Ver., México

RECONOCIMIENTOS

A mis asesores la **Dra. Rosa María Oliart Ros** y el **Dr. Óscar López Franco**, por el inmenso apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A los miembros de mi comité revisor, **Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz**, **Dra. Patricia Mendoza García**, **Dr. Hugo Sergio García Galindo** y el **Dr. Víctor José Robles Galindo**, por el tiempo dedicado a la revisión y a las sugerencias que lograron el enriquecimiento de este trabajo.

A los profesores-investigadores de la **Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA)**.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por haber proporcionado el financiamiento para la realización de mis estudios de Doctorado.

RESUMEN

Barroso Hernández, Alejandra. Doctorado en Ciencias en Alimentos. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ACEITE DE ALGA RICO EN OMEGA-3 EN LA RESPUESTA CONDUCTUAL Y NEUROFISIOLÓGICA EN PARKINSONISMO EXPERIMENTAL EN RATAS WISTAR. Asesores: Dra. Rosa María Oliart Ros, Dr. Óscar López Franco.

El parkinsonismo es un trastorno con características y síntomas similares a la enfermedad de Parkinson (EP). Se produce cuando las células nerviosas de la *substantia nigra* mueren o sufren algún deterioro. Existen modelos murinos experimentales de parkinsonismo, como el inducido por la administración de haloperidol. La deficiencia de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 está asociada con enfermedades del sistema nervioso central y en las funciones cerebrales. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación con aceite de alga rico en omega-3 (SAA) en la respuesta conductual y fisiológica en un modelo murino de parkinsonismo experimental inducido por haloperidol (H). Se utilizaron dos modelos experimentales: administración del SSA al mismo tiempo que el H (14 días) (co-suplementación), y administración del SAA seis semanas previas a la inducción con H (pre-suplementación). El efecto se estudió a nivel de conductas (horizontal, vertical e inmovilidad) y actividad motriz, mediante la prueba de campo abierto. La administración de H provocó una disminución en la actividad motriz (0-20 vs 60-110 cuadros cruzados), y la pre-suplementación con SAA atenuó el efecto (20-40 cuadros). El haloperidol provocó una disminución significativa en el tiempo que las ratas pasaron en posición vertical y horizontal, y aumentó el tiempo en inmovilidad (250 seg vs 2 seg en el testigo), y la pre-suplementación atenuó el efecto del H. La pre-suplementación con SAA provocó un aumento de ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) en el tejido cerebral, en comparación con el grupo co-suplementado. La pre-suplementación de SAA evitó el aumento en la expresión de receptores de dopamina D₂ observado con la administración de H, coincidiendo con una disminución en la densidad de receptores en el grupo H, por pérdida de los receptores de D₂ debido al estrés oxidativo promovido por el haloperidol. En conclusión, la pre-suplementación con aceite de alga rico en omega-3 en el modelo de parkinsonismo, previno parcialmente el deterioro inducido por el H, debido a los efectos benéficos de los AGPI omega-3 sobre la degeneración neuronal de las células dopaminérgicas.

ABSTRACT

Barroso Hernández Alejandra. Doctorate in Food Science. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. EFFECT OF THE SUPPLEMENTATION OF RICH ALGAE OIL IN OMEGA-3 IN THE BEHAVIORAL AND NEUROPHYSIOLOGICAL RESPONSE IN EXPERIMENTAL PARKINSONISM IN WISTAR RATS. Advisors: PhD. Rosa María Oliart Ros, PhD. Óscar López Franco.

Parkinsonism is a disorder with characteristics and symptoms similar to Parkinson's disease (PD). It occurs when nerve cells of the *substantia nigra* die or suffer some deterioration. There are experimental murine models of parkinsonism, such as that induced by the administration of haloperidol. Omega-3 polyunsaturated fatty acid deficiency is associated with diseases of the central nervous system and brain functions. The objective of the study was to evaluate the effect of a supplementation with an omega-3-rich algae oil (SAA) on behavioral and physiological response in a murine model of experimental parkinsonism induced by haloperidol (H). Two experimental models were used: administration of SSA at the same time as H (14 days) (co-supplementation), and administration of SAA six weeks before the induction with H (pre-supplementation). The effect was studied at the level of behavior (horizontal, vertical and immobility) and motor activity, through the open field test. The administration of H caused a decrease in motor activity (0-20 vs 60-110 crossed frames in the control group), and pre-supplementation with SAA attenuated the effect (20-40 frames). Haloperidol caused a significant decrease in the time rats spent in vertical and horizontal position, and the time in immobility (250 sec vs. 2 sec in the control), and pre-supplementation attenuated the effect of H. Pre-supplementation with SAA caused an increase in omega-3 fatty acids (DPA and DHA) in the brain, compared to the co-supplemented group. The pre-supplementation of SAA prevented the increase in the expression of dopamine D₂ receptors observed with the administration of H, coinciding with a decrease in the density of receptors in group H, due to the loss of D₂ receptors caused by the oxidative stress promoted by haloperidol. In conclusion, pre-supplementation with omega-3-rich algae oil in the parkinsonism rat model partially prevented the deterioration induced by haloperidol, due to the beneficial effects of omega-3 PUFAs on the neuronal degeneration of dopaminergic cells.

CONTENIDO

	Pág.
RECONOCIMIENTOS	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Enfermedad de Parkinson	3
2.2 La dopamina	5
2.2.1 Almacenamiento y liberación de la dopamina.	6
2.2.2 Recaptación de la dopamina.	7
2.3 Vías dopaminérgicas	8
2.4 Receptores dopaminérgicos	10
2.4.1 Clasificación de los receptores dopaminérgicos.....	11
2.4.2 Estructura del receptor dopaminérgico.....	12
2.4.3 Familia D ₂	13
2.5 Modelos murinos de manipulación dopaminérgica para el estudio de la EP	15
2.6 Modelo de parkinsonismo	16
2.7 Ácidos grasos	17
2.7.1 Ácidos grasos poliinsaturados esenciales.	18
2.7.2 DHA.....	20
2.7.3 Ácidos grasos esenciales en la función cerebral.....	23
2.8 Relación de los ácidos grasos omega-3 con la Enfermedad de Parkinson	25
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo general	35
4.2 Objetivos específicos	35
5. METODOLOGÍA	36

5.1 Animales de experimentación.	36
5.2 Modelo inducido experimentalmente.	36
5.2.1 Administración del aceite de alga rico en omega-3 sobre el modelo de parkinsonismo.....	37
5.3 Peso Corporal.	41
5.3.1 Disección de tejido adiposo.....	41
5.4 Prueba de campo abierto.	41
5.4.1 Registros de conductas de la prueba de campo abierto.	42
5.5 Registro del temblor mandibular.	43
5.6 Extracción de lípidos.	44
5.7 Composición de ácidos grasos de los lípidos extraídos.	44
5.7.1 Metilación de ácidos grasos.	45
5.7.2 Ánalysis de la composición de ésteres metílicos mediante GC-MS.	45
5.8 Extracción de RNA total.	46
5.8.1 Precipitación del RNA.	46
5.8.2 Lavado del RNA.	46
5.8.3 Concentración y calidad del RNA.....	47
5.8.4 Purificación de RNA y síntesis de cDNA.	47
5.9 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRT-PCR)	48
5.9.1 Determinación de los niveles de expresión del receptor D ₂	48
5.10 Extracción de proteínas.	49
5.10.1 Cuantificación de proteínas.....	50
5.11 Análisis de la densidad de receptores D₂.	50
5.12 Análisis estadístico.	51
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
6.1 Cuidados y alimentación	52
6.2 Peso corporal.	53
6.3. Temblores mandibulares.	55
6.4 Prueba de campo abierto.	56
6.4.1 Prueba de campo abierto: conducta vertical.	56
6.4.2 Prueba de campo abierto: conducta horizontal.	59
6.4.3 Prueba de campo abierto: tiempo total de inmovilidad de la rata.	61
6.4.4 Frecuencia de campo abierto: número de cuadros cruzados.....	63
6.5 Perfil de ácidos grasos del cerebro.	66

6.5.1 Composición de ácidos grasos del suplemento de aceite de alga.	66
6.5.3 Perfil de ácidos grasos del cerebro de las ratas de los grupos experimentales.	67
6.6 Efecto de los tratamientos sobre la densidad de los receptores de dopamina D₂ y los niveles de expresión de su gen, en el cerebro medio de las ratas.	72
6.6.1 Análisis de la densidad del receptor D ₂ en tejido cerebral medio (VTA) mediante Western Blot.	72
6.6.2. Expresión relativa del gen del receptor D ₂ en el tejido cerebral medio.	75
7. CONCLUSIONES	81
8. RECOMENDACIONES	82
9. REFERENCIAS.....	83
10. ANEXOS.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1. Síntesis de la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina.	6
Figura 2.2. Neurotrasmisión dopaminérgica.	7
Figura 2.3. Vías dopaminérgicas.	9
Figura 2.4. Estructura de los receptores dopaminérgicos.	13
Figura 2.5. Estructura química de los ácidos grasos esenciales: ácido alfa-linolénico y ácido linoléico.	18
Figura 2.6. Familia de ácidos grasos poliinsaturados esenciales.	20
Figura 2.7. Diferentes representaciones de la estructura del DHA.	21
Figura 5.1. Inyección intraperitoneal de haloperidol (1.5 mg/kg/día).	37
Figura 5.2. Estrategias experimentales implementadas en el trabajo.	39
Figura 5.3. Administración de aceite de alga rico en omega-3 (SAA) vía intragastrica (300 mg/kg/día).	40
Figura 5.4. Prueba de campo abierto. Caja de acrílico con el piso dividido en 12 cuadros.	42
Figura 5.5. Programa para registro de actividad locomotriz de mediante la prueba de campo abierto.	43
Figura 6.1. Consumo de alimento en promedio por día por grupo Ps: grupo pre-suplementado; Co: grupo co-suplementado.	52
Figura 6.2. Promedio del peso corporal por semana de cada grupo experimental (Pre y Co-suplementados), de la semana uno a la ocho.	53
Figura 6.3. Peso total del tejido adiposo (epididimal, intercostal y visceral).	54
Figura 6.4. Número de rafagas mandibulares por minuto.	55
Figura 6.5. Porcentaje de tiempo transcurrido en posición vertical respecto al testigo (T=100 %), durante la prueba de campo abierto.	58
Figura 6.6. Porcentaje de la conducta horizontal durante la prueba de campo abierto de todos los grupos por cada sesión, los valores expresados como media \pm desviación estándar (SE).	60

Figura 6.7.	Tiempo total (s) de inmovilidad durante la prueba de campo abierto de todos los grupos por cada sesión, los valores fueron expresados como media \pm desviación estándar (SE).	62
Figura 6.8.	Número de cuadros cruzados durante la prueba de campo abierto.	64
Figura 6.9.	Representación de western blot de la densidad del receptor de dopamina D ₂ de los grupos experimentales pre-suplementados y co-suplementados del tejido medio cerebral (VTA).	73
Figura 6.10.	Área relativa del receptor de dopamina D ₂ respecto a la proteína endógena α -tubulina, de cada grupo de ratas experimentales.	75
Figura 6.11.	Electroforesis en gel de agarosa del RNA extraído del cerebro de las ratas de los grupos pre-suplementado y co-suplementado.	76
Figura 6.12.	Expresión relativa del gen del receptor de dopamina D ₂ , respecto al gen endógeno β -actina, de cada grupo de ratas experimentales.	77
Figura 10.1.	Curva de eficiencia para β -actina	98
Figura 10.2.	Melt curve de la curva de eficiencia de β -actina.	98
Figura 10.3.	Curva de eficiencia para D ₂ .	99
Figura 10.4.	Melt curve de la curva de la eficiencia de D ₂ .	99
Figura 10.5.	Marcador molecular de proteína. Precision Plus Proteína™ Dual Xtra (#1610377).	102

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 6.1. Perfil de ácidos grasos del aceite de alga rico en omega-3 del suplemento Life's DHA™ S10-P200 de Grupo Harmony rico en omega-3.	67
Tabla 6.2. Perfil de ácidos grasos de la corteza frontal y occipital de los grupos experimentales de ratas Pre-suplementadas y Co-suplementadas.	69
Tabla 6.3. Pureza del RNA del grupo pre-suplementado y co-suplementado.	76
Tabla 10.1. Composición del suplemento de aceite de alga rico en omega-3.	104
Tabla 10.2. Perfil de ácidos grasos del alimento (croqueta).	105

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
AGEs	Ácidos grasos esenciales
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
ALA	Ácido alfa linolénico
AMP	Adenosin monofosfato cíclico
AA	Ácido araquidónico
AADC	Aminoácido aromático descarboxilasa
BDNF	Fáctor neurotrófico derivado del cerebro.
CAT	Catalasa
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
D ₁	Receptores a dopamina D ₁
D ₂	Receptores a dopamina D ₂
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DHA	Ácido docosahexaenoico
DPA	Ácido docosapentanoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EP	Enfermedad de Parkinson
EVL	Estriado ventrolateral
H	Haloperidol
HD	Enfermedad de Huntington
HVA	Ácido homovanílico
IP	Intraperitoneal
LCR	Líquido cefalorraquídeo
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina o levodopa
MAO	Monoaminoxidasa
MPTP	1-metil-4-fenil- 1,2,3,6 tetrahidropiridina
MS	Esclerosis múltiple

NA	Noradrenalina
NAc	Núcleo Acumbens
SAA	Suplemento de aceite de alga
SOD	Superóxido dismutasa
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SNpc	<i>Substantia nigra</i> pars compacta
SNr	<i>Substantia nigra</i> reticulada
TDHA	Trastorno de hiperactividad con déficit de atención
TH	Tirosina hidroxilasa
TM	Temblor mandibular
VTA	Área tegmental ventral

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden crónico y degenerativo relacionado con la edad, que afecta al 1-2% de las personas mayores de 60 ó 65 años. Se produce debido a la pérdida de neuronas de la *substantia nigra* del mesencéfalo, área cerebral que controla el movimiento, por lo cual hay una disminución progresiva de la capacidad para coordinar los movimientos. Estas células mueren o sufren algún deterioro, por lo que se produce una degeneración en los ganglios basales que ocasiona una pérdida o una interferencia en la acción de la dopamina y menos conexiones con otras células nerviosas y músculos. La causa de la degeneración de células nerviosas y de la pérdida de dopamina habitualmente no se conoce.

Existen modelos murinos experimentales de parkinsonismo, como el inducido por la administración de haloperidol, que provoca trastornos motores a través del bloqueo en los receptores dopaminérgicos, y es una buena aproximación para caracterizar neurofisiológica y conductualmente al temblor que presentan los pacientes con parkinsonismo.

Se ha reportado que la deficiencia de ácidos grasos omega-3 está asociada con enfermedades del sistema nervioso central (SNC) en las que está implicada la dopamina, y existen evidencias sobre su efecto neuroprotector y reparador. Esto ha generado interés por aclarar la participación de estos ácidos grasos en las funciones cerebrales como en la enfermedad de Parkinson. Particularmente, diversas investigaciones en el área de neuroquímica, histología, neurofisiología y de la conducta, han documentado que la presencia del ácido docosahexaenoico (DHA, omega-3) está asociada a un efecto neuroprotector, tanto en animales como en humanos. Sin embargo, poco se conoce sobre su implicación en el Parkinsonismo. Por lo tanto, resulta de gran interés analizar el efecto neuroprotector de los ácidos grasos omega-3 en un modelo de parkinsonismo experimental, como una estrategia no farmacológica de prevención y tratamiento de estas enfermedades.

En la rata, las alteraciones motoras inducidas farmacológicamente por la manipulación dopaminérgica, es una buena aproximación para caracterizar neurofisiológica y conductualmente al temblor que presentan los pacientes con parkinsonismo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación con aceite de alga rico en omega-3 en la respuesta conductual y fisiológica en un modelo murino de parkinsonismo experimental inducido por haloperidol. La suplementación se llevó a cabo de manera previa y simultánea a la administración del haloperidol, y el efecto se estudió a nivel de: conducta motora, número de receptores dopaminérgicos y expresión génica.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez por James Parkinson en 1817 (Parkinson, 1817); es un trastorno neurodegenerativo que se puede definir como un síndrome asociado con lesiones neuropatológicas específicas (Blum *et al.*, 2001). Clínicamente se considera una enfermedad idiopática, presentando alteraciones motoras, tales como la bradicinesia, temblor en reposo, rigidez y una pérdida de los reflejos posturales. Sin embargo, las características no motoras, tales como alteraciones en el sueño, trastornos del estado de ánimo, así como déficits cognitivos, también son componentes importantes de la expresión clínica de la EP (Goldam *et al.*, 2015; Xicoy *et al.*, 2019). La ocurrencia de este trastorno neurodegenerativo aumenta con la edad y se considera que afecta entre el 1-2% de la población después de 65 años. La media de aparición de esta enfermedad es de alrededor de 60 años, con una duración media de 13 años. Con menor frecuencia, la EP puede tener un inicio antes de los 40 años (Xicoy, *et al.*, 2019).

La principal característica patológica de la EP es una pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas, del 5% de células por año de la *substantia nigra* pars compacta (SNpc), una estructura del cerebro medio. La pérdida de neuronas de la *substantia nigra* es más común en la parte ventral de la SNpc. Esto da lugar a un agotamiento de la dopamina (DA) en el cuerpo estriado, responsable de los síntomas motores, especialmente la acinesia (Lee *et al.*, 1994).

Existe una fase subclínica antes de la aparición de parkinsonismo. Durante este periodo, pueden ocurrir fenómenos compensatorios estriatales (Anglade *et al.*, 1995), tales como aumento de la actividad neuronal o sensibilización de los receptores dopaminérgicos. Por lo tanto, la EP no es clínicamente evidente antes de la pérdida del 50% - 70% de las neuronas dopaminérgicas. Los primeros signos clínicos solo se

observan cuando la degeneración ya avanzó fuertemente, por ello se deduce que el inicio de la degeneración no se puede determinar. Por lo tanto, la etiología de la EP sigue siendo difícil de establecer con exactitud (Ishibashi *et al.*, 2014).

Actualmente no hay tratamiento curativo disponible para la EP y los pacientes encuentran alivio parcial para los síntomas motores con agentes farmacológicos, como levodopa. Sin embargo, el uso a largo plazo se asocia con complicaciones secundarias. Otros tratamientos sintomáticos también están disponibles, tales como los agonistas dopaminérgicos, pero con efectos secundarios (Goldam *et al.*, 2015).

La cirugía es otra estrategia utilizada, pero solo está indicada en casos muy puntuales. También se encuentra el tratamiento mediante el uso de injertos cerebrales, que consiste en introducir en la zona cerebral dañada un tipo de células que detienen y reducen la lesión de los tejidos (Strömberg *et al.*, 2010).

Como se ha visto, hay tratamientos sintomáticos eficaces, pero su uso prolongado tiene efectos secundarios, y aún no hay un tratamiento que frene de manera evidente la progresión de la enfermedad, por lo que es importante la investigación de nuevas estrategias terapéuticas que puedan cambiar la evolución del trastorno (Micheli, 2006).

Los avances en la neurociencia molecular sugieren que la degeneración neuronal puede ser detenida a través de estrategias neuroprotectoras específicas. Sin embargo, solo se alcanzará este paso si se comprenden mejor las vías moleculares de la muerte de las células neuronales involucradas en la EP. Por lo tanto, los modelos *in vivo* o *in vitro* utilizando neurotoxinas o fármacos experimentales son esenciales ya que permiten el estudio de los procesos degenerativos, así como nuevos enfoques terapéuticos (Insua *et al.*, 2003; Joardar *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2012).

2.2 La dopamina.

La dopamina (DA) es una catecolamina intermediaria en la biosíntesis de la noradrenalina y adrenalina, así como un importante neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico (Missale *et al.*, 1998). Tiene una variada participación en funciones como la conducta motora, la memoria, la cognición, el mecanismo de la recompensa, la emotividad, la afectividad, así como en la comunicación neuroendócrina. Varias enfermedades han sido relacionadas con la alteración de la transmisión de DA, como los trastornos neuropsiquiátricos, el trastorno de hiperactividad con déficit de atención (TDHA), esquizofrenia, psicosis, depresión, y con otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (HD) y esclerosis múltiple (MS) (Barajas *et al.*, 2015). La dopamina es sintetizada en las terminales nerviosas dopaminérgicas a partir de su aminoácido precursor, la tirosina, por medio de una serie de reacciones catalizadas por enzimas. La mayor parte de la tirosina se obtiene de la dieta; también puede sintetizarse una proporción pequeña en el hígado derivándola de la fenilalanina. La primera etapa de la síntesis de dopamina es la hidroxilación de la tirosina por la enzima tirosina hidroxilasa (TH) a L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina o levodopa) por medio de la oxidación de la posición 3 del anillo benceno, seguida por una descarboxilación mediante la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) que da origen a la dopamina (DA), que sufre una hidroxilación por la enzima dopamina β -hidroxilasa en el carbono beta de la cadena lateral, para dar origen a la noradrenalina (NA) (Figura 2.1). En las neuronas dopaminérgicas, el producto final de la síntesis de catecolaminas es la DA (Bahena *et al.*, 2000).

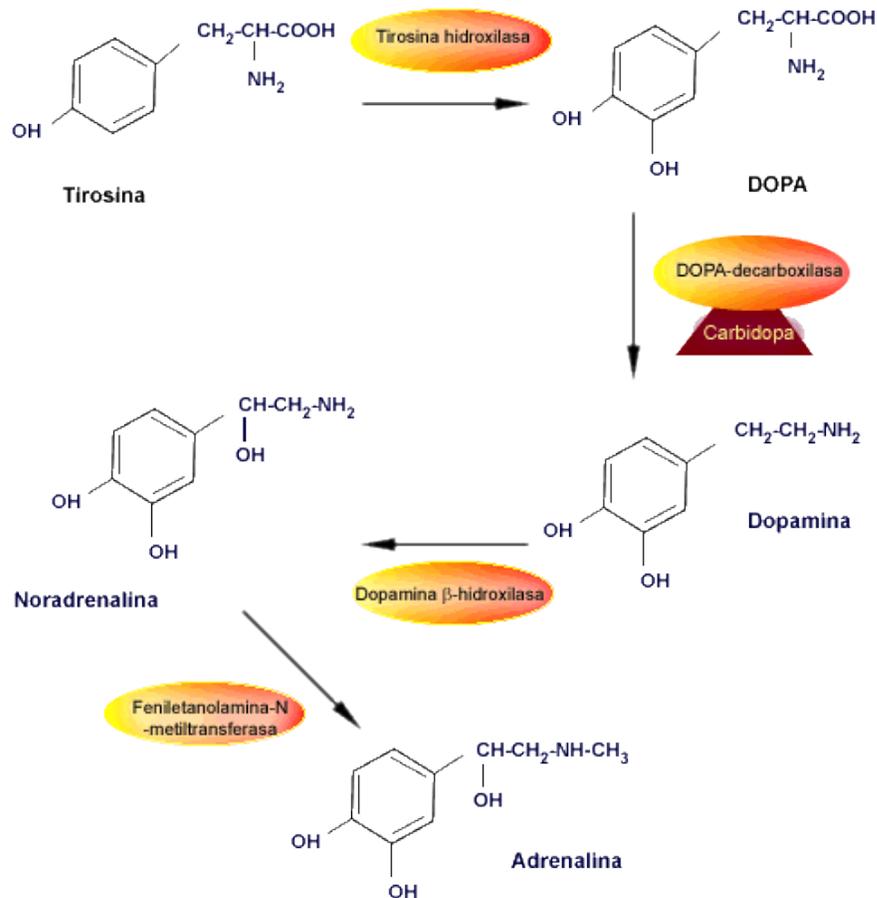


Figura 2.1 Síntesis de la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina (tomada de <http://odeqiful0a.changeip.com/Adrenalina-Bioquim.html>).

2.2.1 Almacenamiento y liberación de la dopamina.

La DA se sintetiza a partir de la tirosina del citoplasma neuronal, y luego se transporta a vesículas secretoras en las que se almacena y de las que se libera (Figura 2.2). Para transportar la DA a las vesículas sinápticas hacen falta dos bombas moleculares independientes. Una ATPasa de protones que concentra los protones en la vesícula, con lo que crea un gradiente electroquímico caracterizado por un pH intravesicular bajo (concentración de protones elevada) y electropositivo. Este gradiente lo aprovecha un antiportador de protones, el transportador vesicular de monoaminas (VMAT), que permite a los protones desplazarse a favor del

gradiente (fuera de la vesícula), a la vez que transporta simultáneamente la DA al interior en contra del gradiente de concentración. Cuando se estimula la neurona, las vesículas de almacenamiento de DA se fusionan con la membrana plasmática de una forma dependiente del Ca^{2+} , con lo que se libera DA en la hendidura sináptica. En la hendidura, la DA puede unirse tanto a los receptores de DA postsinápticos como a los autorreceptores de DA presinápticos (Missale *et al.*, 1998; Bahena *et al.*, 2000).

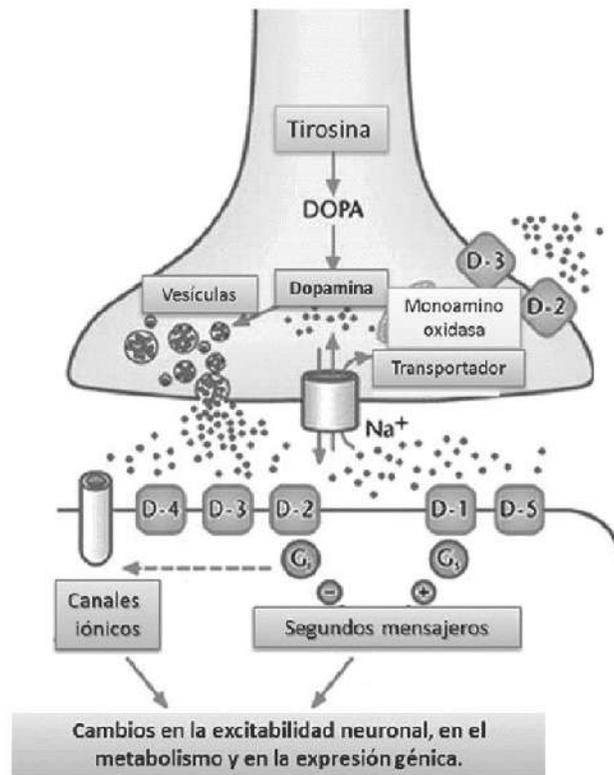


Figura 2.2. Neurotrasmisión dopaminérgica.
 (Tomada de https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Almacenamiento-liberacion-recaptura-y-procesamiento-de-la-dopamina_fig10_233764315).

2.2.2 Recaptación de la dopamina.

El mecanismo principal para la terminación de la transmisión sináptica en el SNC son los transportadores. Una vez liberada al espacio sináptico, la dopamina se une a

receptores pre y postsinápticos. Aunque existen enzimas extraneuronales que la catabolizan, la terminación del efecto del neurotransmisor se debe principalmente a la captura de este por las propias terminales nerviosas que la liberaron. Varios mecanismos retiran la DA del espacio sináptico y ponen fin a la señalización. La mayor parte de la DA liberada en la hendidura sináptica se transporta de vuelta a la célula presináptica mediante una proteína con 12 dominios transmembrana, el transportador de dopamina (DAT). La recaptación de DA supone el transporte del neurotransmisor en contra de su gradiente de concentración, por lo que se necesita una fuente de energía. Por esto, el DAT acopla la recaptación de DA con el cotransporte de Na^+ a favor de su gradiente de concentración en la célula. Tanto el Na^+ como el Cl^- se contrasportan con la DA a la célula. Como el gradiente de Na^+ se mantiene mediante la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, la recaptación de DA depende indirectamente de la presencia de una bomba de Na^+/K^+ en funcionamiento. La DA captada en la célula presináptica puede reciclarse en vesículas, de forma que se pueda aprovechar en la neurotransmisión, o bien puede degradarse en reacciones que catalizan las enzimas monoaminoxidasa (MAO) o catecol-O-metiltransferasa (COMT) (Bahena *et al.*, 2000).

La DA sináptica que no llegó a captarse en la célula presináptica puede difundirse fuera de la hendidura sináptica o bien degradarse por el efecto de la COMT. Ésta se expresa en el cerebro, el hígado, el riñón y el corazón; inactiva las catecolaminas añadiendo un grupo metilo al grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo de benceno. En el SNC, la COMT se expresa principalmente en las neuronas. Como resultado del COMT y la MAO, la DA se degrada al metabolito estable ácido homovanílico (HVA), que se excreta en la orina (Bahena *et al.*, 2000).

2.3 Vías dopaminérgicas.

El sistema dopaminérgico en el cerebro cobró importancia a partir de las investigaciones sobre la EP, que, como ya se mencionó, es el resultado de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* pars compacta

(SNpc). Hay tres vías principales de la DA en el SNC: la vía nigroestriada, la vía mesocortical y la vía mesolímbica, todas involucradas en diferentes características neurofisiológicas (Figura 2.3) (Missale *et al.*, 1998; Barajas *et al.*, 2015).

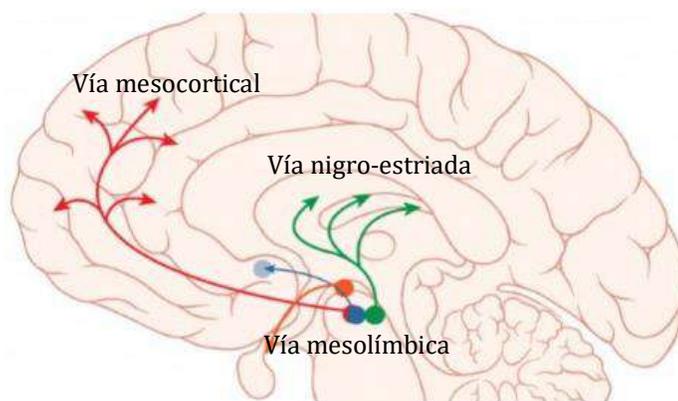


Figura 2.3. Vías dopaminérgicas (Tomada de Mendez *et al.*, 2017).

La vía dopaminérgica principal del cerebro es el sistema nigroestriado, que contiene cerca del 80% de la DA del cerebro. Esta vía se relaciona con la función motora, la SNpc envía su señal para el cuerpo estriado dorsal y regula, a través de la liberación de DA y sus receptores, la actividad de las redes de los ganglios basales. Su degeneración provoca las anomalías en los movimientos característicos de la enfermedad de Parkinson (Missale *et al.*, 1998).

En posición media con respecto a la *substantia nigra* hay una zona de somas dopaminérgicos en el mesencéfalo denominada área tegmental ventral (VTA). En la vía mesocortical y mesolímbica, el ATV tiene proyecciones divergentes que inervan muchas zonas del prosencéfalo, principalmente la corteza cerebral, el estriado o núcleo accumbens (NAc), la amígdala, el bulbo olfatorio, el hipocampo, vías que están relacionadas con la función cognitiva, la motivación y la emoción. Es posible que las alteraciones de estas vías sea el origen de la esquizofrenia (Missale *et al.*, 1998).

El sistema dopaminérgico se caracteriza por la presencia de neuronas que sintetizan y liberan dopamina, en las cuales coexiste un transportador de dopamina, además de receptores selectivos en las células en donde la dopamina produce diferentes efectos fisiológicos. Las diversas acciones de la DA se realizan a través de cinco subtipos de receptores de membrana acoplada al sistema de proteínas G, expresados en las células blanco (Jackson *et al.*, 1994, Missale *et al.*, 1998). Los receptores dopaminérgicos descritos han sido localizados simultáneamente en las terminales nerviosas (presinápticos) y en las membranas de diversas células blanco (postsinápticos) (Missale *et al.*, 1998).

La transmisión dopaminérgica en el sistema nervioso central (SNC) ha sido bien caracterizada y está involucrada en varias funciones, como en las cognitivas, el control de la locomoción, en las emociones y afecto, así como en la secreción neuroendócrina (Missale *et al.*, 1998). También hay evidencia de que la DA en el sistema nervioso periférico (SNP) se secreta en algunos tejidos y puede ser detectada en sangre, así como se ha registrado la presencia de receptores DA en diversos tejidos (Jose *et al.*, 1998).

Una alteración en cualquiera de estos sistemas dopaminérgicos puede provocar una enfermedad, como la enfermedad de Parkinson, que se debe a una desregulación de la neurotransmisión con DA (Barajas *et al.*, 2015).

2.4 Receptores dopaminérgicos.

Los receptores se definen como moléculas o arreglos moleculares que pueden reconocer selectivamente a un ligando (agonista o antagonista) y ser activados por el ligando con eficacia intrínseca (agonista) para iniciar un evento celular (Bahena *et al.*, 2000).

Los receptores de DA pertenecen a la familia de las proteínas receptoras acopladas a proteínas G, las cuales están expuestas a la superficie extracelular de la membrana plasmática, atraviesan la membrana y tienen regiones intracelulares que

activan una clase única de moléculas de señalización llamadas proteínas G. Este mecanismo de señalización interviene en muchos procesos importantes, entre ellos la vista, el olfato y la neurotransmisión. Una de las funciones principales de las proteínas G consiste en activar la producción de segundos mensajeros (Bahena *et al.*, 2000; Barajas *et al.*, 2015).

2.4.1 Clasificación de los receptores dopaminérgicos.

La primera clasificación de los receptores dopaminérgicos fue propuesta por Keblavian y Calne en 1979, de acuerdo con la evidencia farmacológica y bioquímica, como dos familias, una acoplada positivamente a la enzima adenilato ciclasa (AC) que interviene en la generación de adenosín monofosfato-3',5' cíclico (AMPc), y otra independiente de ésta. La familia D₁ estaría acoplada a proteínas G_s, induciendo un incremento en la producción de AMPc, y la familia de los D₂ estarían acoplados a proteínas G_i, induciendo una menor actividad de la AC y menor producción de AMPc. Estas diferencias funcionales son actualmente explicadas por las diferencias estructurales que existen entre las dos familias de receptores dopaminérgicos (Jackson *et al.*, 1994; Missale *et al.*, 1998).

Con técnicas de síntesis de fármacos específicos ha sido posible identificar la presencia de diversos receptores dopaminérgicos especialmente en el SNC. Son conocidos clásicamente como la familia de los receptores D₁ ó D₁-like y D₂ ó D₂-like. De acuerdo con las similitudes que existen entre los receptores en cuanto a su estructura, sus efectos farmacológicos, su distribución, así como la activación de segundos mensajeros intracelulares, han sido clasificados dentro de la familia D₁ los subtipos de receptores D₁ y D₅, mientras que dentro de la familia de los receptores D₂ se encuentran los subtipos de receptores D₂, D₃ y D₄. Hay dos formas alternativas de las proteínas D₂, D_{2s} (de corto) y D_{2L} (de largo), que representan variantes de corte y empalme alternativo del mismo gen (Missale *et al.*, 1998).

2.4.2 Estructura del receptor dopaminérgico.

A partir de que el cDNA del receptor dopaminérgico D₂ fue aislado por primera vez por Bunzow y colaboradores (1988), se ha descrito la existencia de otros subtipos de receptores, así como variaciones de un mismo receptor (Missale *et al.*, 1998).

Todos los subtipos de receptores dopaminérgicos tienen una estructura similar con siete regiones o dominios hidrofóbicos que se encuentran distribuidos en la membrana celular denominados TMI-TMVII. Entre estos dominios existen tres asas denominadas CPL1, CPL2 y CPL3 que protruyen dentro y fuera del citoplasma. El extremo amino terminal (NH₂) es extracelular y presenta el mismo número de aminoácidos en todos los subtipos de receptores, así como un número variable de sitios para glicosilación. Los receptores de la familia D₂ tienen un asa intracelular (CPL3) muy larga, una característica que es común en los receptores que interactúan con el sistema de proteínas Gi, para inhibir a la AC (Figura 2.4). Los receptores de la familia D₁ se caracterizan por una CPL3 corta, como muchos de los receptores que se acoplan a las proteínas Gs y que estimulan la producción de AMPc (Figura 2.4). El extremo carboxilo (COOH) terminal protruye, al igual que las asas citoplásmicas, dentro del citoplasma, y es siete veces más largo para la familia de los receptores D₁ que para los de la familia D₂. Esta porción es rica en residuos de serina, treonina, lo cual es un sustrato para fosforilación (Missale *et al.*, 1998).

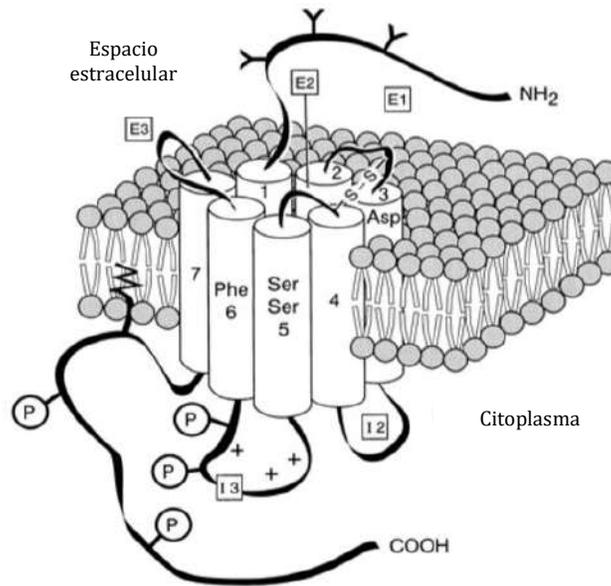


Figura 2.4. Estructura de los receptores dopaminérgicos. Se representan características estructurales de los receptores de dopamina D₁. Los receptores D₂ son similares y se caracterizan por un extremo COOH-terminal más corto y por un tercer bucle intracelular más grande. Los residuos involucrados en la unión de dopamina se destacan en los dominios transmembrana. Los sitios de fosforilación potenciales se presentan en el tercer ciclo intracelular (I3) y en el extremo COOH. Los sitios de glicosilación potenciales están representados en el NH₂ terminal. (Tomada de <http://apuntesmedicinaucsg.blogspot.com/2013/12/neurofisiologia-de-receptores.html>).

2.4.3 Familia D₂.

Como se mencionó anteriormente, la familia de receptores D₂ está constituida por tres subtipos denominados D₂, D₃ y D₄, los cuales tienen como características una región i₃ muy larga de 101 a 166 aminoácidos, dependiendo del subtipo y de la especie. En contraste, la misma región está conformada por 57 y 50 residuos en los receptores D₁ y D₅, respectivamente (Jackson *et al.*, 1994). Las regiones i₃ largas parecen ser típicas de los receptores que inhiben a la AC (y por lo tanto la formación de AMPc) mediante la activación de proteínas G_i. Dicha región es también rica en residuos de serina y de treonina, mismos que pueden ser fosforilados por diversas proteínas cinasas, regulando así el acople a la proteína G correspondiente (Bahena *et al.*, 2000).

2.4.3.1 Características y distribución de los receptores D₂ en el cerebro.

Existen dos formas de receptores D₂ generadas por procesamiento alternativo ("splicing") del ARNm proveniente de un gen único. La forma corta (D_{2s}) está formada por 414 aminoácidos en el humano y 415 en la rata, mientras que la forma larga (D_{2L}) tiene 443 y 444 aminoácidos, respectivamente. La diferencia de residuos aminoacídicos se observa sobre todo en la región i₃, conformada por 29 aminoácidos más en las formas largas del receptor (Jackson *et al.*, 1994). Dado que la región i₃ es crítica para el acople a proteínas G, es probable que la variación en longitud de dicha región resulte en diferencias tanto en los procesos de transducción de señales como en la regulación de la activación de proteínas G (Missale *et al.*, 1998; Barajas *et al.*, 2015).

El receptor D₂ se encuentra en alta densidad en el neostriado, el tubérculo olfatorio, la capa molecular de la formación hipocampal, el núcleo accumbens, las islas de Calleja y el área tegmental ventral. Se encuentra también en moderadas cantidades en la *substantia nigra* reticulada y en la *substantia nigra* compacta (donde es expresado por las neuronas dopaminérgicas como autorreceptor somatodendrítico), en la corteza cerebral (regiones prefrontal, entorrinal y cíngulo), en el globo pálido, la amígdala, el tálamo y el hipotálamo (Jackson *et al.*, 1994). En la hipófisis, el receptor D₂ es expresado por los melanotropos y por los lactotropos, donde regula la neurosecreción al modular la apertura de canales de Ca⁺² activados por voltaje mediante la activación de proteínas G (Lledo *et al.*, 1992; Missale *et al.*, 1998; Gómora *et al.*, 1996).

La distribución del ARNm es prácticamente paralela a la descrita para el receptor, con la excepción de las *substantia nigra* reticulada, en la que se han determinado niveles intermedios del receptor, pero muy bajos o indetectables del ARNm (Jackson *et al.*, 1994), indicando que en esta región el receptor se encuentra localizado en las terminales sinápticas de las vías aferentes y en las dendritas de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* (SNc) que se extiende a *substantia nigra* reticulada (SNr). Cabe destacar que, en general, la distribución del ARNm de las dos

formas (corta o larga) del receptor coincide con la distribución del ARNm total para ambas formas. Sin embargo, en las regiones donde se han observado una distribución diferencial es en el neocórtex y la hipófisis, en donde se observa una mayor presencia del receptor D₂ en forma larga (Jackson *et al.*, 1994).

2.5 Modelos murinos de manipulación dopaminérgica para el estudio de la EP.

Hay diversos modelos de manipulación dopaminérgica en rata que permiten una aproximación a las alteraciones en los ganglios basales, tales como el parkinsonismo en humanos. Hay modelos por neurotoxicidad a través de agentes químicos neurotóxicos específicos para las neuronas dopaminérgicas y catecolaminérgicas como el inducido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Jeon, 1995) o bien por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) (González, 2005), el ácido 3-nitropropiónico (3-NP), la retonona (González, 2005), la inyección crónica de amfetamina (Stephans *et al.*, 1998) y el ácido malónico (MA).

Es importante mencionar que los modelos basados en el uso de antagonistas de DA presentan ventajas frente a las neurotoxinas, por la reversibilidad del daño en el animal. Estos modelos utilizan la administración de antipsicóticos de eficiencia clínica para interferir con la función transmisora de la dopamina y producir efectos neurológicos motores. Tal es el caso del uso de butirofenonas y sus congéneres, como el haloperidol y la pimozida, con afinidad selectiva a receptores de dopamina D₂ (Bahena *et al.*, 2000).

El haloperidol es un neuroléptico perteneciente a la familia de las butirofenonas. Es un potente antagonista de los receptores dopaminérgicos cerebrales (D₁ y D₂). Como consecuencia directa del efecto bloqueante dopaminérgico central, el haloperidol posee una actividad incisiva de delirios y alucinaciones (probablemente debido a una interacción en los tejidos límbico y mesocortical) y una actividad sobre los ganglios basales (vía nigrostriada). La actividad sobre los ganglios basales

probablemente sea la razón de los indeseables efectos motores extrapiramidales (disonía, acatísia y parkinsonismo).

El haloperidol es considerado uno de los prototipos para fármacos tipo neuroléptico estándar, que tienen perfiles similares de sus efectos motores a los observados en los enfermos con la EP (Freedman *et al.*, 1994; Sultana *et al.*, 2000; Campos, 2008) tales como acinesia, bradicinesia, rigidez, temblor, alteraciones en la marcha y postura anormal (Campos *et al.*, 2008; Hardman *et al.*, 2003). Su administración oral o intraperitoneal (IP) estimula movimientos mandibulares (Glenthoj *et al.*, 1989; Trevitt *et al.*, 1998; Wisniecki *et al.*, 2003) que correlacionan con el temblor en el parkinsonismo. Al respecto, el modelo de parkinsonismo de temblor mandibular (TM) propuesto por Salamone *et al.* (1998) es un modelo que cumple con los criterios de validación de modelos animales (Ishiwari *et al.*, 2004; Collins-Praino *et al.*, 2011) bajo los planteamientos anteriores.

2.6 Modelo de parkinsonismo.

Los modelos de enfermedad de Parkinson con neurotoxinas y neurolépticos han permitido el estudio de los posibles mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad, así como de la eficacia de los tratamientos tanto sintomáticos como neuroprotectores y/o restauradores, probando la eficacia y seguridad en dichos modelos previamente a la administración en humanos (Bankiewicz *et al.*, 1993).

El modelo de parkinsonismo (Salamone *et al.*, 1998) induce en la rata un temblor mandibular rápido y no dirigido a algún estímulo en particular, que se genera en repetitivas oscilaciones verticales de la mandíbula (Salomone *et al.*, 1990, 1996, 1998), en una escala de frecuencia entre 3-7 Hz (Ishiwari, 2004; Finn *et al.*, 1995; Salamone *et al.*, 1996; Collins-Praino *et al.*, 2011). Las características neuroquímicas, anatómicas y electromiográficas del temblor mandibular se homologan con lo registrado en el temblor de pacientes parkinsonianos (Salamone *et al.*, 1998; Cousins *et al.*, 1998; Cenci *et al.*, 2002).

La inducción de los temblores mandibulares (TMs) en rata está asociada con alteraciones en los mecanismos estriatales (Mayorga *et al.*, 1997; Salamone *et al.*, 1990). La mayoría de TMs son inducidos por una alteración en la neurotransmisión dopaminérgica estriatal, que puede ser ocasionada por antagonismo dopaminérgico (Salamone *et al.*, 1996; Ishiwari *et al.*, 2005; Collins-Praino *et al.*, 2011) o por el efecto de la depleción de dopamina en el estriado ventrolateral (EVL) con 6-OHDA (Jicha *et al.*, 1991; Finn *et al.*, 1997), si bien se sabe que la región ventrolateral del estriado es una área que recibe proyecciones dopaminérgicas provenientes de la *substantia nigra compacta* (Berke *et al.*, 2000).

En el presente trabajo se utilizará el modelo inducido por el antagonista dopaminérgico sistémico haloperidol, el cual émula las características de las alteraciones motoras en el parkinsonismo (Salamone *et al.*, 1998).

2.7 Ácidos grasos.

Los ácidos grasos son compuestos orgánicos, no polares, generalmente insolubles en agua, formados por cadenas de hidrocarburos que tienen, por lo general, un número par de átomos de carbono, en un rango de longitud de 6 a 24 carbonos (Arab, 2003). Los ácidos grasos se encuentran en triglicéridos y fosfolípidos, y rara vez como ácidos grasos libres. Los ácidos grasos son importantes como unidades de almacenamiento de energía, ya que su metabolismo genera grandes cantidades de ATP. Además, las grasas juegan un papel vital como unidades estructurales en las membranas celulares (como anclaje de proteínas, transporte y señalización de moléculas), como precursores de eicosanoides y como reguladores de la expresión génica (Arab, 2003).

Los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados, estos últimos tienen en su estructura dobles enlaces. Los ácidos grasos insaturados se clasifican a su vez en monoinsaturados y poliinsaturados. Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) ó

PUFA por sus siglas en inglés (*polyunsaturated fatty acids*) se definen como aquellos ácidos que contienen dos o más dobles enlaces.

En los mamíferos, los AGPI se clasifican en dos grandes categorías, los esenciales y los no esenciales. Los AGPI esenciales son aquellos que deben ser ingeridos en la dieta, ya que no pueden ser sintetizados a partir de otros precursores. A esta categoría pertenecen los ácidos grasos linoléico (18:2 n-6) y α -linolénico (18:3 n-3) (Figura 2.5).

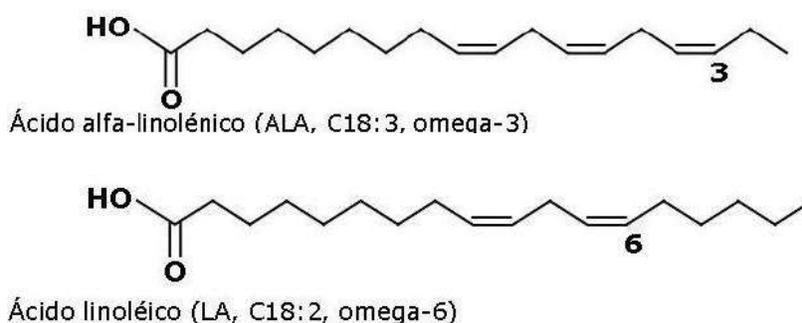


Figura 2.5. Estructura química de los ácidos grasos esenciales: ácido alfa-linolénico y ácido linoléico.

2.7.1 Ácidos grasos poliinsaturados esenciales.

Los AGPI esenciales se dividen en dos familias: la omega-6 (n-6) y la omega-3 (n-3). Los ácidos grasos n-3 y n-6 difieren en la posición de los dobles enlaces dentro de su cadena hidrocarbonada: a partir del extremo metilo, el doble enlace terminal se ubica en el carbono 3 para los ácidos grasos omega-3, y en el carbono 6 para los ácidos grasos n-6. Los ácidos grasos octadecanoides (18 carbonos) como el ácido α -linolénico (ALA) y el ácido linoléico (LA) constituyen los precursores de la familia n-3 y n-6 de AGPI, respectivamente (Figura 2.6). Los ácidos grasos esenciales n-3 y n-6 no son interconvertibles en el organismo, por lo que su aporte debe de provenir necesariamente de fuentes exógenas (Shahidi, 2006).

Los AGPI más importantes fisiológicamente son el EPA y el DHA, dos ácidos grasos omega-3 que se encuentran principalmente en el aceite de pescado (Muskiel *et al.*, 2004), y el ácido araquidónico (AA) que es un importante AGPI n-6 ya que es el precursor de varios mediadores proinflamatorios de la familia de eicosanoides, como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, mientras que los provenientes de los omegas-3 tienen un efecto antiinflamatorio (Soberman *et al.*, 2003). Estas moléculas de señalización ejercen control sobre muchos sistemas corporales, principalmente la inflamación, la epigenética, el desarrollo y función cerebral, y la inmunidad (Muskiel *et al.*, 2004).

Tanto el hígado como el cerebro tienen la maquinaria enzimática para convertir el ALA en DHA (Brenna *et al.*, 2009). Más específicamente, el ALA es desaturado inicialmente por la Δ -6 desaturasa, que se considera generalmente como la reacción limitante de la velocidad en la vía, antes de someterse al alargamiento y entrar en un segundo evento de desaturación (Δ -5 desaturasa) para formar EPA (20:5 n-3) (Figura 2.6). El EPA puede ser alargado por la enlogasa 2 para formar el ácido docosapentanoico (DPA; 22:5 n-3) y luego a 24:5 n-3 seguido de la desaturación que utiliza de nuevo la Δ -6 desaturasa para formar 24:6 n-3. El 24:6 n-3 se trasloca entonces desde el retículo endoplasmático hasta el peroxisoma donde sufre una ronda de β -oxidación para formar DHA (Barcelo-Coblijn *et al.*, 2009; Sprecher, 2000; Calder, 2016). El hígado tiene una mayor capacidad que el cerebro para la conversión del ALA y sigue siendo la principal fuente de DHA no dietético (Barcelo-Coblijn *et al.*, 2009). El AA es el ácido graso n-6 más abundante en el cerebro, que comprende 8-11% de los ácidos grasos de los fosfolípidos. El contenido de DHA en el cerebro es de 12-15%, mientras que el EPA no se almacena en cantidades significativas en el cerebro (Whelan, 2008).

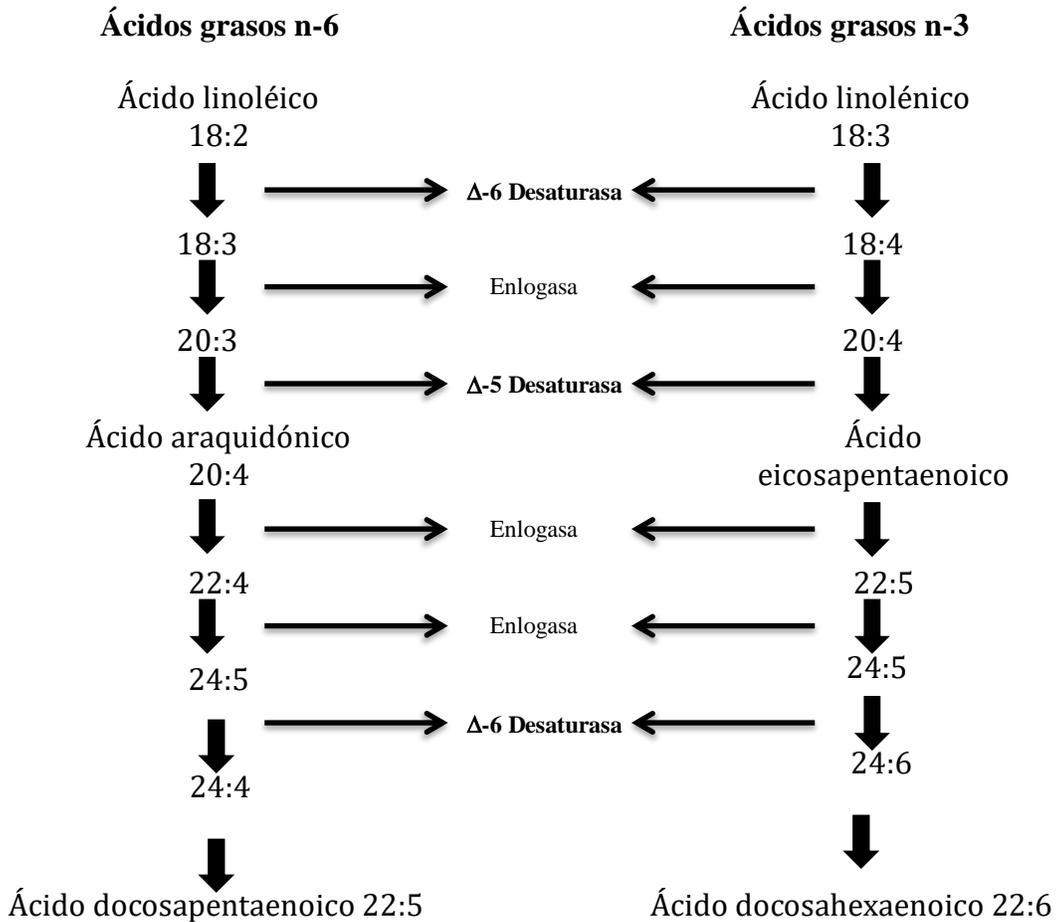


Figura 2.6. Familia de ácidos grasos poliinsaturados esenciales. (Tomada de Valenzuela *et al.*, 2011)

2.7.2 DHA.

El ácido docosahexaenoico (DHA) es un ácido graso de cadena larga omega-3, altamente insaturado. Tiene 22 carbonos en su cadena de acilo, que incluyen seis dobles enlaces. El DHA se muestra en la nomenclatura común de ácidos grasos como 22:6 n-3 (Figura 2.7). El nombre común para el DHA, que se utiliza raramente, es el ácido cervónico. Las cadenas de acilos sin dobles enlaces, como los ácidos grasos saturados, son rectas y se empaquetan fuertemente. La introducción de un doble enlace cis en una cadena acilo introduce un dobléz en la cadena, haciendo menos fácil que tales cadenas se empaqueten juntas y bajen su punto de fusión.

Como la cadena acilo de DHA contiene seis enlaces dobles cis (Figura 2.7), posee propiedades físicas únicas y un punto de fusión muy bajo (-44 °C). Al igual que otros ácidos grasos, el DHA se encuentra más a menudo enlazado a través de su grupo carboxilo en una estructura lipídica más compleja, tal como un triglicérido, un fosfolípido o un éster de colestero (Calder, 2016).

El DHA juega un papel vital en la estructura y función del cerebro y los ojos. Un suministro adecuado durante la vida fetal y en la infancia es esencial para asegurar un desarrollo óptimo (Calder, 2016).

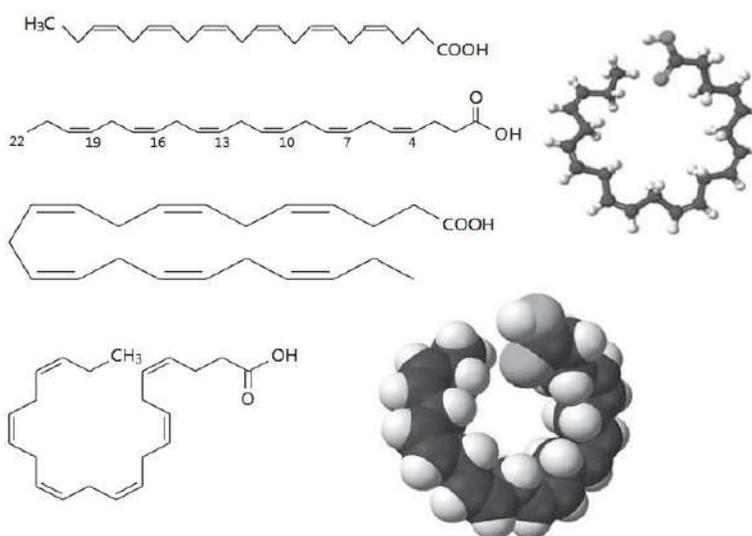


Figura 2.7. Diferentes representaciones de la estructura del DHA. El DHA tiene 22 carbonos y seis enlaces dobles cis en su cadena hidrocarbonada (acilo). El carbono α es el carbono del grupo carboxilo terminal (COOH) y el carbono omega es el carbono del grupo metil (CH₃) terminal (Tomada de Calder, 2016).

Los ácidos grasos omega-3, como es el caso del DHA, tienen un papel importante en las funciones cerebrales ya que son los principales componentes de los fosfolípidos de membrana de las células neuronales, por lo tanto, regulan propiedades de la membrana tales como fluidez, flexibilidad, permeabilidad y la modulación de proteínas unidas a la membrana (Delion *et al.*, 1996; Innis, 2000).

En la sangre, los ácidos grasos se pueden incorporar en triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol unidos a las proteínas plasmáticas como la albumina, de la que se disocian y, posteriormente, pueden penetrar la barrera hematoencefálica (Chen *et al.*, 2008). Los AGPI unidos a albumina son la principal fuente para el cerebro. Una vez en el cerebro, los AGPI son convertidos por la acil-CoA sintetasa en acil-CoAs y luego se esterifican preferentemente en el fosfolípido en la posición sn-2 (estereoespecífica) a través de la transferasa-acil CoA (Mashek *et al.*, 2006).

Dependiendo de su nivel de insaturación y la conformación tridimensional, los AGPI promueven un aumento de la fluidez de la membrana mediante la interrupción del empaquetamiento ordenado de la bicapa fosfolipídica de las membranas biológicas. Se ha encontrado que el DHA tiene preferencia por el fosfolípido de membrana fosfatidiletanolamina, así como para la fosfatidilserina, y se encuentran principalmente en la membrana sináptica, la retina y los axones, mientras el AA se une a fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol (Chen *et al.*, 2011). Las conformaciones del DHA dentro de la bicapa de fosfolípidos por la presencia de sus múltiples dobles enlaces cis, confieren una mayor fluidez y otras propiedades únicas a las membranas biológicas. Por lo tanto, proporciona un entorno bien adaptado para la función óptima de receptores, permeasas y canales (Salem *et al.*, 2001).

Las fosfolipasas A2 (PLAs2) son un grupo de enzimas responsables de la liberación de ácidos grasos por hidrólisis de los fosfolípidos de membrana en la posición sn-2 del glicerol. Más del 90% de los AGPI liberados son rápidamente reesterificados y regresan a la bicapa de fosfolípidos (Bazinet *et al.*, 2005). La función de los AGPI libres es suministrar energía a las células a través de vías de degradación, tales como reacciones de β -oxidación en la mitocondria, o están involucrados como mensajeros que pueden desencadenar cascadas de señalización intracelulares, incluyendo la apoptosis, procesos inflamatorios y la proliferación celular. Debido a su amplio espectro de actividad, los AGPI omega-3 son reconocidos como potentes agentes para la prevención y el tratamiento de numerosos padecimientos, que van desde trastornos cardiovasculares hasta las enfermedades neurodegenerativas (Calon *et al.*, 2007).

2.7.3 Ácidos grasos esenciales en la función cerebral.

Una gran porción de fosfolípidos en el cerebro contiene ácidos grasos esenciales que pertenecen a las familias omegas 6 (n-6) y omega 3 (n-3) (O'Brien *et al.*, 1964; Crawford *et al.*, 1976). Los ácidos grasos omega-3 tienen varias funciones importantes tales como la definición de la fluidez, flexibilidad, permeabilidad y la modulación de las proteínas de membrana, ya que son en el componente principal de los fosfolípidos de membrana de las células neuronales (Suzuki *et al.*, 1998).

La composición lipídica de las membranas afecta también la estructura terciaria y cuaternaria de los receptores (colinérgicos, dopaminérgicos, adrenérgicos) y la función asociada a la transmisión de impulsos nerviosos (Calvani *et al.*, 2003).

Los tejidos neuronales como el cerebro y la retina contienen cantidades elevadas de ácido docosahexaenoico (DHA), pero particularmente en las membranas sinápticas, el DHA está altamente concentrado y esto facilita la exocitosis de las vesículas que contienen neurotransmisores, lo que indica un papel importante en la regulación de la liberación de neurotransmisores (Pongrac *et al.*, 2007). Además, no solo modula las propiedades físicas de las membranas neuronales (Tanabe *et al.*, 2004), sino que también promueve la formación de segundos mensajeros que pueden funcionar en los procesos de señalización (Phillis *et al.*, 2006). El DHA también puede regular la actividad e inserción de receptores de membrana como los receptores de glutamato (Moreira *et al.*, 2010), así como modular receptores dopaminérgicos y la neurotransmisión serotoninérgica (Chalon, 2006).

La composición lipídica de las membranas y la proporción de ácidos grasos n-3, principalmente DHA, puede alterar las funciones de éstas por falta de fluidez. También se puede afectar a las proteínas por su relación con los lípidos de la membrana y en consecuencia también hay efectos en las funciones enzimáticas. Con la deficiencia de ácidos grasos omega-3 se ha encontrado que en las membranas mitocondriales de la corteza cerebral y del bulbo olfatorio de rata se reduce en un 30-35% la fosfatidilserina. El aumento de DHA es relevante en la prevención de las vías de la neurogénesis, la regulación de la neurotransmisión, la

reducción de la producción de amiloide- β , y el aumento de los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (Cole *et al.*, 2010).

Se requieren suministros adecuados de ácidos grasos esenciales durante el desarrollo y en la edad adulta, para garantizar la función cerebral adecuada (Innis, 2011). Estudios en rata, sobre la deficiencia de ácidos grasos omega-3, mencionan que la etapa del desarrollo es un período crítico para el cerebro (Chen, *et al.*, 2012; De Velasco *et al.*, 2012). Durante el desarrollo prenatal, el DHA se transporta de la madre a la cría a través de la placenta. Después del nacimiento, la adquisición de omega-3 se logra mediante el consumo de leche materna (Innis, 2011). Y si hay una disminución de los ácidos grasos omega-3, se observa un deterioro en las habilidades del aprendizaje y visión, disminución de las actividades sensoriales y motoras (Innis, 2007).

Por otro lado, durante el envejecimiento, disminuye la concentración de los ácidos grasos poliinsaturados en las membranas neuronales. Hay dos posibles factores para esta disminución. La primera es una disminución en la capacidad de los ácidos grasos consumidos en la dieta para cruzar la barrera hematoencefálica, ya que se vuelve menos efectiva durante el envejecimiento (Yehuda *et al.*, 2005). Y el segundo, la disminución del nivel y la actividad de las enzimas involucradas en los precursores dietéticos de los ácidos grasos esenciales, por lo cual la actividad de la enzima desaturasa disminuye durante el envejecimiento, y esto modifica la membrana cerebral, lo que podría generar trastornos neurodegenerativos como el Parkinson (Bousquet *et al.*, 2009), enfermedad de Alzheimer (Cunnane *et al.*, 2012) o la esquizofrenia, donde se señala que los omega-3 y omega-6 son deficientes, en particular los niveles de DHA (Horrobin, 2001).

Por lo tanto, un equilibrio de los ácidos grasos omega-3 y omega-6 es determinante para mantener la homeostasis y el desarrollo normal del cerebro (Gomez-Pinilla, 2008).

2.8 Relación de los ácidos grasos omega-3 con la Enfermedad de Parkinson.

Aunque hay una gran cantidad de estudios sobre modelos de EP en células y animales inducidos por toxinas, todavía no se ha desarrollado un tratamiento que pueda modificar o detener la EP, por lo tanto, se necesitan más estudios para avanzar en el campo de la EP. Se han podido identificar de manera imparcial varios procesos o vías que pueden estar involucrados en la EP (Xicoy *et al.*, 2019). Los ácidos grasos poliinsaturados pueden desempeñar un papel muy importante en la enfermedad de Parkinson (Cole *et al.*, 2013), ya que se ha asociado en diferentes procesos, y diversos antecedentes han mostrado la importancia de los ácidos grasos de cadena larga, como el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico (AA), en la función cerebral (Uauy *et al.*, 2006; Innis, 2007; Zhang *et al.*, 2011).

Desde un punto de vista evolutivo, la expansión de la materia gris en la corteza cerebral coincidió con la inclusión en la dieta humana de pescados y mariscos y otras fuentes que contienen altos niveles de DHA (Crawford *et al.*, 1999, 2001; Bradbury, 2011). Ya en la década de 1920 algunos investigadores habían descrito la importancia de los ácidos grasos esenciales, ya que habían observado cambios en la piel en ratas y trastornos neurológicos y visuales en los seres humanos sometidos a la restricción de grasas en sus dietas (Burr *et al.*, 1929). Desde entonces, se han estudiado diversos aspectos funcionales relacionados con los ácidos grasos esenciales (AGEs), y se ha enfatizado la importancia del equilibrio en la dieta, teniendo en cuenta que el DHA y AA pueden ejercer efectos opuestos sobre el metabolismo cerebral.

El AA y el DHA participan en diversas etapas del desarrollo neurológico, incluyendo la neurogénesis y la diferenciación morfológica de algunas neuronas (Castro *et al.*, 2001; Levant *et al.*, 2004). Se ha demostrado mediante estudios *in vitro* que el DHA estimula el ciclo celular en las células neuroprogenitoras de la retina y la maduración de células gliales (Insua *et al.*, 2003; Joardar *et al.*, 2006). También se demostró que el DHA promueve la diferenciación dopaminérgica en células madre pluripotentes

inducidas e inhibe la formación de teratoma en ratas con Parkinson (Chang *et al.*, 2012).

En otros estudios han utilizado hibridación *in situ* o análisis de microarreglos y han demostrado que el DHA es capaz de regular la transcripción de genes relacionados con el metabolismo celular, la señalización celular, incluyendo la respuesta al estrés oxidativo, la división celular, el crecimiento y la apoptosis (Sessler *et al.*, 1998; Kitajka *et al.*, 2004). Estos resultados y diversas evidencias indican que los AGPI de cadena larga (AGPI-CL) pueden actuar como neuroprotectores en el cerebro, y que el DHA está implicado en la reducción de la apoptosis y la necrosis en diferentes clases de neuronas (Kim *et al.*, 2010), así como también en las funciones inflamatorias, mientras que el AA puede actuar como un factor neurotrófico en las neuronas sensoriales (Robson *et al.*, 2010).

Dentro de los efectos neuroprotectores del DHA están implicados los subproductos de su metabolismo llamados docosanoideos, especialmente la neuroprotectina D1 (NPD1), que en condiciones de inflamación o estrés oxidativo es capaz de reducir los agentes proapoptóticos, tales como la caspasa-3, Bad y Bax, así como de inhibir la ciclooxigenasa-2 y el factor proinflamatorio NF-kB (Mukherjee *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Bazan *et al.*, 2011). Otros estudios han demostrado también que un derivado de etanolamina de DHA, llamado N-docosahexaenoico etanolamina (DEA) aumenta el crecimiento de neuritas y la sinaptogénesis en las neuronas del hipocampo (Kim *et al.*, 2011a, b).

En conjunto, estos hallazgos sugieren que el desequilibrio en los niveles de AA / DHA en la vida temprana y sobre todo la deficiencia de DHA, inducen la neurodegeneración (Schmitz *et al.*, 2008; Bazan., 2011). Sin embargo, en condiciones fisiológicas, los niveles de AGPI-CL en los fosfolípidos de membrana del cerebro disminuyen con el envejecimiento (Uauy *et al.*, 2006).

Estudios en humanos han observado que una mayor ingesta de AGPI omega-3, pero no de omega-6, está asociada con un menor riesgo de EP (Kamel *et al.*, 2014; Xicoy *et al.*, 2019), mientras que en otros estudios han reportado que un mayor consumo

de omega-6 se relaciona con un mayor riesgo de EP (Miyake *et al.*, 2010; Xicoy *et al.*, 2019). También se ha observado que en el suero de pacientes con EP disminuyeron las concentraciones de AGPI-CL, incluidos ALA, LA y AA, en comparación con los controles (Schulte *et al.*, 2016; Xicoy *et al.*, 2019), mientras que el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EP aumentó los niveles de 4-hidroxinenal, un producto muy tóxico generado por la peroxidación de AA (Selley, 1998; Xicoy *et al.*, 2019). Así mismo, se ha encontrado que los niveles de DHA, AA y el ácido linolénico disminuyen en las balsas lipídicas de la corteza frontal de los pacientes con EP (Fabelo *et al.*, 2011; Xicoy *et al.*, 2019). Además, no se han observado cambios de AGPI en la corteza temporal de pacientes con EP (Julien *et al.*, 2006; Xicoy *et al.*, 2019). Actualmente no hay un acuerdo sobre el impacto de la ingesta de los AGPI en el riesgo de EP y hay poca información disponible sobre los niveles de AGPI en sangre, LCR y el cerebro en pacientes con EP. El único hallazgo consistente es la distribución intracelular alterada de AGPI en neuronas de la corteza frontal de pacientes con EP, es decir, niveles reducidos de DHA en las balsas lipídicas y aumento de DHA en la fracción citosólica (Julien *et al.*, 2006; Xicoy *et al.*, 2019).

En modelos animales se ha observado que, durante las últimas etapas de la gestación y el período de lactancia, hay una acumulación significativa de todos los ácidos grasos en el cerebro (Green *et al.*, 1999). Los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados se distribuyen de forma diferente entre la materia gris y blanca en las regiones del cerebro (Levant *et al.*, 2006). Su acumulación se produce en las distintas etapas del desarrollo del cerebro (Innis, 2007). Durante el embarazo, la necesidad de AGPI-CL es mayor, ya que tiene que ser compartida entre los diferentes tejidos de la madre y del feto, de acuerdo con su disponibilidad en la dieta y su metabolismo en el hígado (Green *et al.*, 1999; Uauy *et al.*, 2006; Innis, 2007; Rapoport *et al.*, 2007).

Por otro lado, diversos estudios han mostrado que los AGPI omega-3 en animales ejercen acciones neuroprotectoras, al aumentar la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro en ratones tratados con MPTP y 6-OHDA. También se ha

observado que el DHA, protege las neuronas dopaminérgicas contra la neurotoxicidad inducida por el MPTP o toxicidad inducida por rotenona, en modelos de roedores (Tanriover *et al.*, 2010; Ozkan *et al.*, 2016; Serrano *et al.*, 2018). Además, el DHA desempeña un papel crucial en la diferenciación de células madre pluripotentes inducidas en neuronas dopaminérgicas funcionales, y una suplementación con DHA protege a las neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso en ratones tratados con MPTP (Chang *et al.*, 2012; Parlak *et al.*, 2015; Xicoy *et al.*, 2019).

Varios estudios han indicado que los sistemas dopaminérgicos pueden verse particularmente afectados cuando la disponibilidad del DHA se reduce en el cerebro (Delion *et al.*, 1994; Zimmer *et al.*, 1998; Zimmer *et al.*, 2000a; Zimmer *et al.*, 2000b; Zimmer *et al.*, 2002; Chalon, 2006).

Un estudio sobre la reversibilidad inducido por déficit de AGPI-CL omega-3 en la neurotransmisión dopaminérgica en ratas, demostraron que, incluso después de la restitución de una dieta adecuada después del destete, la liberación estimulada de dopamina en el NAc y la corteza frontal, y los sitios de unión VMAT2 en el NAc no mostraron una recuperación completa (Kodas *et al.*, 2002).

Por otra parte, ratas alimentadas durante 21 meses con isómeros trans de ALA mostraron niveles reducidos de dopamina endógena en la corteza frontal, el cuerpo estriado y el hipocampo. Sin embargo, la suplementación dietética posterior con cis ALA fue capaz de aumentar la concentración de dopamina sólo en la corteza frontal (Acar *et al.*, 2003). Otro estudio demostró que, cuando las ratas fueron alimentadas desde la concepción con una dieta que produce una disminución relativamente modesta de DHA en el cerebro, no se encontraron cambios en el comportamiento de adultos que fueran indicativos de disfunción dopaminérgica, como la actividad locomotora estimulada por anfetamina. Sin embargo, los cambios en la catalepsia inducida por haloperidol se invirtieron por la suplementación de la dieta al destete (Levant *et al.*, 2004).

Hacioglu y colaboradores (2012) suplementaron con DHA a ratas con parkinsonismo experimental, tratados con MPTP, en el cual los animales inducidos con MPTP

mostraron una disminución de la actividad locomotora, la coordinación motora, y pérdida del equilibrio en comparación con los animales inducidos con MPTP y tratados con DHA, lo cual sugiere que el DHA protege a las neuronas dopaminérgicas significativamente contra la muerte celular. Otros reportes similares se obtuvieron en modelos inducidos a parkinsonismo (inducido por una toxina o 6-hidroxidopamina), donde se observó el efecto protector de la administración de AGPI omega-3, ya que se vio una recuperación parcial en la locomoción y una disminución en los niveles de peroxidación lipídica, al igual que se ven atenuados los déficits de aprendizaje y memoria en ratas suplementadas, por lo tanto esto indica que los AGPI omega-3 previenen los trastornos de comportamiento y neuroquímicos, presentando una posible acción protectora (Barros *et al.*, 2016; Delattre *et al.*, 2016).

Los mecanismos implicados en la pérdida de células dopaminérgicas en la *substantia nigra* inducida por la restricción dietética de ácidos grasos esenciales (AGEs) no se entienden por completo, pero parece que, durante el desarrollo del cerebro, tal deficiencia podría afectar múltiples mecanismos homeostáticos que por lo general confieren resistencia a la *substantia nigra* e incluso al área tegmental ventral (VTA), modificando el perfil de degeneración de las células dopaminérgicas del mesencéfalo. La evidencia acumulada ha señalado al estrés oxidativo en la desaparición de las células dopaminérgicas como un factor relevante involucrado en la etiología y evolución de la enfermedad de Parkinson, así como en otras enfermedades neurodegenerativas (Melo *et al.*, 2011).

Por lo tanto, en modelos experimentales de enfermedad de Parkinson, como en lesiones estriatales con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) que producen el estrés oxidativo, se ha demostrado que la suplementación dietética con DHA puede restaurar parcialmente la neurotransmisión dopaminérgica (Bousquet *et al.*, 2008; Cansev *et al.*, 2008), así como aumentar la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en el cuerpo estriado (Sarsilmaz *et al.*, 2003), y hay disminución significativa de actividad de la ciclooxigenasa-2 y de los niveles de prostaglandina E2 en la *substantia nigra*, atenuando la muerte de células dopaminérgicas inducida por MPTP (Ozsoy *et al.*, 2011).

Resultados obtenidos por Ozsoy *et al.* (2011) destacan la importancia del DHA en el mantenimiento del equilibrio redox en la *substantia nigra*, lo que refuerza la acción protectora de la suplementación dietética del DHA en poblaciones de células en condiciones de estrés oxidativo.

Durante el envejecimiento del cerebro, hay una disminución progresiva de la actividad de varias enzimas antioxidantes, incluyendo SOD y CAT (Cardoso, *et al.*, 2012; Venkateshappa *et al.*, 2012). Por lo tanto, los niveles altos de estrés oxidativo inducido por la deficiencia de DHA en la *substantia nigra* de los animales jóvenes pueden acelerar el perfil degenerativo de este núcleo, lo que aumenta el riesgo de enfermedades relacionados con la dopamina, tales como la enfermedad de Parkinson.

Por otro lado, una alimentación restringida de ALA a corto plazo fue capaz de reducir los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) del cuerpo estriado y la corteza cerebral en ratones (Miyazawa *et al.*, 2010). Esta sensibilidad del cuerpo estriado a los cambios en los niveles del BDNF en función de la concentración de DHA también se observó en otros estudios, como el que realizó Bousquet *et al.* (2009) que, en condiciones de estrés oxidativo inducido por MPTP y una suplementación con DHA, dio lugar a una fuerte reacción del cuerpo estriado, aumentando el BDNF comparado con el testigo. También se ha observado un efecto estimulador de DHA en la expresión del BDNF en otras regiones, tales como el hipocampo, la corteza cerebral y la médula espinal (Vines *et al.*, 2012), indicando un efecto generalizado que puede ocurrir en las neuronas con diferentes perfiles neuroquímicos.

El BDNF es una neurotrofina dopaminérgica potente producida en la *substantia nigra* y transportada al estriado (Hyman *et al.*, 1991). Está regulada por el factor de transcripción Nurr1 (Volpicelli *et al.*, 2007) que está implicado en la génesis, desarrollo y función de las células dopaminérgicas (Jankovic *et al.*, 2005). El DHA puede reducir la pérdida del factor de transcripción Nurr1 en la *substantia nigra* en condiciones de estrés oxidativo mediado por MPTP (Bousquet *et al.*, 2009).

Diversos estudios apoyan la hipótesis de que la reducción de los niveles de BDNF puede ser un posible mecanismo implicado en la pérdida de las células de dopamina por el agotamiento del DHA en el sistema nigroestriatal. Una infusión intratecal del BDNF reduce la pérdida de neuronas de dopamina y la gravedad de la enfermedad de Parkinson en monos tratados con MPTP (Tsukahara *et al.*, 1995).

Otro estudio ha reportado que hay un efecto modulador del DHA en otras neurotrofinas con acción en el sistema nigroestriatal. La suplementación con DHA fue capaz de aumentar los niveles del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) y neurturina (NRTN) en la *substantia nigra*, reduciendo la muerte celular dopaminérgica inducida por MPTP (Tanriover *et al.*, 2010).

Se ha reportado que las ratas alimentadas con un 15% de aceite de pescado durante dos semanas, estaban protegidas contra la pérdida de células dopaminérgicas, la activación de la microglia, TNF- α y la expresión de interleucina 1, ante una lesión en la *substantia nigra* inducida por un lipopolisacárido, uno de los principales constituyentes de la membrana externa de las bacterias Gram negativas (Ji *et al.*, 2012). También se ha demostrado un efecto modulador de los ácidos grasos omega-3 sobre la neuroinflamación en el sistema nigroestriatal, como en el estudio reportado por Bousquet *et al.* (2008) que, en crías lactantes sometidas a deficiencia perinatal de ALA, demostró la activación de la microglia en el cuerpo estriado. Por el contrario, los niveles elevados en la dieta de ácidos grasos omega-3 actuó como protector contra el daño dopaminérgico asociado con la neuroinflamación en modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson. Por ejemplo, la suplementación dietética con etil-EPA fue capaz de proteger a ratones contra la hipocinesia inducida por MPTP y otras anomalías de comportamiento, evitando el aumento de TNF- α y las interleucinas (Luchtman *et al.*, 2012). Aunque estos son resultados promisorios, los mecanismos implicados en dichos efectos requieren mayor investigación.

El glutamato también ha sido implicado en la vulnerabilidad de las células dopaminérgicas de la *substantia nigra*. En condiciones fisiológicas, los AGPI pueden ejercer múltiples efectos en el sistema glutamatérgico de la corteza cerebral o del

hipocampo: algunos de ellos favorecen la hiperexcitabilidad (Nishikawa *et al.*, 1994), mientras que otros pueden disminuir la transmisión sináptica del glutamato y aumentar la neuroprotección (Lauritzen *et al.*, 2000). En la *substantia nigra*, la evidencia experimental ha indicado que el DHA y AA pueden desempeñar un papel importante en la modulación de la excitabilidad neuronal mediante la reducción de GABA y potenciando la transmisión glutamatérgica a través de receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato) (Hamano *et al.*, 1996). Aunque estos datos experimentales indican que el glutamato podría contribuir a la degeneración de células de dopamina en la *substantia nigra*, no se entiende la acción glutamatérgica en la *substantia nigra* cuando se tiene una dieta deficiente o suplementada con omega-3 (Latour *et al.*, 2013).

Otros estudios fijan su atención en los receptores de dopamina, ya que los ganglios basales están asociados a las funciones motoras y no motoras, y el neostriado forma parte de los ganglios basales, cuya función es modulada por la dopamina a través de la activación de D₁ y D₂ postsinápticos (Ávila *et al.*, 2013). En un estudio con ratones deficientes de D₂ se encontró una disminución en la locomoción espontánea, déficit de la marcha y reducción de la coordinación motora. Esto es debido a la administración de forma intraestriatal local o sistémica de fármacos antagonistas selectivos por D₂ como el haloperidol, entre otros, incrementando la liberación de dopamina, al igual que la elevación de metabolitos dopaminérgicos como DOPAC y HVA (Sokoloff *et al.*, 2006).

Todos estos datos experimentales refuerzan la idea de que niveles de ácidos grasos esenciales adecuados pueden actuar de forma importante en el desarrollo de los sistemas de dopamina del cerebro medio, al proporcionar una adecuada señalización molecular, ya que estos ácidos grasos parecen ser necesarios para modular funciones clave como el metabolismo de la dopamina, su liberación y absorción, la afinidad por el receptor, el equilibrio redox, la respuesta anti-inflamatoria y la síntesis de neurotrofina. En conjunto, estas acciones pueden mejorar la competencia de este sistema neuronal para mantener una capacidad de resistencia adecuada durante el

desarrollo y la maduración del cerebro. Estos estudios experimentales parecen estar de acuerdo con los estudios prospectivos en los seres humanos que se han asociado positivamente a la ingesta dietética de ácidos grasos omega-3 con un menor riesgo de desarrollar la EP (Chen *et al*, 2003; De Lau *et al.*, 2005).

En la mayoría de los estudios, se ha utilizado el aceite de pescado como fuente de AGPI omega-3; sin embargo, los aceites de algas y krill también son buenas fuentes de EPA y DHA, que están disponibles comercialmente y pueden considerarse como una alternativa a los productos pesqueros en las dietas vegetarianas. Un ejemplo es el aceite obtenido del *Schizochytrium* de microalgas, que contiene altos niveles de DHA y es Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS) como un ingrediente alimentario nutricional (Doughman *et al.*, 2007).

En conclusión, aunque aún no se entiende por completo los efectos precisos de la modificación en la dieta sobre el deterioro del cerebro, se sugiere que el aumento en el consumo de ácidos grasos omega-3, ya sea por dieta o en suplementos, puede ser un método viable para prevenir el deterioro, porque es claro que existe una fuerte correlación entre enfermedades neurodegenerativas y las anomalías en el metabolismo de los lípidos (Xicoy *et al.*, 2019). Además, las intervenciones nutricionales son atractivas porque son más rentables y es probable que sean más seguras que los tratamientos con fármacos.

3. JUSTIFICACIÓN

Existen evidencias que señalan el papel fundamental de los AGPI omega-3 en el funcionamiento del cerebro y la asociación de la deficiencia con enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, resulta importante analizar el efecto neuroprotector del aceite de alga rico en omega-3 en un modelo de parkinsonismo experimental, como una estrategia no farmacológica de prevención y tratamiento de ésta.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto de la suplementación con aceite de alga rico en omega-3 en la respuesta conductual y fisiológica en ratas con parkinsonismo experimental.

4.2 Objetivos específicos.

1. Analizar el efecto preventivo de la suplementación con aceite de alga rico en AGPI omega-3 en el desarrollo del parkinsonismo experimental inducido por haloperidol en: conducta motora, densidad de receptores DA y expresión génica.
2. Analizar el efecto de la co-suplementación con aceite de alga rico en AGPI omega-3 en el desarrollo del parkinsonismo experimental inducido por haloperidol en: conducta motora, densidad de receptores DA y expresión génica.

5. METODOLOGÍA

Con el propósito de evaluar el efecto del aceite de alga rico en omega-3 como suplemento en ratas inducidas a parkinsonismo, se diseñó un experimento empleando animales de laboratorio, en este caso ratas Wistar macho, por su rápida adaptabilidad y fácil manejo. Durante todo el tiempo de experimentación las manipulaciones se realizaron con estricto apego a la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y a la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH, Washington D.C. USA).

5.1 Animales de experimentación.

Para la obtención del modelo de parkinsonismo experimental en el laboratorio, se utilizaron 56 ratas Wistar macho recién destetadas (21 días de edad), adquiridas en los bioterios Envigo (Envigo RMS S.A. de C.V.), en la UNAM.

5.2 Modelo inducido experimentalmente.

El modelo de parkinsonismo experimental se obtuvo a través de la administración intraperitoneal de 1.5 mg/kg de haloperidol (Sigma-Aldrich #H0100100) (Figura 5.1), en una dosis diaria por 14 días, considerando lo descrito por Salomone *et al.* (1996) y Trevitt *et al.* (1998).



Figura 5.1. Inyección intraperitoneal de haloperidol (1.5 mg/kg/día).

5.2.1 Administración del aceite de alga rico en omega-3 sobre el modelo de parkinsonismo.

El efecto de la administración del suplemento de aceite de alga rico en omega-3 Life's DHA™ S10-P200, DSM Nutritional Products Ltd (Anexo F) sobre el parkinsonismo se evaluó bajo dos estrategias experimentales: co-suplementación y pre-suplementación.

Para los grupos testigos se utilizaron 14 ratas que fueron mantenidas en un ciclo de luz/oscuridad invertido de 12/12 h, a 24 °C, durante ocho semanas. Recibieron una dieta de mantenimiento, constituida por proteína cruda 18.0%, grasa cruda 5.0%, fibra cruda 5.0% (Harlan Teklad Global 18% Protein Rodent Diet) durante siete semanas durante las cuales se les administraba de forma intragástrica agua purificada en la misma cantidad que el suplemento de alga de los grupos pre-suplementados. Posteriormente fueron asignadas aleatoriamente en dos grupos: grupo testigo sano (n=7) y grupo tratado con haloperidol (n=7), durante los 14 días restantes. Ambos grupos continuaron con la dieta estándar y la administración intragástrica de agua, y el grupo tratado con haloperidol recibió una inyección intraperitoneal de haloperidol y al grupo testigo se le administró solución salina (Figura 5.2 A).

En el grupo pre-suplementado (Figura 5.2 B) se utilizaron 28 ratas que fueron mantenidas en un ciclo de luz/oscuridad invertido de 12/12 h, a 24 °C, durante ocho semanas. Recibieron una dieta de mantenimiento, constituida por proteína cruda 18.0%, grasa cruda 5.0%, fibra cruda 5.0% (Harlan Teklad Global 18% Protein Rodent Diet); durante la primeras seis semanas se les administró aceite de alga rico en omega-3 en una dosis diaria de 313 mg/kg/día de ácidos grasos omega-3 vía intragástrica, y posteriormente fueron asignadas aleatoriamente en cuatro grupos: testigo sano tratado con aceite de alga rico en omega-3 (T-Ps) y al que se retiró el suplemento de aceite de alga; tratadas con aceite de alga rico en omega-3 (SAA-Ps) y que continuaron recibiendo el aceite de alga; grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 e inducidas con haloperidol (H-Ps) y se retiró el suplemento de aceite de alga (últimas dos semanas); e inducidas con haloperidol y tratadas con aceite de alga rico en omega-3 (SAA+H-Ps), durante los 14 días restantes.

Para el grupo co-suplementado se utilizaron 14 ratas, que fueron mantenidas en un ciclo de luz/oscuridad invertido de 12/12 h, a 24 °C, durante ocho semanas. Recibieron una dieta de mantenimiento constituida por proteína cruda 18.0%, grasa cruda 5.0%, fibra cruda 5.0% (Harlan Teklad Global 18% Protein Rodent Diet); durante las primeras seis semanas se les administró una dosis diaria por vía intragástrica de agua (la misma cantidad que se administró de aceite de alga en el grupo pre-suplementado); las últimas dos semanas fueron asignadas aleatoriamente en dos grupos de siete ratas de la siguiente manera: tratadas con aceite de alga rico en omega-3 (SAA+H-Co) e inducidas con haloperidol y tratadas con aceite de alga rico en omega-3 (SAA-Co) (Figura 5.2 A).

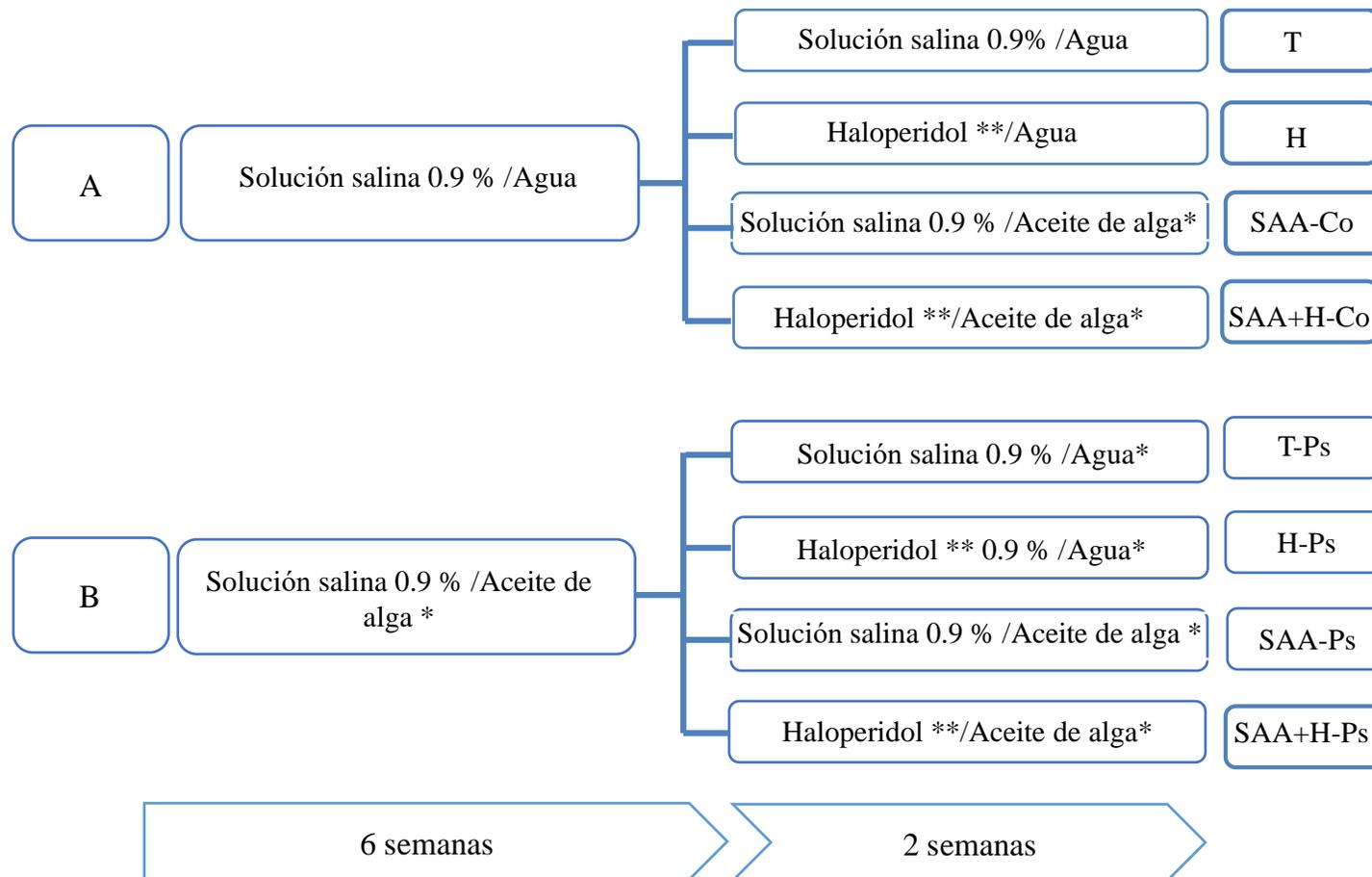


Figura 5.2. Estrategias experimentales implementadas en el trabajo. Suplementación previa durante seis semanas con agua (A) o aceite de algas (B) (n=28). T: grupo testigo sano; H: grupo tratado con haloperidol; T-Ps: testigo sano tratado con aceite de alga rico en omega-3 (6 semanas); H-Ps: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (6 semanas); SAA+H-Ps: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (8 semanas); SAA-Ps: grupo tratado con aceite de alga rico en omega-3 (8 semanas); SAA+H-Co: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (2 semanas); SAA-Co: grupo tratado con aceite de alga rico en omega-3 (2 semanas). Ps: pre-suplementado; Co: co-suplementado. *Suplemento de aceite de alga (SAA) intragástrico, 4 g/kg/día equivalente a 300 mg de AGPI Omega-3; ** Haloperidol 1.5 mg/kg/día, intraperitoneal.

Para la preparación de la dosis de aceite de alga rico en omega-3 se mezclaron 4 g del suplemento de aceite de alga (313 mg/kg/día de AGPI omega-3) (Anexo F) por cada kg de peso de la rata, con agua purificada para administrar entre 0.5 mL y 1.5 mL dependiendo de la edad de la rata, y se administró con una sonda intragástrica de acero inoxidable (Figura 5.3); para los grupos que no llevaron aceite de alga rico en omega-3 se utilizó agua para descartar los posibles efectos causados por de la sonda intragástrica. A los grupos sin haloperidol se les inyectó solución salina (1.5 mL/kg) por el mismo período de tiempo y vía.



Figura 5.3. Administración de aceite de alga rico en omega-3 (SAA) vía intragástrica (313 mg AGPI omega-3 /kg/día).

Se registró el peso corporal de las ratas y el alimento consumido todos los días. La actividad locomotriz y el temblor mandibular se registraron por video grabación utilizando la técnica de campo abierto, un día antes de la primera administración de haloperidol (Sesión 1), y cuatro horas después en los días 1 (Sesión 2), 7 (Sesión 3) y 14 (Sesión 4) de la inducción a parkinsonismo con haloperidol (se realizaron grabaciones preliminares en las semanas 1 y 3). Al final de las dos semanas de inducción (día 14), las ratas fueron sacrificadas por decapitación sin anestesia, después del registro en campo abierto. Se obtuvieron los cerebros, se pesaron y se

disectaron lateralmente, la corteza frontal y la posterior se utilizaron para el análisis de perfil de ácidos grasos, y el área tegmental ventral (VTA) del cerebro medio se utilizó para la determinación de la densidad de receptores dopaminérgicos y para la expresión del gen del receptor de dopamina D₂. Las porciones fueron congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -70 °C hasta su análisis.

5.3 Peso Corporal.

El peso corporal se determinó diariamente utilizando una báscula digital, inmovilizando a los roedores en un cilindro para evitar interferencias en la lectura del peso.

5.3.1 Disección de tejido adiposo

Después del sacrificio, se disectó y pesó el tejido adiposo epididimal, intercosal y la grasa visceral.

5.4 Prueba de campo abierto.

La prueba de campo abierto es una herramienta útil para cuantificar conductualmente la actividad motriz espontánea de ratas o ratones bajo tratamiento farmacológico o manipulación experimental, la cual fue desarrollada por Calvin Hall en 1934.

Para esta prueba, cada rata fue colocada en una caja de acrílico opaco (44 x 33 x 20 cm) con el piso dividido en 12 cuadros (11 x 11 cm cada uno) (Figura 5.4), en condiciones de luz tenue (roja). Se realizó una preprueba de 5 min, la cual fue descartada para el análisis estadístico, que permitió al animal habituarse al nuevo ambiente. Después de 24 h de la sesión de prueba, la rata fue nuevamente ingresada a la caja de acrílico para ser video grabada durante 5 min. Posteriormente, los videos fueron analizados para evaluar la conducta espontánea que incluyen las

siguientes variables: número de cuadros cruzados (actividad locomotora; en ésta se consideró que la rata cruzaba un cuadro cuando tres cuartas partes de su cuerpo se encontraba en el cuadro siguiente), conducta vertical (el tiempo en segundos en el que el animal estuvo parado con sus dos patas traseras), y conducta horizontal (el tiempo en segundos en que el animal estuvo caminando), estas conductas se usaron para evaluar la motivación a la exploración y la coordinación motora; y finalmente, el tiempo en segundos de su estado inmóvil.



Figura 5.4. Prueba de campo abierto. Caja de acrílico con el piso dividido en 12 cuadros.

Para la prueba de campo abierto se realizaron seis grabaciones a cada rata, las primeras dos fueron descartadas para el análisis estadístico ya que se tomaron como preprueba y las cuatro siguientes fueron analizadas: al inicio del experimento (semana 1), en la semana tres, un día antes de la administración de haloperidol (Sesión 1), el primer día cuatro horas después del tratamiento con haloperidol (Sesión 2), el día 7 (Sesión 3) y el día 14 (Sesión 4) antes del sacrificio.

5.4.1 Registros de conductas de la prueba de campo abierto.

En el análisis de cada grabación participaron tres observadores ciegos, utilizando un programa de registro donde se colocaba el código de cada rata, se agregaba un

número a cada una de las conductas a analizar (número de cuadros cruzados, conducta vertical, conducta horizontal e inmovilidad) y al iniciar el análisis de cada uno de los videos, se seleccionaba el número de acuerdo a la conducta que realizaba el animal. Al finalizar cada grabación el programa mostraba la frecuencia (número de veces que la rata realizó la conducta) y el tiempo total (total en segundos con que realizó la conducta) (Figura 5.5).

The screenshot shows a window titled 'C:\Users\Quintana\Desktop\ALEJAN-1\Sdlconx.exe' with the following content:

```

PROGRAMA DE REGISTRO CONTINUO

REGISTRO: IH.txt

CONDUCTA      FRECUENCIA    TIEMPO TOTAL    LATENCIA
0 VERTICAL      2             10.21           1.98
1 DESPLAZA     2             23.51           6.65
2 ACICALAM     2             4.45            10.06
3 INMOVILI     1             1.54            5.11
4
5
6
7
8
9

Registro terminado

<ENTER> para mas registros      <ESC> para salir del programa
    
```

Figura 5.5. Programa para registro de actividad locomotriz de mediante la prueba de campo abierto.

5.5 Registro del temblor mandibular.

Los registros del temblor mandibular se obtuvieron con el animal despierto y se realizaron cuatro grabaciones de un minuto; al inicio del experimento (semana 1), en la semana tres, un día antes de la administración de haloperidol (Sesión 1), el primer día cuatro horas después del tratamiento con haloperidol (Sesión 2), el día 7 (Sesión 3) y el día 14 (Sesión 4) antes del sacrificio.

5.6 Extracción de lípidos.

La corteza frontal y occipital del cerebro congeladas se juntaron y fueron homogenizadas con un mortero de acero inoxidable previamente esterilizado y congelado en nitrógeno líquido.

Los lípidos fueron extraídos por el método modificado de Folch (Folch, 1957). Los tejidos homogenizados se resuspendieron en 1 mL de amortiguador Tris-Cloruro de magnesio pH 7.5. Luego se le adicionó 16 mL de la mezcla de Folch (cloroformo-metanol 2:1 v/v). Se agitó en vórtex durante 1 min, se añadió 3 mL de cloruro de sodio 0.73% y se agitó vigorosamente con un vórtex durante 1 min, y posteriormente se centrifugó a 16000 x g a 4°C durante 20 min. Se separó la fase superior, que fue desechada y se recuperó la fase inferior en la cual se localizan los lípidos, sin arrastrar la interfase de proteína formada. A la fase recuperada se le adicionó 7.5 mL de una mezcla de cloroformo-metanol-NaCl 0.73% (3:48:47 v/v), con el fin de eliminar las trazas de proteínas. Se agitó vigorosamente en un vórtex durante 1 min y se dejó reposar a 4°C durante 4 h. La fase superior se desechó y la fase inferior fue filtrada a través de sulfato de sodio anhidro colocado en un embudo de vidrio con papel filtro Watman, con la finalidad de eliminar impurezas y restos de agua. El filtrado se recuperó en un matraz balón (previamente llevado a peso constante) y fue evaporado al vacío en un rotavapor (BÜCHI B-480) a 30 °C, y posteriormente con flujo de nitrógeno. El extracto fue pesado y se resuspendió con cloroformo que contenía 0.20 % de BHT en una proporción de 10 mg de lípidos por mL de cloroformo y se guardó a -20 °C para su posterior análisis. La diferencia en el peso del matraz vacío y después de la evaporación se usó para calcular la cantidad de lípidos extraídos.

5.7 Composición de ácidos grasos de los lípidos extraídos.

La composición de ácidos grasos se determinó por medio de cromatografía de gases-espectrometría de masas, previa metilación.

5.7.1 Metilación de ácidos grasos.

Antes de la cromatografía, los ácidos grasos se transmetilaron con metóxido de sodio 0.5 M en metanol. Se tomó el volumen que equivalía a 100 mg de los lípidos extraídos por Folch. Las muestras resuspendidas en cloroformo se les adicionó 2.5 mL de metóxido de sodio 0.5 M en metanol y se incubaron durante 10 min a 80°C. Posteriormente las muestras se enfriaron en un baño de hielo.

La extracción de los ácidos grasos metilados se realizó con hexano y agitación vigorosa en vórtex durante 5 min. A continuación, se centrifugó a 1500 x g durante 10 min, para separar la fase superior que se almacenó a -20°C hasta su inyección en el cromatógrafo.

5.7.2 Análisis de la composición de ésteres metílicos mediante GC-MS.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, utilizando un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 5977A MSD, GC system Modelo 7890B, GC) con una columna capilar Rtx-Wax (30 m x 0.25 µm) y un detector de ionización de flama bajo las siguientes condiciones:

La temperatura de la columna se programó de la siguiente manera: la temperatura inicial fue de 100 °C durante 5 min, posteriormente se incrementó hasta 240 °C a una velocidad de 15 °C/min, se mantuvo por 60 min. Se utilizó helio como gas acarreador.

La identificación de los picos de cada metil éster se realizó de acuerdo con sus tiempos de retención comparados con los espectros de masas obtenidos para cada compuesto, con una base de datos (HP Chemstation-NIST 05 Mass Spectral search program, versión 2.0d). Todos los químicos y los solventes fueron de grado analítico.

5.8 Extracción de RNA total.

La extracción de RNA total de la porción media del cerebro (VTA) se realizó por el método de Chomczynsky, que utiliza tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (Chomczynsky y Sacchi, 1987). Se utilizó material de plástico desechable estéril y soluciones libres de nucleasas.

Se partió de 100 mg de tejido congelado a -70°C , el cual se colocó en un mortero de acero inoxidable previamente esterilizado y congelado en nitrógeno líquido, donde el tejido fue pulverizado, colocado en tubos eppendorf y almacenado a -70°C hasta su uso. Posteriormente, se homogenizó con 1 mL de Trizol® (Invitrogen) y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se añadió 0.2 mL de cloroformo (CHCl_3) y se agitó vigorosamente en vórtex durante 15 min y se incubó de 2 a 3 min a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a 12 000 g durante 15 min a 4°C y se recuperó la fase superior.

5.8.1 Precipitación del RNA.

La precipitación del RNA se realizó añadiendo 0.5 mL de isopropanol absoluto, agitando por inversión e incubando la muestra a temperatura ambiente durante 10 min. La precipitación final se realizó centrifugando a 12,000 x g a 4°C durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante del tubo, dejando solo el paquete de RNA.

5.8.2 Lavado del RNA.

El lavado del RNA precipitado se realizó con etanol al 70% frío, se agitó mediante un vórtex y se centrifugó a 10,000 x g a 4°C durante 15 min, se utilizó 1 mL de etanol al 75% por muestra. El precipitado lavado se secó a temperatura ambiente durante 15 min, y fue reconstituido en 0.05 mL de agua libre de nucleasas y almacenado a -70°C .

5.8.3 Concentración y calidad del RNA.

La concentración del RNA obtenido se determinó con el equipo Nanodrop 2000 UV-vis spectrophotometer. La calidad del RNA obtenido se determinó calculando la proporción de la absorbancia a 260 y 280 nm. El RNA puro mostró una proporción A_{260}/A_{280} de 1.8 a 2.0, la proporción adecuada A_{260}/A_{280} va de 1.7 - 2.0.

Para determinar la integridad del RNA se realizó electroforesis, para ello se emplearon geles de agarosa al 1% y bromuro de etidio, utilizando amortiguador TAE 1X (Tris, acetato y EDTA) y una corriente de 80 V durante 40 min. Al final de la electroforesis el gel fue visualizado en luz ultravioleta usando un fotodocumentador (Gel DocTM XR+, BioRad). Se identificaron las bandas 28S y 18S del RNA.

5.8.4 Purificación de RNA y síntesis de cDNA.

El RNA se purificó utilizando el kit EN0521 de Thermo Fisher Scientific (Kienzle et al., 1996). Por cada muestra obtenida se añadió a un tubo eppendorff libre de RNAsa 1µg de RNA, 1 µL de amortiguador de reacción con $MgCl_2$, 1 µL DNAsa y 6 µl de agua DEPC, se incubó durante 30 min a 37 °C. Para finalizar se añadió 1 µL de EDTA 50 mM y se incubó a 65 °C durante 10 min.

Posteriormente, para hacer la síntesis de cDNA se utilizó la retrotranscriptasa ReverAit del kit K1622 de Thermo Sicientific (Wiame, *et al.*, 2000). Se añadió en un tubo estéril libre de nucleasas 1 µL de Random Hexamer primer y se agitó mediante un vortex durante 1 seg, se le añadió 4 µL de 5x de amortiguador de reacción, 1 µL de Ribolock inhibidor de RNAsa, 2 µL de 10 mM dNTP mix y 1 µL de Revertaid Multi RT (200U/uL), todo el tiempo se mantuvieron en hielo las muestras. Una vez finalizada la reacción, los tubos se conservaron a -70 °C hasta su uso.

5.9 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRT-PCR).

Los niveles de expresión génica del receptor de dopamina D₂ fueron determinados por la técnica de PCR a tiempo real (RT-PCR), que es un método que cuantifica los niveles de expresión de los genes utilizando fluoróforos. Esta detección de fluorescencia ocurre por el ciclo de replicación y es detectada por el sistema óptico del equipo, el marcador de referencia ROX (rodamina-X) es utilizado para normalizar la señal de fluorescencia no relacionada con la PCR. Se utilizó como agente reportero el SYBR Green, que es un fluoróforo que se une a la doble cadena del DNA aumentando la fluorescencia conforme aumenta el número de amplicones. Para la RT-PCR se utilizó el cADN previamente obtenido, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems).

5.9.1 Determinación de los niveles de expresión del receptor D₂.

Para medir la expresión de los genes en PCR a tiempo real se utilizó un termociclador StepOne™ Real-time PCR System. Se preparó una mezcla de reacción de acuerdo con las condiciones sugeridas por el fabricante para el kit #KK4601 (KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix). Se cuantificó la expresión del gen de Dopamina 2 (D₂) y como gen endógeno se utilizó β-actina, con el objeto de normalizar los resultados. El tejido utilizado para este análisis fue la parte media del cerebro (área tegmental ventral), donde se encuentra la vía involucrada con la función motora. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software Step One™ (Applied Biosystems) aplicando la metodología para cuantificación relativa de la expresión conocida como Metodo Ct (del inglés *threshold cycle*).

Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado obteniéndose el valor Ct para cada muestra. El Ct promedio de cada gen estudiado fue restado del valor Ct promedio del gen de referencia, obteniéndose así el valor Ct normalizado para el gen D₂. El valor de cuantificación relativa o "Fold Change" (RQ) se calculó usando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Los oligos utilizados fueron adquiridos en Quantitec® Primer Assay (Quiagen) para el gen de D₂ (#QT01081990), estos fueron resuspendidos en agua libre de nucleasas en una concentración 10 µM. Los oligos de β-actina (Forward: 5'-ACGAGGCCAGAGCAAGAG-3', Reverse: 5'-GGTGTGGTGCCAGATCTTCTC-3') fueron adquiridos en Integrated DNA Technologies y resuspendidos en agua libre de nucleasas a 100 µM como solución de stock, con la cual se preparó una solución a 10 µM de cada oligos.

Para la expresión de genes, se realizaron experimentos previos para corroborar la amplificación y si presentaban dímeros los oligonucleótidos, se ajustaron las condiciones de temperatura (termociclador T100 BIO-RAD).

Las condiciones de la PCR que se usaron fueron las siguientes:

PCR (StepOne™ Real-time PCR System)

Gen Drd₂ (volumen total 10 µL)	5 µL de Master mix	0.4 µL de primers		1 µL de cDNA	3.6 µL de H ₂ O libre de nucleasas
Gen β-actina (volumen total 10 µL)	5 µL de Master mix	0.2 µL de forward primer	0.2 µL de reverse primer	1 µL de cDNA	3.6 µL de H ₂ O libre de nucleasas

Termociclador (T100 BIO-RAD)

95°C	95°C	60 °C	72 °C	35 ciclos	72 °C	12 °C
2 min	1 min	1 min	1 min		10 min	

5.10 Extracción de proteínas.

Para la obtención de proteínas, la parte media del cerebro (área tegmental ventral) congelada fue homogenizada en un mortero de acero inoxidable previamente esterilizado y congelado en nitrógeno líquido. Se realizó la extracción de proteínas con una solución amortiguadora de lisis (ANEXO C), se dejó reposar durante 1 min, y

posteriormente se agitó en un agitador orbital a 90 rpm durante 1 h en hielo. Finalmente se centrifugó a 12 000 x g durante 10 min a 4°C y se congeló el sobrenadante a -70°C.

5.10.1 Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método de BCA (ThermoFisher scientific, #23227) (Smith *et al.*, 1985), que se basa en la conversión del Cu^{2+} a Cu^{1+} en condiciones alcalinas, y se determinada espectrofotométricamente por un cambio en el color de la solución a púrpura, el cual absorbe a 562 nm. La cuantificación se efectuó en una placa de 96 pozos. En cada pozo se colocaron 10 μL de muestra con solución amortiguadora (Anexo C) y se les agregó el reactivo A:B (50:1) 200 μL a cada pozo. Se dejó incubar la placa por 30 min a 37 °C; la placa se colocó en un lector de microplacas Benchmark (Bio-Rad) para realizar las lecturas de absorbancia a 562 nm.

Para la elaboración de la curva estándar se utilizó ASB (albúmina sérica bovina) (Sigma, #A7906) disuelta en solución amortiguadora de fosfato de sodio 50mM (pH 6.5) en un intervalo de concentración de 0.2 a 1.0 mg/mL.

5.11 Análisis de la densidad de receptores D_2 .

Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12.5 % a 60 V durante 3 h 30 min. Posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF (Biorad, #1620177) en un equipo de transferencia semihúmeda Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Biorad) durante 40 min a 20 V constante. Las proteínas en la membrana fueron visualizadas por tinción con el método de Rojo de Ponceu (Sigma, #P-7170). Después de varios lavados con agua destilada, las membranas fueron bloqueadas con 8 % de leche en polvo en amortiguador TBS con 0.05% de Tween 20 (TBS-T) (anexo E) por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Se

incubaron durante toda la noche a 4 °C en agitación con el anticuerpo primario de receptor D₂ (#AB5084P, Merck Millipore, USA) diluido 1:1000 en TBS con 0.05% de Tween 20 y leche en polvo al 5 %. Las membranas fueron lavadas tres veces por 5 min con TBS-t, y seguidamente se incubaron con el anticuerpo secundario (#12-348, Merck Millipore, USA) diluido 1:1000 en TBS con 0.05% de Tween 20 y 5 % de leche en polvo durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron de nuevo tres veces por 10 min con TBS-t. El revelado se realizó con Luminata Forte (Western HRS substrate, #WBLUF0100, Millipore), y se visualizó en un equipo ChemicDoc TM X-RS+Imagen LabTM, Mod 170-8070, Bio-Rad. Las densidades fueron analizadas con el programa ImageJ.

5.12 Análisis estadístico.

Los datos están presentados como medias \pm desviación estándar (DE). Las bases de datos fueron analizadas utilizando el paquete Statistic® 7 y SigmaPlot 12. El análisis estadístico se realizó mediante estadística descriptiva básica y análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Tuckey. Las diferencias se consideraron significativas en $p < 0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cuidados y alimentación.

Antes de iniciar el experimento, las ratas recién destetadas estuvieron en el bioterio en un período de adaptación de dos semanas, en un ciclo de luz/oscuridad invertido de 12/12 h, a 24 °C.

Los animales fueron alimentados *ad libitum* durante ocho semanas. En las últimas dos semanas se indujo el parkinsonismo experimental a los grupos correspondientes, tanto del experimento pre-suplementado como el de co-suplementado. En la Figura 6.1 se observa el consumo de croqueta en promedio por día durante todo el experimento de ambos grupos experimentales, donde se puede observar que no hubo una diferencia significativa entre los grupos, lo que implica que la suplementación con el aceite de alga rico en omega-3 y la inducción con haloperidol no tuvieron efecto sobre el consumo de alimento.

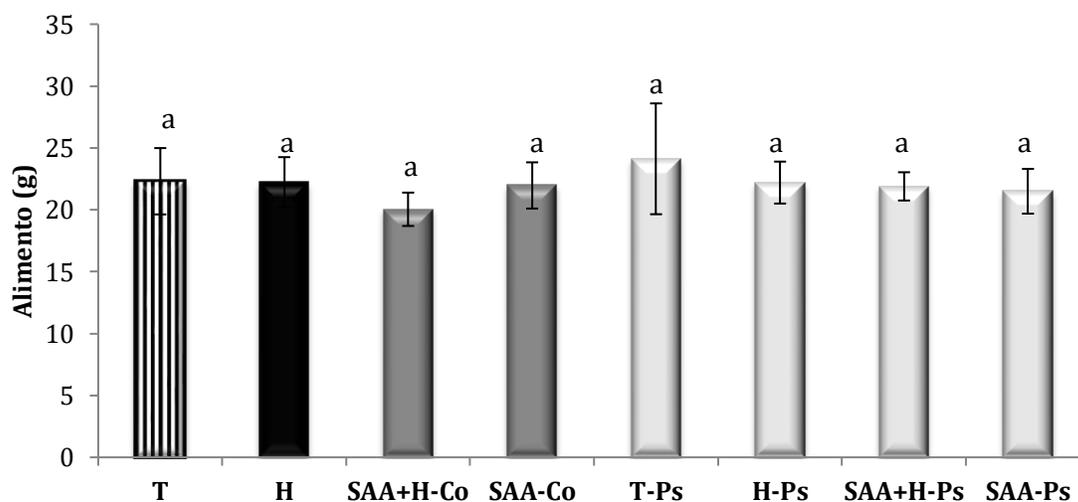


Figura 6.1. Consumo de alimento en promedio por día por grupo. T: grupo testigo sano; H: grupo tratado con haloperidol; T-Ps: testigo sano tratado con aceite de alga rico en omega-3 (6 semanas); H-Ps: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (6 semanas); SAA+H-Ps: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (8 semanas); SAA-Ps: grupo tratado con aceite de alga rico en omega-3 (8 semanas); SAA+H-Co: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (2 semanas); SAA-Co: grupo tratado con aceite de alga rico en omega-3 (2 semanas). Ps: pre-suplementado; Co: co-suplementado.

6.2 Peso corporal.

En la Figura 6.2 se muestra la evolución del peso corporal durante las ocho semanas del experimento. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal de los grupos experimentales, lo que sugiere que el aceite de alga y la inducción con haloperidol no tuvieron un efecto sobre este parámetro.

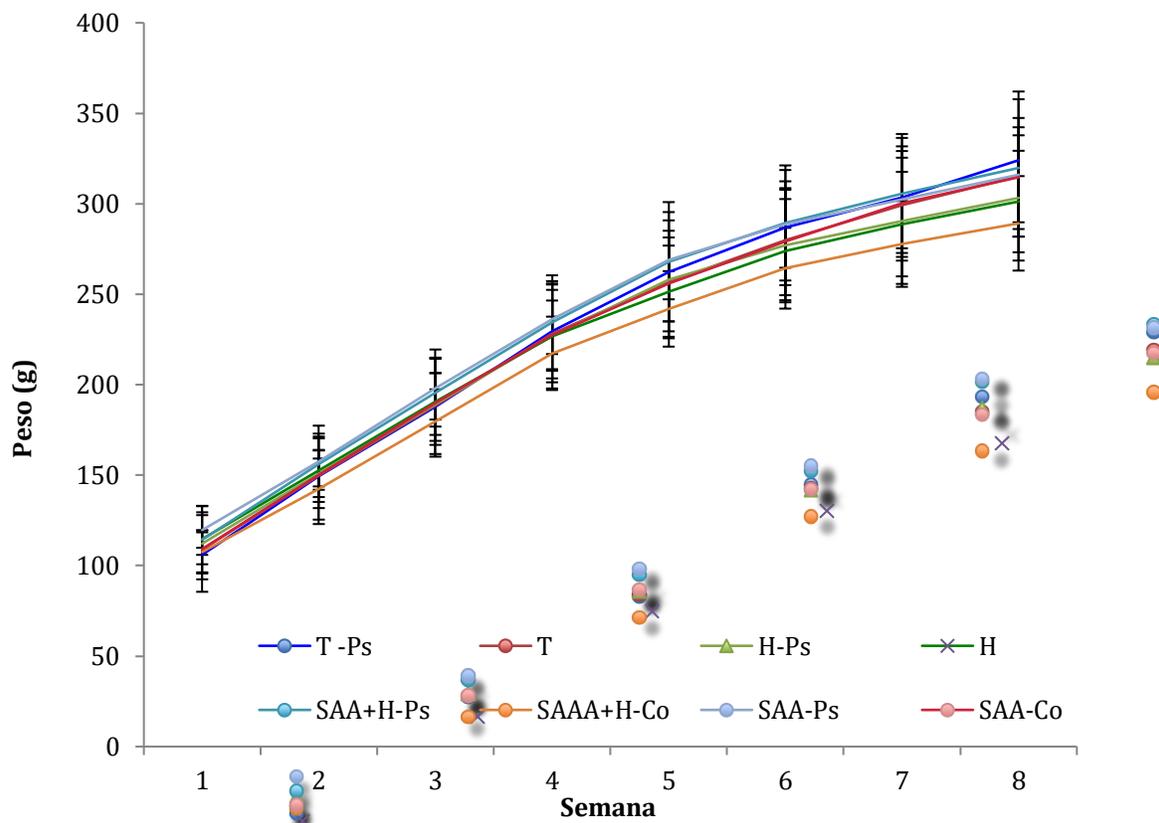


Figura 6.2. Promedio del peso corporal por semana de cada grupo experimental (Pre y Co-suplementados), de la semana uno a la ocho. T: grupo testigo sano; H: grupo tratado con haloperidol; T-Ps: testigo sano tratado con aceite de alga rico en omega-3 (6 semanas); H-Ps: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (6 semanas); SAA+H-Ps: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (8 semanas); SAA-Ps: grupo tratado con aceite de alga rico en omega-3 (8 semanas); SAA+H-Co: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (2 semanas); SAA-Co: grupo tratado con aceite de alga rico en omega-3 (2 semanas). Ps: pre-suplementado; Co: co-suplementado.

Durante el sacrificio de los animales se diseccionó y se pesó el tejido adiposo (epididimal, intercostal y la grasa visceral). Como se observa en la Figura 6.3, no hubo diferencia significativa en el peso del tejido adiposo entre ninguno de los grupos, lo que concuerda con los datos del peso corporal, e indica que la suplementación con el aceite de alga rico en omega-3 y la inducción a parkinsonismo con haloperidol, no indujo a ninguna alteración de la cantidad de tejido adiposo de las ratas.

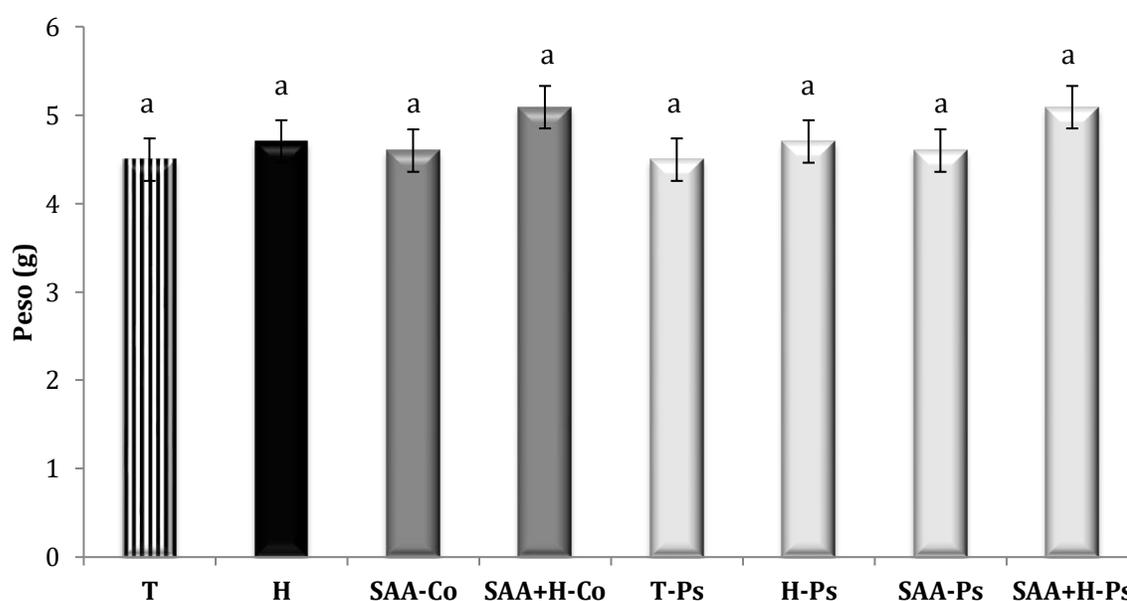


Figura 6.3. Peso total del tejido adiposo (epididimal, intercostal y visceral). T: grupo testigo sano; H: grupo tratado con haloperidol; T-Ps: testigo sano tratado con aceite de alga rico en omega-3 (6 semanas); H-Ps: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (6 semanas); SAA+H-Ps: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (8 semanas); SAA-Ps: grupo tratado con aceite de alga rico en omega-3 (8 semanas); SAA+H-Co: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (2 semanas); SAA-Co: grupo tratado con aceite de alga rico en omega-3 (2 semanas). Ps: pre-suplementado; Co: co-suplementado.

6.3. Temblores mandibulares.

Los temblores mandibulares fueron analizados, y se puede observar en la figura 6.4 que se presentaron en los dos grupos inducidos a parkinsonismo experimental con haloperidol, lo que corroboró que la administración de este compuesto en una dosis de 1.5 mg/kg induce a temblores mandibulares conductualmente similares a los descritos por Salamone *et al.* (1998), en animales con manipulación dopaminérgica. Esta condición genera ráfagas periódicas de oscilaciones verticales de la mandíbula inferior sin que estén dirigidas hacia algún estímulo en particular.

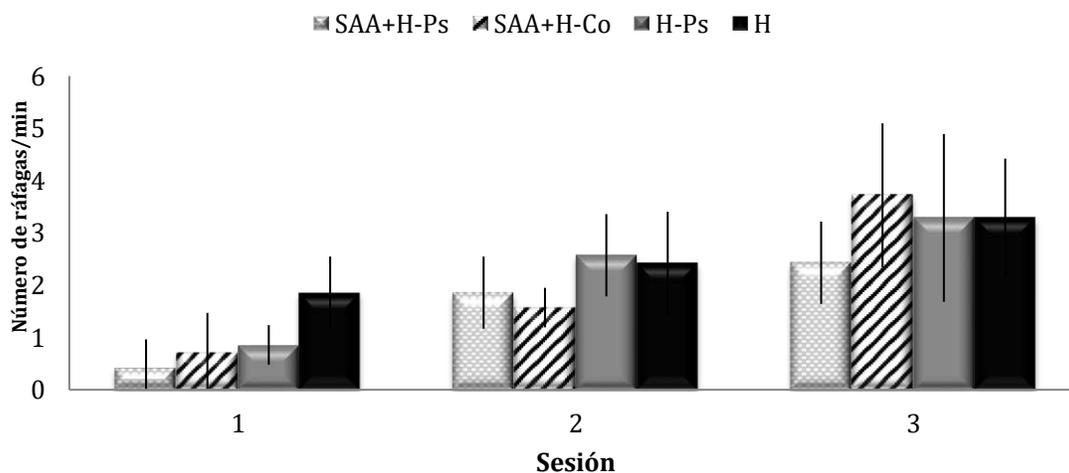


Figura 6.4. Número de rafagas mandibulares por minuto. H: grupo tratado con haloperidol; H-Ps: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (6 semanas); SAA+H-Ps: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (8 semanas); SAA+H-Co: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (2 semanas);. Ps: pre-suplementado; Co: co-suplementado.

En la Figura 6.4 se puede observar que no hay diferencias significativas en cada sesión en el número de ráfagas (temblores), pero en un trabajo paralelo en la Universidad Veracruzana, realizaron las mediciones de los temblores mandibulares mediante electromiografía, donde se pudo observar que tanto en el grupo H, H-Ps SAA+H-Co y SAA+H-Ps, presentan temblores mandibulares, pero con características diferentes en frecuencia y amplitud. Esta variabilidad puede ser atribuible al aceite de alga rico en omega-3 que está actuando como neuroprotector, ya que, aunque no

disminuyó por completo el número de temblores mandibulares por minuto, disminuyó la frecuencia y amplitud en ratas pre-suplementadas (Herrera-Meza, datos no publicados).

6.4 Prueba de campo abierto.

Para analizar el efecto de los tratamientos sobre la actividad locomotriz espontánea de las ratas se utilizó la prueba de campo abierto, la cual es ampliamente utilizada en la investigación básica para evaluar la conducta de ratas en condiciones normales, tratamientos con fármacos o situaciones estresantes. Con esta prueba es posible descartar o identificar alteraciones motrices asociadas a las manipulaciones experimentales a las que ha sido sometida la rata (Prut *et al.*, 2002; Thanos *et al.*, 2016).

Durante toda la fase experimental se realizaron seis grabaciones a cada rata, las primeras dos fueron descartadas para el análisis estadístico ya que se tomaron como pre-prueba y las cuatro siguientes fueron: al inicio del experimento (semana 1), en la semana tres, un día antes de la administración de haloperidol (Sesión 1), el primer día cuatro horas después del tratamiento con haloperidol (Sesión 2), el día 7 (Sesión 3) y el día 14 (Sesión 4). Todas las grabaciones se realizaron en el mismo horario.

6.4.1 Prueba de campo abierto: conducta vertical.

Para evaluar la conducta vertical se consideró el tiempo que el animal estuvo sobre sus patas traseras durante los 5 min que duró la prueba de campo abierto. Los resultados de los grupos experimentales se expresaron calculando el porcentaje de tiempo tomando como 100 % el del grupo testigo.

El promedio en que las ratas se mantienen en posición vertical mostró diferencia significativa al comparar entre las sesiones y los grupos experimentales Ps y Co. La interacción entre las sesiones para los grupos experimentales mostró diferencia en los porcentajes para el registro de la conducta vertical a partir de la S2 en los dos

grupos experimentales. De igual forma la interacción sesión/grupos (T, H, SAA+H y SAA) mostró contraste a partir de la S2, ya que en la S1 fue realizada un día antes de la inducción a parkinsonismo y no muestran diferencia significativa (Figura 6.5). Los grupos T, T-Ps y SAA (ambos grupos experimentales Ps y Co), no mostraron cambios significativos de esta conducta durante todas las sesiones, ya que no fueron inducidos a parkinsonismo experimental.

En el grupo experimental pre-suplementado tratado con haloperidol (H-Ps) y en el pre-suplementado SAA+H-Ps, el porcentaje de tiempo en posición vertical disminuyó hasta el 66 % y 67 %, respectivamente, en promedio de las tres sesiones, en comparación con el grupo experimental co-suplementado en el que el porcentaje de tiempo en posición vertical fue del 6 % (Figura 6.5). Estos resultados indican, por una parte, que el haloperidol durante dos semanas alteró significativamente la motivación, analizada a través de la conducta vertical, y que la suplementación con aceite de alga ejerció un efecto protector ante la inducción a parkinsonismo con el haloperidol. Por el contrario, en el grupo co-suplementado SAA+H-Co, la conducta disminuyó a alrededor del 10 % en las dos primeras sesiones, pero aumentó al 38 % en la última sesión, lo que se puede deber a la suplementación con el aceite de alga que, en la última sesión ya era de dos semanas (Figura 6.5).

La pre-suplementación con el aceite de alga en ratas sin haloperidol (SAA-Ps) no provocó cambios en la conducta vertical, siendo semejante al grupo testigo. En el grupo co-suplementado sin haloperidol, se observó una disminución al 53 % en la primera sesión, pero, a partir de la segunda, la conducta no fue significativamente diferente del testigo. Esto sugiere que el aceite de alga afecta la conducta al inicio de la administración, pero una vez que la rata se habitúa a él, la conducta vertical no se ve alterada (Figura 6.5).

En resumen, estos resultados indican que el tratamiento con haloperidol disminuye significativamente la motivación de las ratas, medida a través de la conducta vertical, debido a los efectos que causa a nivel del cerebro medio (Vasconcelos *et al.*, 2003). Además, la administración de aceite de alga tiene un efecto protector sobre los

efectos del haloperidol, en especial en las ratas que recibieron la pre-suplementación por seis semanas, y que se empieza a observar en el grupo co-suplementado después de dos semanas de suplementación.

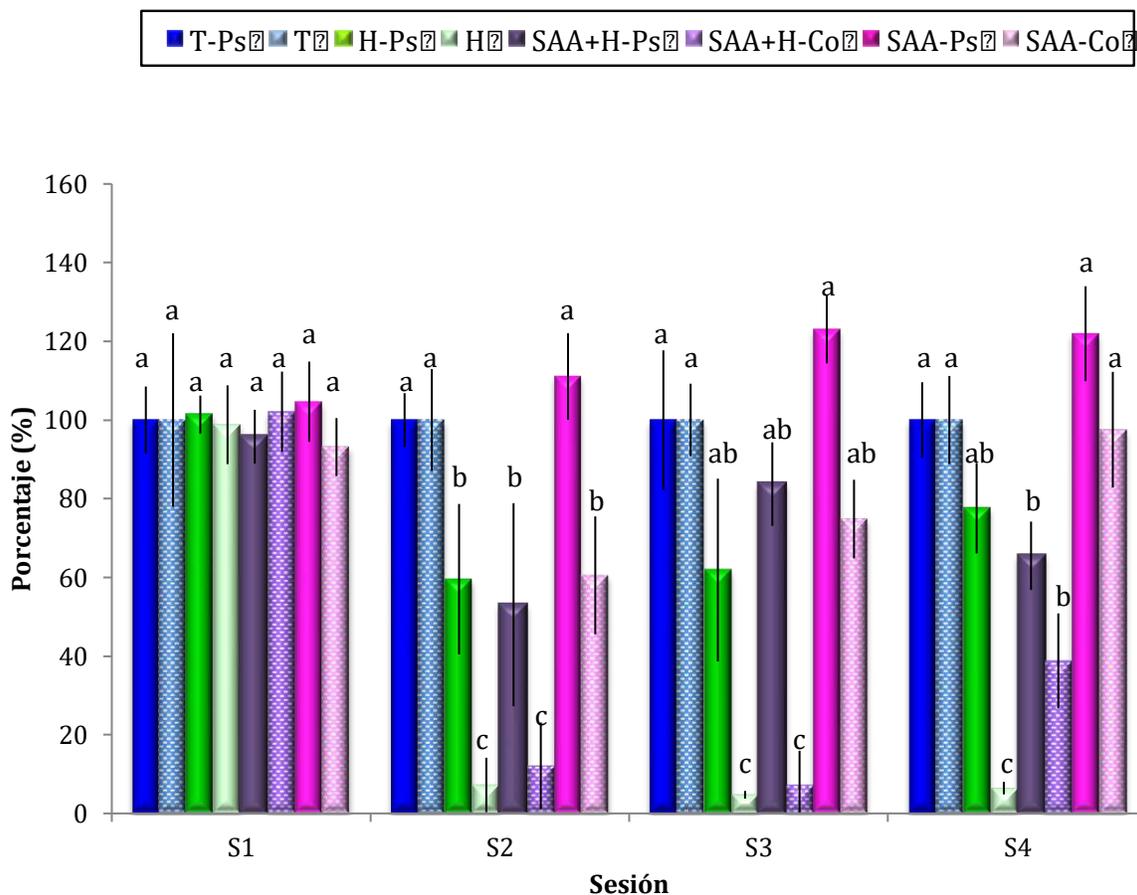


Figura 6.5. Porcentaje de tiempo transcurrido en posición vertical respecto al testigo (T=100 %), durante la prueba de campo abierto. Los valores fueron expresados como media \pm desviación estándar (SE). S1: sesión 1 (un día antes del inicio a la inducción a parkinsonismo con haloperidol); S2: sesión 2 (día 1*); S3: sesión 3 (día 7*); S4: sesión 4 (día 14*). T: grupo testigo sano; H: grupo tratado con haloperidol; T-Ps: testigo sano tratado con SAA (6 semanas); H-Ps: grupo tratado con haloperidol y SAA (6 semanas); SAA+H-Ps: grupo tratado con haloperidol y SAA (8 semanas); SAA-Ps: grupo tratado con SAA (8 semanas); SAA+H-Co: grupo tratado con haloperidol y SAA (2 semanas); SAA-Co: grupo tratado con SAA (2 semanas). SAA: aceite de alga rico en omega-3; Ps: pre-suplementado; Co: co-suplementado. *Todas las grabaciones se realizaron cuatro horas después del tratamiento con haloperidol. Letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos, $p < 0.05$.

6.4.2 Prueba de campo abierto: conducta horizontal.

En la conducta horizontal se consideró también el porcentaje en que el animal realizó esta conducta durante los 5 min que duró la prueba de campo abierto y el mismo número de sesiones. El porcentaje en que las ratas se mantuvieron en posición horizontal fue significativo al comparar entre las sesiones y grupos experimentales Ps y Co, al igual que hubo una diferencia marcada partir de la segunda sesión entre los grupos de cada uno de ellos, que es el inicio a la inducción a parkinsonismo experimental con haloperidol, ya que como se observa en la Figura 6.6, en la S1 no hubo diferencias entre grupos en el promedio de la conducta horizontal. Los grupos T y T-Ps no mostraron cambios significativos de esta conducta horizontal durante todas las sesiones ya que no recibieron la dosis de haloperidol; además, demuestra que esta conducta no se ve afectada por una suplementación con aceite de alga rico en omega-3.

En el grupo SAA pre-suplementado no se observaron cambios en el comportamiento horizontal en las cuatro sesiones, a diferencia del grupo SSA co-suplementado, donde se encontró un aumento de la actividad horizontal en la sesión 1 y 3. Dado que en la sesión 1 las ratas de este grupo no han recibido ninguna intervención, la elevada actividad horizontal podría ser una característica natural de las ratas de este grupo; en la sesión 2 y 3 la elevada actividad horizontal se ve de alguna manera compensada por una menor actividad vertical (Figura 6.6).

A partir de la S2, en el grupo H-Ps se mostró un porcentaje de tiempo en actividad horizontal del 52 % en promedio, comparado con el 100 % del grupo testigo (T), mientras que el grupo H estuvo un 22 % del tiempo, en promedio, en actividad horizontal. Estos resultados indican que la suplementación durante seis semanas con el aceite de alga rico en omega-3 atenuó el efecto inhibitor de la conducta horizontal ejercido por el haloperidol, manteniendo a las ratas con mayor motivación en esta conducta comparadas con las ratas que solo fueron co-suplementadas durante dos semanas (Figura 6.6).

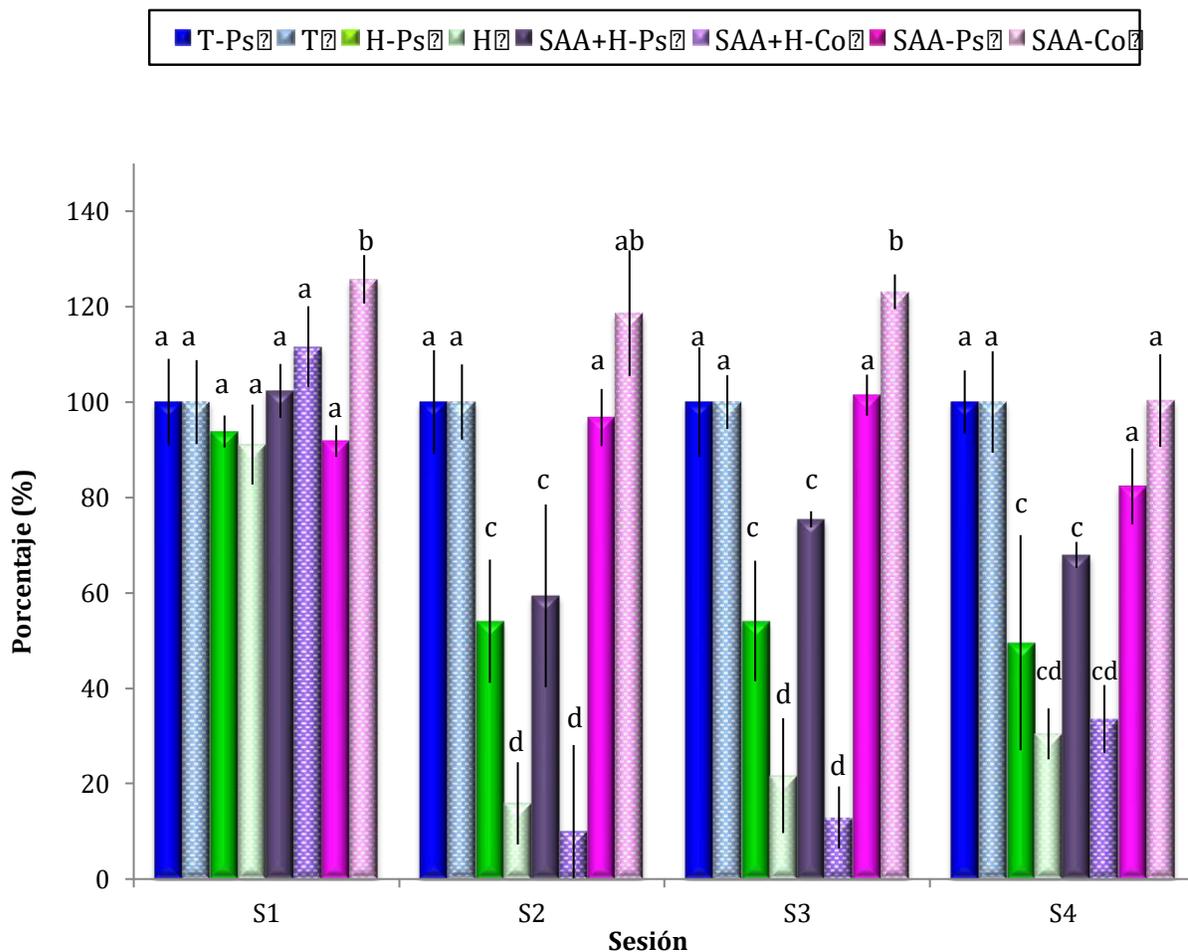


Figura 6.6. Porcentaje de la conducta horizontal durante la prueba de campo abierto de todos los grupos por cada sesión, los valores fueron expresados como media \pm desviación estándar (SE). S1: sesión 1 (un día antes del inicio a la inducción a parkinsonismo con haloperidol); S2: sesión 2 (día 1*); S3: sesión 3 (día 7*); S4: sesión 4 (día 14*). T: grupo testigo sano; H: grupo tratado con haloperidol; T-Ps: testigo sano tratado con SAA (6 semanas); H-Ps: grupo tratado con haloperidol y SAA (6 semanas); SAA+H-Ps: grupo tratado con haloperidol y SAA (8 semanas); SAA-Ps: grupo tratado con SAA (8 semanas); SAA+H-Co: grupo tratado con haloperidol y SAA (2 semanas); SAA-Co: grupo tratado con SAA (2 semanas). SAA: aceite de alga rico en omega-3; Ps: pre-suplementado; Co: co-suplementado. *Todas las grabaciones se realizaron cuatro horas después del tratamiento con haloperidol. Letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos, $p < 0.05$.

El mismo efecto se encontró en los grupos SAA+H-Ps y SAA+H-Co; en la Figura 6.6 se puede observar que hay una diferencia significativa entre ambos, mostrando que el grupo SAA+H-Ps, que estuvo suplementado con el aceite durante ocho semanas tuvo un 67 % en promedio, de actividad horizontal, mientras el grupo SAA+H-Co, que

solo se suplementó las últimas dos semanas, disminuyó la actividad al 18 %, en promedio, y se observó un ligero aumento, aunque no estadísticamente significativo en la última sesión. Nuevamente, estos resultados sugieren que la administración del aceite de alga atenúa el efecto que provoca en haloperidol a nivel cerebral, manteniendo una mayor motivación de los sujetos pre-suplementados a realizar las conductas de exploración (vertical y horizontal) en comparación con los que no recibieron la suplementación, o sólo la recibieron por dos semanas.

6.4.3 Prueba de campo abierto: tiempo total de inmovilidad de la rata.

Para la inmovilidad se consideró el tiempo total que el animal estuvo quieto durante los 5 min que duró la prueba de campo abierto. El tiempo total en que las ratas se mantuvieron inmóviles fue diferente al comparar entre las sesiones y grupos experimentales Ps y Co, y hubo una diferencia significativa entre algunos de los grupos (H y SAA+H). Estos cambios se observaron a partir de la segunda sesión, como en las demás conductas, que es el inicio a la inducción a parkinsonismo experimental con haloperidol, ya que en la S1 todos los sujetos tuvieron un tiempo en inmovilidad sin diferencia estadística entre los grupos (Figura 6.7).

A partir de la S2 los grupos T, T-Ps y SAA (ambos grupos experimentales Ps y Co) mostraron un porcentaje de tiempo en inmovilidad similar, lo que indica que la suplementación o co-suplementación con el aceite de alga no afectó esta conducta (Figura 6.7).

Los grupos H, SAA+H-Co, H-Ps y SAA+H-Ps mostraron diferencias significativas con respecto al testigo (T), pudiéndose observar que dentro del grupo experimental Co, el grupo SAA+H-Co fue el que tuvo mayor tiempo en inmovilidad (197 s, en promedio) y el grupo tratado solo con haloperidol también mostró mayor tiempo de inmovilidad (221 s en promedio), lo que indica que el haloperidol está ocasionando un daño a nivel cerebral y que una co-suplementación de dos semanas con aceite de alga rico en omega-3 (SAA+H-Co) no logra revertir este daño, ya que se observa que no hay

una diferencia significativa en el tiempo de inmovilidad, por lo tanto no llega a atenuar el efecto que puede tener el haloperidol en la rata (Figura 6.7).

En contraste, en el grupo experimental Ps, los grupos H-Ps y SAA+H-Ps estuvieron un menor tiempo en inmovilidad (66 s y 91 s, respectivamente), sin diferencia significativa con el testigo pero sí con los grupos H y SAA+H-Co, por lo que se sugiere que una pre-suplementación con aceite de alga rico en omega-3 atenuó el efecto que ocasiona el haloperidol (Figura 6.7).

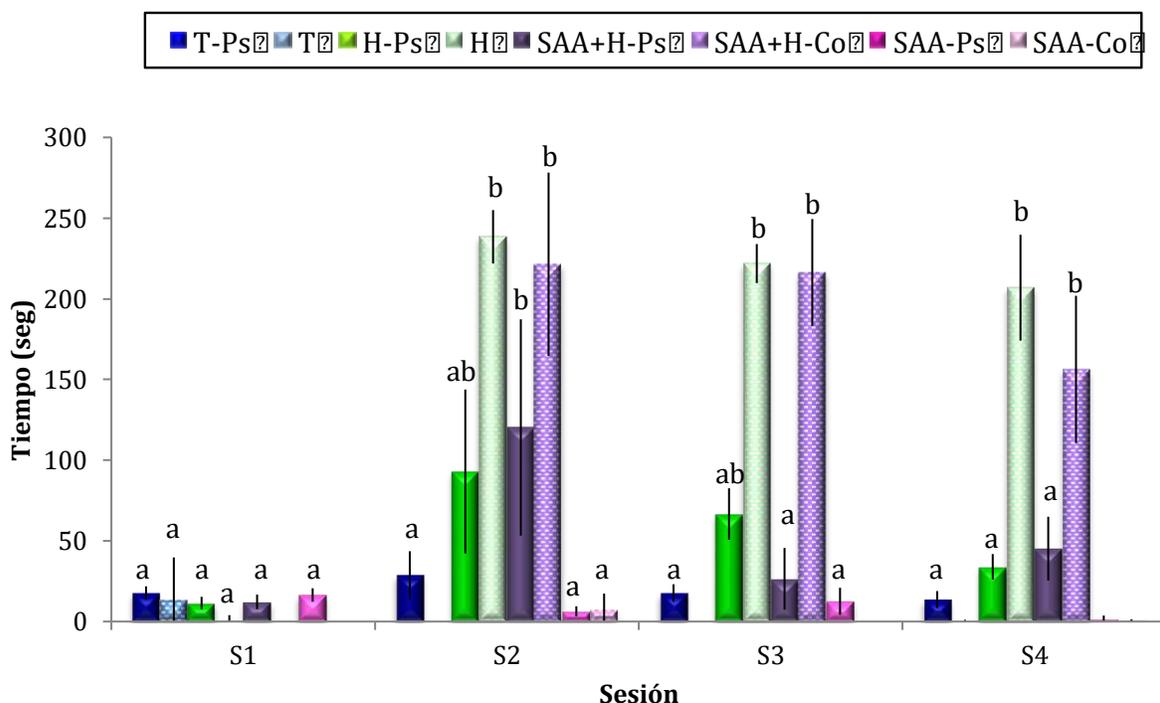


Figura 6.7. Tiempo (s) total de inmovilidad durante la prueba de campo abierto de todos los grupos por cada sesión, los valores fueron expresados como media \pm desviación estándar (SE). S1: sesión 1 (un día antes del inicio a la inducción a parkinsonismo con haloperidol); S2: sesión 2 (día 1*); S3: sesión 3 (día 7*); S4: sesión 4 (día 14*). T: grupo testigo sano; H: grupo tratado con haloperidol; T-Ps: testigo sano tratado con SAA (6 semanas); H-Ps: grupo tratado con haloperidol y SAA (6 semanas); SAA+H-Ps: grupo tratado con haloperidol y SAA (8 semanas); SAA+H-Co: grupo tratado con haloperidol y SAA (2 semanas); SAA-Ps: grupo tratado con SAA (8 semanas); SAA-Co: grupo tratado con SAA (2 semanas). SAA: aceite de alga rico en omega-3; Ps: pre-suplementado; Co: co-suplementado. *Todas las grabaciones se realizaron cuatro horas después del tratamiento con haloperidol. Letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos, $p < 0.05$.

En conclusión, en la conducta vertical, horizontal e inmovilidad, no se muestran diferencias estadísticamente significativas en los grupos pre-suplementados y co-suplementados antes del inicio a la inducción de parkinsonismo con haloperidol (de la semana uno a la seis). Posteriormente a la inducción (semana siete y ocho), la pre-suplementación (6 y 8 semanas) con aceite de alga rico en ácidos grasos omega-3 inhibe parcialmente el impacto del haloperidol sobre la conducta, lo que no se observa con una co-suplementación (dos semanas). Este efecto puede ser el resultado de una neuroprotección ejercida por los ácidos grasos omega-3 (Barros *et al.*, 2017), y sugiere que el consumo de estos ácidos grasos podría ser una estrategia nutracéutica para retrasar el inicio y/o la progresión de la enfermedad de parkinson; sin embargo, se necesitan más estudios para poder entender los mecanismos neuroprotectores de los ácidos grasos omega-3.

6.4.4 Frecuencia de campo abierto: número de cuadros cruzados.

Para determinar el número de cuadros cruzados, se midieron todas las veces que el animal cruzó un cuadro (cuando tres cuartas partes de su cuerpo se encontraba en el cuadro siguiente), durante los 5 min que duró la prueba. El análisis encontró que el número de cuadros cruzados varió entre las sesiones (grupo Pre-suplementado y Co-suplementado).

En la Figura 6.8 se puede observar que, durante la S1, las ratas de todos los grupos cruzaron 85 cuadros en promedio en 5 min, sin diferencias significativas. Este mismo comportamiento se observó en los grupos T, T-Ps, SSA-Ps, y SSA-Co a lo largo de las sesiones 2-4.

Los grupos H y SAA+H-Co cruzaron un menor número de cuadros (entre 2 y 3) a partir del inicio de la administración del haloperidol (S2), y hasta el final del experimento (S3 y S4), en contraste con los grupos H-Ps y SAA+H-Ps, que cruzaron entre 22 y 37 cuadros. Nuevamente, se confirma que la inducción a parkinsonismo

con haloperidol tiene un efecto negativo sobre la movilidad de las ratas, y que este efecto se ve atenuado significativamente por la pre-suplementación, durante 6 y 8 semanas, con aceite de alga rico en ácidos grasos omega-3, pero que la co-suplementación por dos semanas no es suficiente para contrarrestar el efecto del haloperidol.

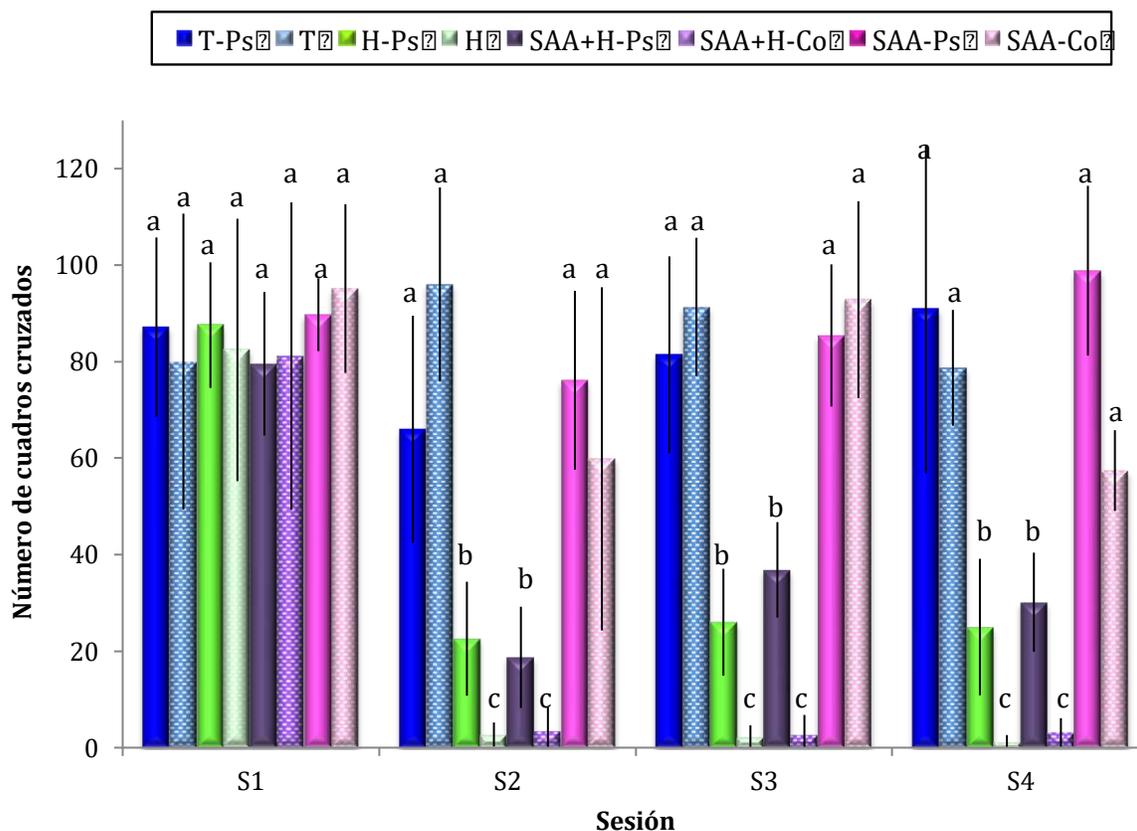


Figura 6.8. Número de cuadros cruzados durante la prueba de campo abierto. Los valores fueron expresados como media \pm desviación estándar (SE). S1: sesión 3 (un día antes del inicio a la inducción a parkinsonismo con haloperidol); S2: sesión 4 (día 1*); S3: sesión 5 (día 7*); S4: sesión 6 (día 14*). T: grupo testigo sano; H: grupo tratado con haloperidol; T-Ps: testigo sano tratado con SAA (6 semanas); H-Ps: grupo tratado con haloperidol y SAA (6 semanas); SAA+H-Ps: grupo tratado con haloperidol y SAA (8 semanas); SAA-Ps: grupo tratado con SAA (8 semanas); SAA+H-Co: grupo tratado con haloperidol y SAA (2 semanas); SAA-Co: grupo tratado con SAA (2 semanas). SAA: aceite de alga rico en omega-3; Ps: pre-suplementado; Co: co-suplementado. *Todas las grabaciones se realizaron cuatro horas después del tratamiento con haloperidol. Letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos, $p < 0.05$.

Los anteriores resultados indican que la suplementación previa (6 semanas) con aceite de alga rico en omega-3 tiene un efecto neuroprotector sobre la alteración de la actividad locomotriz y la acinesia, uno de los principales síntomas motores de la enfermedad de Parkinson. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Tanriover *et al.* (2010) quienes evaluaron los efectos del DHA en un modelo de parkinsonismo inducido por una lesión de MPTP, donde demostraron un deterioro en la actividad motora en el modelo, y la administración del DHA (36 mg/kg/día) durante 30 días redujo los síntomas, a pesar de que el MPTP es más agresivo que el haloperidol, ya que destruye gran parte de las células dopaminérgicas. También Ozkan *et al.* (2016) midieron la actividad locomotora en un modelo animal de EP inducido con MPTP, encontrando que la actividad locomotora mejoraba en los grupos que tenían una suplementación de DHA (36 mg/kg/día) el cual se administró durante 30 días, lo que demuestra el efecto positivo del DHA sobre las funciones motoras en el modelo experimental de EP inducida por MPTP.

En otro estudio donde se evaluó la acción de los ácidos grasos sobre los déficits motores en un modelo de EP inducido por una inyección de 6-OHDA. Los animales que no tuvieron una suplementación mostraron una degeneración de las neuronas del sistema nigroestriatal, reduciendo la actividad locomotora y exploratoria (mediate la prueba de campo abierto) y manifestando temblores parkinsonianos. Sin embargo, una suplementación que empezó cuando los animales tenían 21 días de vida hasta 90 días, con un suplemento de aceite de pescado (4 g/kg), que contenía EPA (120 mg) y DHA (180 mg) no modificó estos déficits motores, lo que puede deberse a que muchas regiones del complejo estriatal pueden estar degeneradas y éstas están involucradas directamente con la reducción de neuronas dopaminérgicas incluso con la participación del DHA en muchas funciones importantes, como la regulación de los procesos inflamatorios, la transcripción génica y la influencia directa en las propiedades de la membrana. Este estudio muestra que a pesar de que hubo una incorporación de ácidos grasos omega-3 en las membranas neuronales, no fue capaz de revertir los déficits motores causados por la inyección de neurotoxinas, ya

que este modelo causa una lesión inmediata y no reproduce un modelo lento y gradual que pueda imitar el desarrollo real de la degeneración de la EP (Delattre *et al.*, 2010).

El modelo con haloperidol utilizado en el presente trabajo puede representar una fase temprana de la EP, ya que es un modelo reversible, y los resultados obtenidos demuestran que una suplementación previa con ácidos grasos omega-3 (grupos H-Ps y SAA+H-Ps) previene parcialmente el deterioro de la actividad locomotora ejercida por el haloperidol, en comparación con los grupos que no tuvieron esta suplementación previa (H y SAA+H-Co). Estos hallazgos indican los efectos positivos de una suplementación rica en ácidos grasos omegas-3 sobre los déficits motores en un modelo experimental de parkinsonismo inducido por haloperidol.

6.5 Perfil de ácidos grasos del cerebro.

Se determinó el perfil de ácidos grasos del aceite de alga y del cerebro de las ratas por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, después de realizar la metilación de los lípidos extraídos por el método modificado de Folch (Folch, 1957).

6.5.1 Composición de ácidos grasos del suplemento de aceite de alga.

El suplemento de aceite de alga rico en omega-3 (SAA) es un polvo blanco con una concentración aproximada de 30% de aceite de alga (Anexo F). En la Tabla 6.1 se puede observar que el aceite contiene, en promedio, 0.83% de ácido linolénico (ALA), 10% de ácido docosahexaenoico (DHA), 7% de ácido docosapentanoico (DPA) y 0.7% de ácido eicosapentanoico (EPA), lo que hace un total de 19.6% de ácidos grasos omega-3.

Tabla 6.1. Perfil de ácidos grasos del aceite de alga rico en omega-3 del suplemento Life's DHA™ S10-P200 de Grupo Harmony.

Compuesto	(%)
Ácido Mirístico (C14:0)	8.94
Ácido Palmítico (C16:0)	35.79
Ácido Palmitoleico (C16:1)	0.27
Ácido Esteárico (C18:0)	14.25
Ácido Oléico (C18:1)	13.78
Isomero Ácido Oleico	1.61
Ácido Linoléico (C18:2)	2.65
Ácido Linolénico (C19:3)	0.83
Ácido Araquídico (C20:0)	0.18
Ácido Behénico (C22:0)	0.68
Ácido Araquidónico (C20:0)	2.19
EPA (C20:5)	0.70
DPA (C22:5)	7.24
DHA (C22:6)	10.88
*Omega-3	19.65

6.5.3 Perfil de ácidos grasos del cerebro de las ratas de los grupos experimentales.

En este estudio se evaluó el perfil de los ácidos grasos de la corteza frontal y occipital de los grupos experimentales de ratas pre-suplementación y co-suplementación.

En la Tabla 6.2 se muestra el perfil de ácidos grasos de las ratas que fueron pre-suplementadas con aceite de alga rico en omega-3 durante seis semanas previas a la inducción a parkinsonismo experimental. Se observa que no hubo diferencias significativas en el porcentaje de ácidos grasos entre los grupos. El ácido graso mayoritario fue el ácido palmítico (16:0), seguido por el esteárico (18:0) y el DHA (22:6, n-3), y se observa un enriquecimiento de las membranas del cerebro con ácidos grasos omega-3, ya que tuvieron, en promedio, un total de 21.9% de estos ácidos grasos. Durante la semana siete y ocho se les dejó de administrar el SAA a los grupos pre-suplementados H-Ps y SAA+H-Ps, observándose que no hay diferencia significativa en el contenido de ácidos grasos entre los grupos (T, H, SAA+H y SAA), lo que indica que dejar de administrar el suplemento a los dos grupos (H y SAA+H) por dos semanas no se ve afectada la composición de lípidos de las membranas neuronales de la corteza frontal y occipital (Tabla 6.2).

En la Tabla 6.2 también se pueden observar los porcentajes de ácidos grasos de los cerebros de las ratas de los grupos experimentales co-suplementados, sin diferencias significativas entre los grupos (SAA+H y SAA). Nuevamente, el ácido graso mayoritario fue el ácido palmítico (16:0), seguido por el esteárico (18:0) y por el oleico (18:1). En este caso, los cerebros de las ratas tuvieron una menor proporción de ácidos grasos omega-3 (6.8% en promedio), en comparación con los grupos pre-suplementados.

Las diferencias significativas producidas por la pre-suplementación rica en omega-3 en los grupos T, H, SAA+H y SAA, incluyeron un mayor contenido de DHA (22:6 n-3), de 15% en promedio en los grupos pre-suplementados vs 6.4% en promedio en los grupos co-suplementados (aumento de 2.5 veces); de DPA (22:5), de 6.1% vs 0.3%, en promedio (aumento de 20 veces); de EPA (20:5) de 0.61% vs 0.02%, en promedio (aumento de 30 veces); y de ALA (18:3) de 0.15% vs 0.06%, en promedio (aumento de 2.5 veces); y un menor contenido de AA (20:4, n-6), de 2% vs 4.3%, en promedio (disminución del 46%) (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Perfil de ácidos grasos de la corteza frontal y occipital de los grupos experimentales de ratas Pre-suplementadas y Co-suplementadas.

Compuesto	T (%)	H (%)	SAA-Co (%)	SAA+H-Co (%)	T-Ps(%)	H-Ps (%)	SAA-Ps (%)	SAA+H-Ps(%)
Ácido Mirístico (C14:0)	1.43 ± 0.38 ^a	1.17 ± 0.14 ^a	1.22 ± 0.25 ^a	1.38 ± 0.42 ^a	8.92 ± 0.40 ^b	8.74 ± 0.64 ^b	8.54 ± 0.49 ^b	8.53 ± 0.84 ^b
Ácido Palmítico (C16:0)	36.91 ± 0.58 ^a	36.35 ± 1.38 ^a	36.21 ± 1.26 ^a	37.32 ± 2.63 ^a	31.77 ± 0.77 ^a	32.49 ± 2.68 ^a	34.34 ± 2.02 ^a	32.2 ± 2.53 ^a
Ácido Palmitoleico (C16:1)	0.29 ± 10.06 ^a	0.28 ± 0.04 ^a	0.29 ± 0.02 ^a	0.29 ± 0.04 ^a	0.24 ± 0.01 ^a	0.24 ± 0.03 ^a	0.24 ± 0.01 ^a	0.24 ± 0.04 ^a
Ácido Esteárico (C18:0)	24.69 ± 1.6 ^a	25.77 ± 1.49 ^a	25.73 ± 2.34 ^a	25.76 ± 3.67 ^a	15.85 ± 1.12 ^b	15.4 ± 2.66 ^b	15.49 ± 2.56 ^b	15.5 ± 2.63 ^b
Ácido Oléico (C18:1)	17.58 ± 1.72 ^a	17.4 ± 1.13 ^a	16.1 ± 0.56 ^a	16.85 ± 2.28 ^a	13.74 ± 1.11 ^b	13.36 ± 1.04 ^b	12.83 ± 0.66 ^b	13.25 ± 1.22 ^b
Isomero Ácido Oléico	3.03 ± 0.92 ^a	3.63 ± 0.32 ^a	4.17 ± 1.90 ^a	3.21 ± 0.33 ^a	1.67 ± 0.08 ^b	1.67 ± 0.10 ^b	1.64 ± 0.10 ^b	1.71 ± 0.12 ^b
Ácido Linoleico (C18:2)	2.39 ± 0.63 ^a	2.04 ± 0.22 ^a	1.67 ± 0.26 ^a	1.83 ± 0.79 ^a	2.53 ± 0.07 ^a	2.46 ± 0.26 ^a	2.4 ± 0.19 ^a	2.59 ± 0.37 ^a
El ácido Araquídico (C20:0)	1.38 ± 0.05 ^a	1.31 ± 0.11 ^a	1.2 ± 0.15 ^a	1.22 ± 0.24 ^a	0.74 ± 0.08 ^b	0.75 ± 0.09 ^b	0.73 ± 0.06 ^b	0.78 ± 0.10 ^b
Ácido Linolénico (C18:3)*	0.07 ± 0.03 ^a	0.06 ± 0.02 ^a	0.05 ± 0.02 ^a	0.06 ± 0.03 ^a	0.15 ± 0.01 ^b	0.16 ± 0.01 ^b	0.15 ± 0.01 ^b	0.16 ± 0.02 ^b
Ácido Behénico (C22:0)	0.97 ± 0.07 ^a	0.96 ± 0.08 ^a	0.99 ± 0.04 ^a	1.02 ± 0.12 ^a	0.62 ± 0.09 ^b	0.62 ± 0.08 ^b	0.6 ± 0.06 ^b	0.64 ± 0.08 ^b
Ácido Araquidónico (C20:4)	4.2 ± 0.23 ^a	4.23 ± 0.22 ^a	4.24 ± 0.38 ^a	4.5 ± 0.55 ^a	2.01 ± 0.12 ^b	2.02 ± 0.24 ^b	1.96 ± 0.18 ^b	2.1 ± 0.29 ^b
EPA (C20:5)*	0.02 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.00 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.00 ^a	0.64 ± 0.07 ^b	0.61 ± 0.08 ^b	0.6 ± 0.06 ^b	0.62 ± 0.09 ^b
DPA (C22:5)*	0.28 ± 0.04 ^a	0.26 ± 0.06 ^a	0.37 ± 0.22 ^a	0.28 ± 0.11 ^a	5.93 ± 0.92 ^b	6.25 ± 1.03 ^b	5.82 ± 1.07 ^b	6.4 ± 1.05 ^b
DHA (C22:6)*	5.94 ± 0.35 ^a	5.85 ± 0.49 ^a	7.66 ± 0.96 ^a	6.2 ± 1.03 ^a	15.15 ± 0.53 ^b	15.18 ± 1.21 ^b	14.6 ± 1.82 ^b	15.21 ± 1.00 ^b
Total omega-3*	6.31	6.19	8.11	6.56	21.87	22.17	21.17	22.39
Relación n-3 / n-6	0.95	0.98	1.3	1.03	4.8	4.9	4.8	4.7

**Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar (n=7). Diferentes letras significan diferencia estadística entre grupos (p <0.05). T: grupo testigo; H: grupo tratado con haloperidol; SAA+H: grupo tratado con aceite de alga rico en omega-3 y haloperidol; SAA: grupo tratado con aceite de alga rico en omega-3. Ps: pre-suplementado; Co: co-suplementado.

Existen varios mecanismos interconectados que pueden ser la base de los efectos beneficiosos de los AGPI omega-3 que se basan en su incorporación a las membranas celulares, en particular el EPA y DHA. Es por ello por lo que se observó un aumento de 3,5 veces de AGPI omega-3 en las membranas cerebrales de las ratas pre-suplementadas.

Mediante este estudio se demuestra que una suplementación previa de ácidos grasos omega-3 modifica significativamente el contenido de ácidos grasos en las membranas neuronales de la corteza fronal y occipital en ratas. Este efecto altamente significativo confirma que el perfil lipídico del cerebro en los mamíferos depende de la ingesta dietética, como ha sido sugerido previamente (Barros *et al.*, 2017).

El aumento de DHA en este estudio concuerda con Bousquet *et al.* (2007), quienes, al evaluar los efectos beneficiosos de los ácidos grasos omega-3 en un modelo de parkinsonismo inducido por MPTP, encontraron un aumento selectivo de los niveles de DHA en la corteza frontal, y una disminución de los niveles de los ácidos grasos omega-6. La relación n-3:n-6 también se redujo en un 40% después del tratamiento con la neurotoxina, mientras que los ácidos grasos linoléico, EPA y AA se mantuvieron sin cambio.

Diversas investigaciones se han enfocado en los ácidos grasos omega-3 debido a que pueden ejercer una acción neuroprotectora, como el estudio de Bousquet *et al.* (2008) quienes administraron a ratones una dieta alta de omega-3 durante 10 meses, y luego fueron tratados con la neurotoxina MPTP (140 mg / kg) durante 5 días. El alto consumo de ácidos grasos omega-3 mostró efectos benéficos sobre la degeneración neuronal a nivel de la corteza frontal debido a la neurotoxina MPTP.

En otras investigaciones, donde el tratamiento previo de las ratas fue con aceite de pescado (que es rico en omega -3) durante 25 días antes del tratamiento con 6-OHDA mitiga la pérdida de neuronas DA de la *substantia nigra* (Mori *et al.*, 2018; Xicoy *et al.*, 2019).

Delattre *et al.* (2010) también se demostró un incremento en el contenido de DHA de las membranas neuronales (estriado y *substantia nigra*), en grupos de ratas que fueron suplementadas con aceite de pescado (120 mg de EPA y 180 mg de DHA) desde su nacimiento y que se les indujo a parkinsonismo mediante una lesión con 6-OHDA.

Así mismo De Araújo *et al.* (2017) coadministraron haloperidol con ácido lipoico y / o aceite de pescado a ratas Wistar macho durante 31 días, observando una mejora en el rendimiento motor asociado a la reducción de los niveles de ROS y al aumento de las enzimas antioxidantes.

Los resultados del presente trabajo también muestran que una pre-suplementación durante seis semanas mejora las conductas analizadas en el campo abierto (horizontal, vertical, inmovilidad, y cuadros cruzados) en los grupos inducidos a Parkinsonismo con haloperidol.

Esto puede deberse a que los ácidos grasos omega-3 previenen el metabolismo del ácido araquidónico a través de la competencia enzimática, dando como resultado una menor producción de eicosanoides y moléculas pro-inflamatorias (como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos), entre otros (Calder, 2006; Smith *et al.*, 2007; Xicoy *et al.*, 2019). Así, con la incorporación de estos ácidos grasos en la membrana neuronal, pueden generar potentes efectos anti-inflamatorios con la producción de eicosanoides anti-inflamatorios (resolvinas, maresinas, neuroprotectina D1, elovanoides) y efectos neuroprotectores, como antiapoptóticos (neuroprotectina D1), antioxidantes e inhibidores de citocinas, óxido nítrico y producción de ROS, y como promotores de sinaptogénesis, función sináptica, diferenciación neuronal, crecimiento y desarrollo del cerebro, así como regular propiedades de la membrana tales como fluidez, flexibilidad, permeabilidad, la modulación de proteínas unidas a la membrana y expresión génica (Delion *et al.*, 1996; Innis, 2000; Sharon, *et al.*, 2003; Whelan, 2008; Barcelos *et al.*, 2010; Bazinet, *et al.*, 2014; Healy-Stoffel, *et al.*, 2018).

En conclusión, estos resultados sugieren que los ácidos grasos omega-3 pueden tener aplicaciones prometedoras en la prevención y/o tratamiento de diferentes

patologías como la enfermedad de Parkinson, actuando en la prevención de los trastornos del movimiento y para poder tener un resultado más revelador se podría incrementar la administración por períodos más largos, dosis más bajas o altas o una selección cuidadosa de patrones dietéticos habituales.

6.6 Efecto de los tratamientos sobre la densidad de los receptores de dopamina D₂ y los niveles de expresión de su gen, en el cerebro medio de las ratas.

Debido a que los receptores D₂ median las funciones de la dopamina, en este trabajo se analizó la presencia y expresión del gen de estos receptores en el tejido cerebral medio (VTA), para determinar si cambios en los receptores de DA en el cerebro medio podrían contribuir a los efectos del haloperidol y/o de la suplementación con aceite de alga rico en ácidos grasos omega-3.

Al final del período de tratamiento y de las pruebas de conducta, las ratas fueron sacrificadas por decapitación y los cerebros se extrajeron inmediatamente, se pesaron previo a su congelación en nitrógeno líquido, y fueron almacenados a -70 °C hasta su posterior uso.

6.6.1 Análisis de la densidad del receptor D₂ en tejido cerebral medio (VTA) mediante Western Blot.

Para obtener información sobre la acción de los efectos del aceite de alga rico en ácidos grasos omega-3 sobre el modelo inducido a Parkinsonismo, se cuantificaron los niveles del receptor D₂ en el cerebro medio, mediante la técnica de Western Blot. La intensidad de las bandas correspondientes del receptor D₂ se normalizó con respecto a la intensidad neta de su correspondiente banda de alfa-tubulina, utilizando las mismas membranas que las usadas con el anticuerpo primario para el receptor D₂.

El anticuerpo D₂ detectó una banda de peso molecular de 50 kDa, como corresponde al tamaño de la proteína del receptor; en la Figura 6.9 se pueden observar las bandas de los grupos experimentales co-suplementados y pre-suplementados, respectivamente. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de intensidad relativa en promedio \pm media desviación estándar (DE) de los siete animales de cada grupo experimental pre-suplementado y co-suplementado.

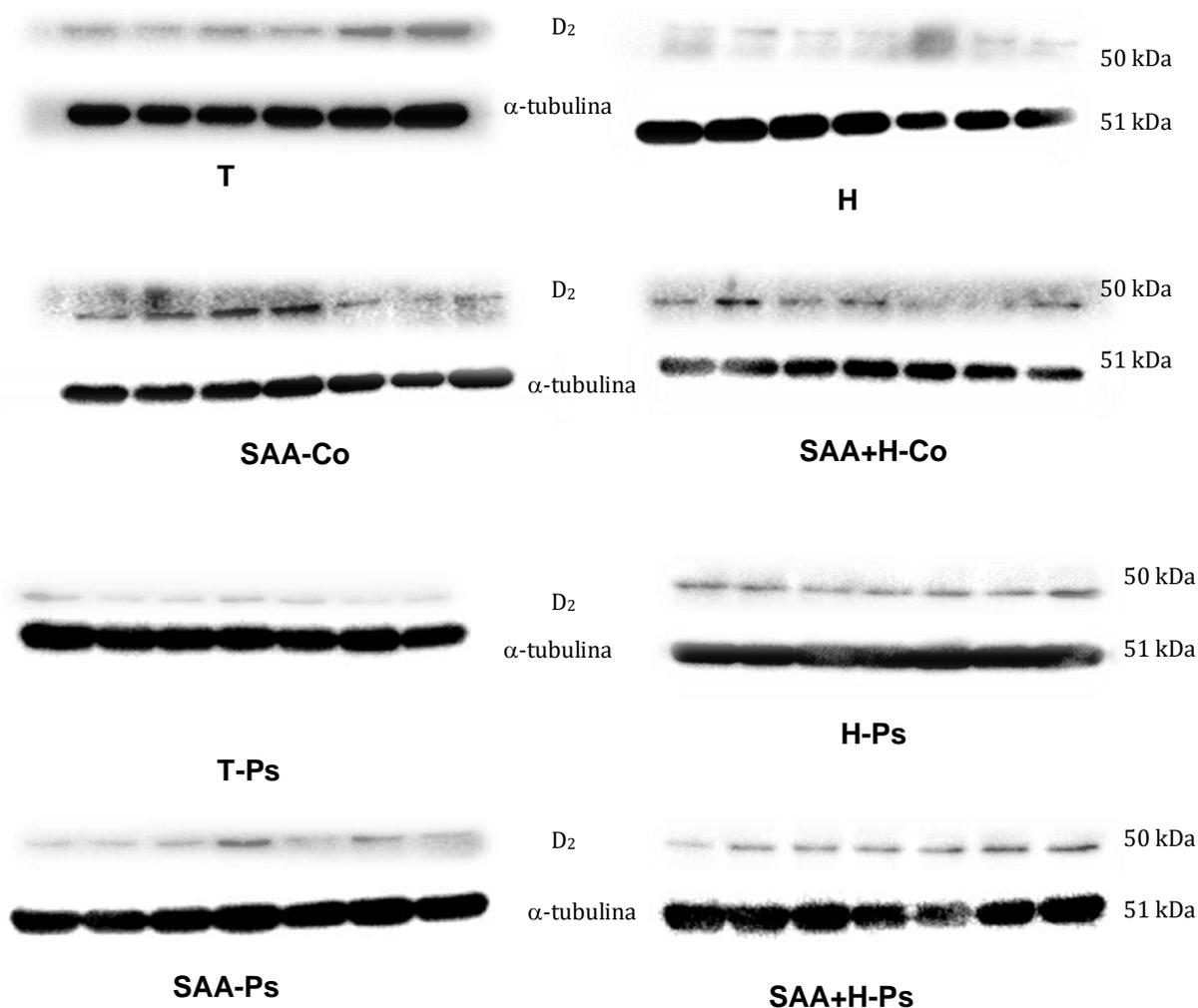


Figura 6.9. Representación de western blot de la densidad del receptor de dopamina D₂ de los grupos experimentales del tejido medio cerebral (VTA).

Como puede observarse en la Figura 6.10, se encontró una mayor densidad del receptor de dopamina D_2 en el cerebro medio en los grupos experimentales pre-suplementados, en comparación con los grupos co-suplementados. No se encontraron diferencias significativas en el área relativa del receptor D_2 en los grupos pre-suplementados, a diferencia del grupo tratado con haloperidol sin suplementación del aceite de alga (H) donde se encontró una densidad menor, debido seguramente al bloqueo de los receptores de dopamina, ya que el haloperidol ejerce un efecto antagonista de los receptores D_2 (Vasconcelos *et al.*, 2003) y no fue suficiente para compensar los receptores bloqueados con haloperidol ya que la función locomotora no se restableció. Debe ser necesario un tratamiento más prolongado con SAA para observar si hay mejoras en el comportamiento locomotor, como lo sugieren los grupos pre-suplementados.

Por su parte, en el grupo tratado con haloperidol y aceite de alga por dos semanas (SSA+H-Co) se observó una recuperación de los niveles de los receptores D_2 , efecto que fue más notorio en el grupo de ratas pre-suplementadas con el aceite por 6 y 8 semanas tratadas con haloperidol (H-Ps y SAA+H-Ps, respectivamente), en las que el área relativa del receptor fue semejante a la del grupo testigo. Estos resultados sugieren que el aceite de alga rico en omega-3 tiene un efecto estimulador de la presencia del receptor de dopamina D_2 en las membranas del cerebro medio. Estos resultados deberán complementarse con el estudio de la localización celular de los receptores D_2 en el cerebro por técnicas inmunohistoquímicas, así como con la determinación de los cambios en la actividad del receptor.

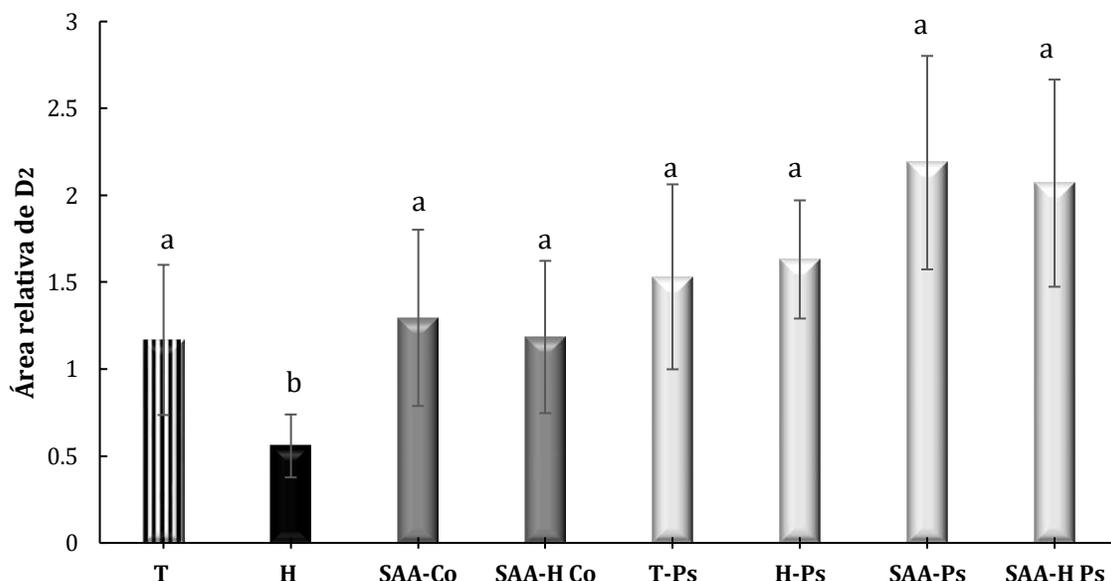


Figura 6.10. Área relativa del receptor de dopamina D₂ respecto a la proteína endógena α -tubulina, de cada grupo de ratas experimentales. T: grupo testigo sano; H: grupo tratado con haloperidol; T-Ps: testigo sano tratado con aceite de alga rico en omega-3 (6 semanas); H-Ps: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (6 semanas); SAA+H-Ps: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (8 semanas); SAA-Ps: grupo tratado con aceite de alga rico en omega-3 (8 semanas); SAA+H-Co: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (2 semanas); SAA-Co: grupo tratado con aceite de alga rico en omega-3 (2 semanas). Ps: pre-suplementado; Co: co-suplementado. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre grupos, $p < 0.5$.

6.6.2. Expresión relativa del gen del receptor D₂ en el tejido cerebral medio.

El RNA fue extraído del tejido cerebral medio (VTA), se cuantificó por espectrometría con el equipo NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific) y la integridad del RNA se verificó por electroforesis en geles de agarosa. En la Tabla 6.3 se muestra la pureza del RNA obtenido y en la Figura 6.11 se muestra el patrón electroforético del RNA de los grupos pre-suplementados y co-suplementados, con la integridad suficiente para ser utilizado en las reacciones de RT-PCR.

Tabla 6.3. Pureza del RNA de los grupos pre-suplementado y co-suplementado.

Grupo	Relación A_{260}/A_{280} Pre-suplementación	Relación A_{260}/A_{280} Testigo / Tratado con H
T	1.87 - 1.96	1.82 - 1.88
H	1.91 - 1.98	1.82 - 1.86
Relación A_{260}/A_{280} Co-suplementación		
SAA- H	1.91 - 1.98	1.82 - 1.85
SAA	1.80 - 1.96	1.82 - 1.88

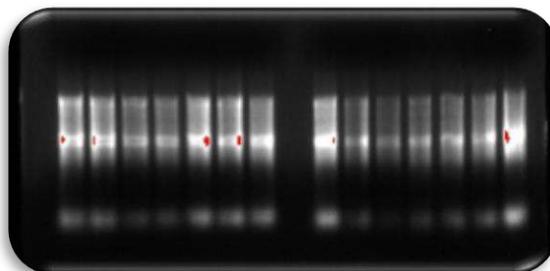


Figura 6.11. Electroforesis en gel de agarosa del RNA extraído del cerebro de las ratas de los grupos pre-suplementado y co-suplementado.

El cálculo de la expresión de los genes se realizó por el método comparativo, mediante la expresión del gen del receptor D_2 de los grupos Pre-suplementados y Co-suplementados contra la expresión del gen D_2 del grupo T, de acuerdo con cada grupo experimental.

Los oligonucleótidos utilizados (#QT01081990) para amplificar el gen del receptor de dopamina D_2 estuvieron constituidos por 50-250 pb, con una temperatura de alineamiento de 60 °C. Los oligonucleótidos se probaron haciendo una PCR

convencional, cuyos amplicones mostraron el tamaño predicho acorde con lo reportado. Posteriormente se llevó a cabo la RT-PCR con el RNA total obtenido del tejido cerebral medio (VTA), y con los datos de Ct obtenidos se realizaron los cálculos a fin de determinar los valores de expresión relativa.

Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 6.12. En cuanto al grupo de ratas H no suplementadas con el aceite de alga rico en ácidos grasos omega-3 y tratadas con haloperidol, puede observarse un aumento del 20% en la expresión del gen para el receptor D₂, posiblemente como un efecto compensatorio a la disminución de la densidad de receptores D₂ observada en este grupo (Figura 6.12).

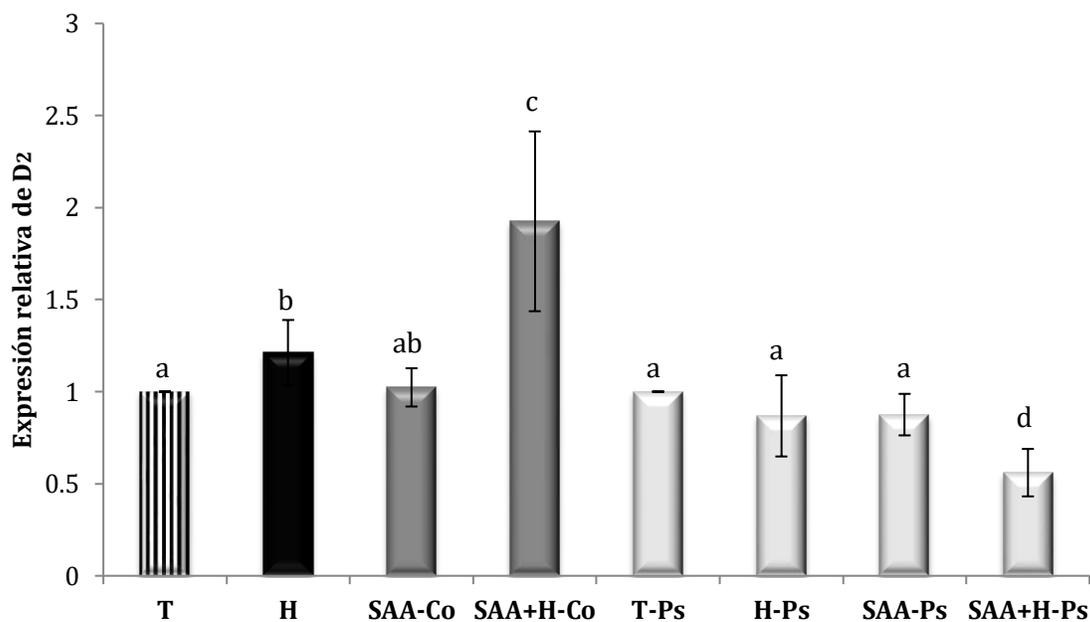


Figura 6.12. Expresión relativa del gen del receptor de dopamina D₂, respecto al gen endógeno β -actina, de cada grupo de ratas experimentales. T: grupo testigo sano; H: grupo tratado con haloperidol; T-Ps: testigo sano tratado con aceite de alga rico en omega-3 (6 semanas); H-Ps: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (6 semanas); SAA+H-Ps: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (8 semanas); SAA-Ps: grupo tratado con aceite de alga rico en omega-3 (8 semanas); SAA+H-Co: grupo tratado con haloperidol y aceite de alga rico en omega-3 (2 semanas); SAA-Co: grupo tratado con aceite de alga rico en omega-3 (2 semanas). Ps: pre-suplementado; Co: co-suplementado. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre grupos, $p < 0.5$.

De igual manera, en el grupo SAA+H-Co se encontró un aumento de la expresión del gen, aunque en este caso el aumento fue mayor, 90%, como un efecto compensatorio potenciado por los ácidos grasos omega-3, que se reflejó en una mayor densidad de receptores D₂ en las membranas (Figura 6.9). En los grupos pre-suplementados, no se observaron cambios en la expresión del gen del receptor D₂ en el grupo pre-suplementado por seis semanas con el aceite de alga tratado con haloperidol (H-Ps), en concordancia con la densidad de receptores, que no sufrió cambios con respecto al grupo testigo. Sin embargo, en el grupo presuplementado con el aceite por ocho semanas y tratado con haloperidol (SAA+H-Ps) se observó una menor expresión del gen del receptor, sin encontrarse cambios en la densidad del receptor en las membranas. Esto podría explicarse por la administración del aceite de alga rico en omega-3 al mismo tiempo que el haloperidol, por lo que el daño en los receptores fuera de menor magnitud y requiriera una menor compensación en la expresión del gen.

Los AGPI omega-3 en especial DHA, tiene un papel importante como ligandos y activadores de una variedad de receptores que actúan como factores de transcripción, como el receptor retinoide X (RXR), que junto con el receptor nuclear asociado 1 (Nurr1) y el factor de crecimiento nervioso IB (Nur77), juegan un papel crucial en el desarrollo y la supervivencia del sistema dopaminérgico. En particular, RXR regula la expresión del gen D₂, por lo que el aumento en la densidad y expresión de D₂ en ratas suplementadas podría haber sido el resultado de la unión de DHA al dominio de unión al ligando RXR alfa y su interacción con el promotor del gen D₂ (Lane *et al.*, 2005; Healy-Stoffel, *et al.*, 2018). Además, como constituyentes de los fosfolípidos de las membranas celulares, los AGPI n-3 contribuyen a la fluidez de la membrana y a la formación y función de las balsas lipídicas donde se encuentran muchas proteínas involucradas en la transducción de señales, como los receptores de dopamina, lo que favorece su inserción, funcionalidad y transducción de señales (resultado de la unión de DHA al dominio de unión al ligando RXR alfa y su interacción con el promotor del gen D₂ (Healy-Stoffel, *et al.*, 2018), lo que también

podría haber contribuido a una mayor presencia de proteína D₂ en las membranas del cerebro medio.

Hasta el momento, no hay reportes al respecto de la expresión del receptor dopaminérgico D₂ en un modelo murino inducido a parkinsonismo experimental con haloperidol, y suplementado con ácidos grasos omega-3.

Delion y colaboradores (1994) evaluaron el efecto de una deficiencia del ácido alfa linolénico en los sistemas de neurotransmisión dopaminérgica en ratas, donde midieron la densidad de los receptores de dopamina D₂ mediante autorradiografía en tres regiones cerebrales: la corteza frontal, el cuerpo estriado y el cerebelo, encontrando que una alimentación deficiente a largo plazo modifica la neurotransmisión dopaminérgica, específicamente en la corteza frontal con una densidad significativamente menor de receptores D₂ y de DA endógena, comparado con los animales control. Además, hubo niveles más bajos de ácidos grasos omega-3 en todas las regiones estudiadas en las ratas deficientes en ácido linolénico, equilibradas por mayores niveles de ácidos grasos omega-6. Estos resultados demuestran que una dieta deficiente de ácido linolénico podría inducir a modificaciones de la neurotransmisión y esto podría inducir a alteraciones del comportamiento. Posteriormente encontraron que las densidades de los receptores dopaminérgicos y los niveles de dopamina se ven más afectados por el envejecimiento, independientemente de la dieta, ya que encontraron una reducción del 10% en la densidad de receptores dopaminérgicos D₂ (Delion *et al.*, 2016).

En otro estudio se analizaron proteínas reguladoras asociadas a la DA y una deficiencia de ácido linolénico perinatal en ratas, observándose que los receptores D₁ y D₂ en el cerebro de ratas aumentan significativamente en la estructura de la corteza y cuerpo estriado, posiblemente para compensar los niveles bajos de DA en el cerebro en desarrollo (Kuperstein *et al.*, 2008). Independientemente, la alta expresión de los receptores D₁ y D₂ en muchas regiones del cerebro se puede atribuir a una hipersensibilidad causada por el posible deterioro en la producción de DA, este

mecanismo compensatorio puede permitir que estos receptores actúen incluso cuando hay niveles bajos de DA (Kuperstein *et al.*, 2008).

Existen otros mecanismos reportados en otros modelos experimentales de EP que podrían haber contribuido a los resultados observados, aunque no se evaluaron en este trabajo. Por ejemplo, la neurogénesis también podría estar implicada en el aumento de D₂ en el mesencéfalo, ya que AGPI modula la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), que estimula el crecimiento y el agrandamiento de las neuronas (Bousquet *et al.*, 2009; Coulombe *et al.*, 2016); efecto del DHA sobre la supervivencia celular y el bloqueo de la apoptosis, probablemente mediado por la activación de la vía PI3K / Akt (Bousquet *et al.*, 2008; Hacıoglu *et al.*, 2012); la disminución de los niveles de peroxidación lipídica y nitritos (Barros *et al.*, 2017); la reducción de ROS, óxido nítrico y niveles proinflamatorios de citocinas TNF- α e IFN- γ (Luchtman *et al.*, 2012; Luchtman *et al.*, 2013); o la disminución de la astrogliosis y la microgliosis (Mori *et al.*, 2018; Hernando *et al.*, 2019).

Los mecanismos moleculares exactos para la expresión alterada de los componentes principales del sistema dopaminérgico como consecuencia de la deficiencia de ácidos grasos omega-3 todavía no están claros, pero se cree que muchos trastornos neurológicos derivan de un desequilibrio en la composición de los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente de los niveles bajos de DHA (Horrobin, 2001; Bousquet *et al.*, 2009; Cunnane *et al.*, 2012).

7. CONCLUSIONES

En el grupo de ratas pre-suplementadas por seis semanas, el aceite de alga n-3 tuvo un efecto neuroprotector de:

- Los síntomas del parkinsonismo causados por el haloperidol en ratas Wistar (actividad locomotriz, inmovilidad y exploración).
- La pérdida de receptores D₂ para dopamina en las membranas celulares de la parte media del cerebro (*substantia nigra*, núcleo accumbens e hipocampo) causada por el haloperidol.

En el grupo de ratas co-suplementadas, el aceite de alga n-3 mostró:

- Un ligero efecto protector al final del experimento en inmovilidad y exploración.
- Un efecto estimulador del número de receptores D₂ a través de la expresión del gen del receptor D₂, como respuesta a la disminución causada por el haloperidol.

Se sugiere que el enriquecimiento de las membranas cerebrales con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 es responsable, al menos en parte, de los resultados observados, a través de acciones protectoras y estimuladoras sobre la presencia de D₂ en la parte media del cerebro. Esto sugiere que los AGPI omega-3 pueden considerarse como una opción nutracéutica para prevenir o aliviar la progresión de la enfermedad de Parkinson y del parkinsonismo inducido por fármacos neurolépticos.

8. RECOMENDACIONES

- Profundizar en los efectos de modulación de los ácidos grasos omega-3 sobre los receptores de dopamina, analizando la localización celular de los receptores por técnicas inmunohistoquímicas, así como los cambios en su actividad.
- Analizar las modificaciones epigenéticas en el gen del receptor de D₂ y su promotor.
- Estudiar a profundidad, mediante electromiografía, los efectos de la suplementación en las características de los temblores mandibulares bajo diferentes dosis y tratamiento más prolongado de ácidos grasos omega-3.

9. REFERENCIAS

- Abbott, S., Jenner, A., Spiro, A., Batterham, M., Halliday, G. y Garner, B. 2015. Fatty acid composition of the anterior cingulate cortex indicates a high susceptibility to lipid peroxidation in Parkinson's disease. *J. Park. Dis.* (5):175-185.
- Acar, N., Chardigny, J., Darbois, M., Pasquis, B. y S eb edio, J. 2003. Modification of the dopaminergic neurotransmitters in striatum, frontal cortex and hippocampus of rats fed for 21 months with trans isomers of alpha-linolenic acid. *Neurosci. Res.* (45):375-382.
- Ahmad, S., Park, J., Radel, J. y Levant, B. 2008. Reduced numbers of dopamine neurons in the *substantia nigra pars compacta* and ventral tegmental area of rats fed an n-3 polyunsaturated fatty acid-deficient diet: a stereological study. *Neurosci. Lett.* (438):303-307.
- Arab, L. 2003. Biomarkers of fat and fatty acid intake. *J. Nutr.* (133):925S-932S.
- Bahena, R., Flores, G. y Arias, J. 2000. Dopamina: s ntesis, liberaci n y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biol.* (11):39-60.
- Bankiewicz, K., Mandel, R.J y Sofroniew, M.V. 1993. Trophism, transplantation and animal models of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* (124):140-149
- Barajas, C., Coronel, I. y Flor n, B. 2015. Dopamine Receptor and Neurodegeneration. *Ageing and Disease.* 6(5):349-368
- Barcelo-Coblijn, G. y Murphy, E. 2009. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog. Lipid. Res.* (48):355-374.
- Barros, A., Crispim, R., Cavalcanti, J., Souza, R., Lemos, J., Cristino Filho, G., Bezerra, M., Pinheiro, T., de Vasconcelos, S. y Mac do, D. 2017. Impact of the Chronic Omega-3 Fatty Acids Supplementation in Hemiparkinsonism Model Induced by 6-Hydroxydopamine in Rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* (120):523-531.
- Bazan, N., Molina, M. y Gordon, W. 2011. Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Nutr.* (31):321-351.
- Bazinet, R.P., Laye, S. 2014. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* (15):771-785.
- Berke, J. y Hyman, S. 2000. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron.* 25(3):515-32.
- Bousquet, M., Saint-Pierre, M., Julien, C., Salem, N Jr., Cicchetti, F. y Calon, F. 2008. Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J.* 22(4):1213-25

- Bousquet, M., Gibrat, C., Saint-Pierre, M., Julien, C., Calon, F. y Cicchetti, F. 2009. Modulation of brain-derived neurotrophic factor as a potential neuroprotective mechanism of action of omega-3 fatty acids in a parkinsonian animal model. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 13;33(8):1401-8.
- Bradbury, J. 2011. Docosahexaenoic Acid (DHA): an ancient nutrient for the modern human brain. *Nutrients*. (3):529-554.
- Brenna, J., Salem Jr, N., Sinclair, A. y Cunnane, S. 2009. α -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty. Acids*. (80) 85-91.
- Bunzow, J., Van Tol, H., Grandy, D., Albert, P., Salon, J., Christie, M., Machida, C., Neve, K. y Civelli, O. 1988. Cloning and expression of a rat D₂ dopamine receptor cDNA. *Nature*. (336):783-7.
- Burr, G. y Burr, M. 1929. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion on fat from the diet. *J Biol. Chem*. (32):345-367.
- Calder P. 2006. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*. 83(6 Suppl.):1505S-19S.
- Calder P. 2016. Docosahexaenoic Acid. *Ann Nutr Metab*. (69) (suppl 1):8–21.
- Calon, F. y Cole, G. 2007. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 77(5-6):287-93.
- Calvani, M. y Benatti, P. 2003. Polyunsaturated fatty acids (PUFA). 43 pp. En Sigma-Tous S.P.A.
- Cansev, M., Ulus, I., Wang, L., Maher, T. y Wurtman, R.J. 2008. Restorative effects of uridine plus docosahexaenoic acid in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci. Res*. (62):206-209.
- Campos, A. 2008. Evaluación de alteraciones motoras en modelos animales de enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol*. (46):167-174.
- Cardoso, H., Passos, P., Lagranha, C., Ferraz, A., Santos, E., Oliviera, R., Oliviera, P., Santos, R., Santana, David, Rodrigues, M. y Andrade, B. 2012. Differential vulnerability of *substantia nigra* and *corpus striatum* to oxidative insult induced by reduced dietary level of essential fatty acids. *Front. Hum. Neurosci*.
- Castro, D., Hermanson, E., Joseph, B., Wallén, A., Aarnisalo, P. y Heller, A. 2001. Induction of cell cycle arrest and morphological differentiation by Nurr1 and retinoids in dopamine MN9D cells. *Biol. Chem*. (276):43277- 43284.
- Cenci, M., Whishaw, I. y Schallert, T. 2002. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat?. *Nat. Rev. Neurosci*. (3):574-579.
- Chalon, S. 2006. Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. (75):259-269.

- Chang, Y., Chen, S., Kao, C., Hung, S., Ding, D. y Yu, C. 2012. Docosahexaenoic acid promotes dopaminergic differentiation in induced pluripotent stem cells and inhibits teratoma formation in rats with Parkinson-like pathology. *Cell Transplant.* (21): 313-332.
- Chao, J., Leung, Y., Wang, M. y Chang, R. 2012. Nutraceuticals and their preventive or potential therapeutic value in Parkinson's disease. *Nutr. Rev.* (70):373-386.
- Chen, C. y Bazan, N., 2005. Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity, and neuroprotection. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* (77):65-76.
- Chen, C., Green, J., Orr, S. y Bazinet, R. 2008. Regulation of brain polyunsaturated fatty acid uptake and turnover. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids.* (79):85-91.
- Chen, H. y Su, H. 2012. Exposure to a maternal n-3 fatty acid deficient diet during brain development provokes excessive hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress and behavioral indices of depression and anxiety in male rat offspring later in life. *J. Nutr. Biochem.* (24):70-80.
- Chen, H., Zhang, S. y Hernan, M. 2003. Dietary intakes of fat and risk of Parkinson's disease. *Am. J. Epidemiol.* (157):1007-1014.
- Chen, H. y Su, H. 2011. Fish oil supplementation of maternal rats on an n-3 fatty acid-deficient diet prevents depletion of maternal brain regional docosahexaenoic acid levels and has a postpartum anxiolytic effect. *J. Nutr. Biochem.* (23):229-305.
- Cole, G. y Frautschy, S. 2010. DHA may prevent age related dementia. *J. Nutr.* (140):869-874.
- Cole, G., Lim, G., Yang, F., Teter, B., Begum, A. y Ma, Q. 2013. Prevention of Alzheimer's disease: omega-3 fatty acid and phenolic anti-oxidant interventions. *National Library of Medicine.*
- Cole, G., Ma, Q. y Frautschy, S. 2009. Omega-3 fatty acids and dementia. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* (81):213-221.
- Collins-Praino, L.E., Paul N.E., Rychalsky, K.L, Hinman, J.R., Chrobak, J.J y Senatus, P.B. 2011. Pharmacological and physiological characterization of the tremulous jaw movement model of parkinsonian tremor: Potential insights into the pathophysiology of tremor. *Front Syst Neurosci.* (46):1-14.
- Contreras, M. y Rapaport, S. 2002. Recent studies on interactions between n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in brain and other tissues. *Curr Opin Lipidol.* (13):267-272.
- Coulombe, K., Saint-Pierre, M., Cisbani, G., St-Amour, I., Gibrat, C., Giguere-Rancourt A., et al. 2016. Partial neurorescue effects of DHA following a 6-OHDA lesion of the mouse dopaminergic system. *J Nutr Biochem.* (30):133-42.
- Cousins, M., Atherton, E. y Salamone, J. 1998. Behavioral and electromyographic

- characterization of the local frequency of tacrine-induced tremulous jaw movements. *Physiol Behav.* (64):153-158.
- Crawford, M., Bloom, M., Broadhurst, C., Schmidt, W., Cunnane, S. y Galli, C. 1999. Evidence for the unique function of docosahexaenoic acid during the evolution of the modern hominid brain. *Lipids.* (34)S39:S47.
- Crawford, M., Casperd, N. y Sinclair, A. 1976. The long-chain metabolites of linoleic and linolenic acids in liver and brain in herbivores and carnivores. *Comp. Biochem. Physiol.* (54B):395-401.
- Cunnane, S., Schneider, J., Tangney, C., Tremblay-Mercier, J., Fortier, M. y Bennett, D. 2012. Plasma and brain fatty acid profiles in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* (29):691-697.
- Delattre, A., Kiss, A., Szawka, R.E., Anselmo-Franci, J.A., Bagatini, P.B., Xavier, L.L., Rigon, P., Achaval, M., Iagher, F., De David, C., Marroni, N.A. y Ferraz, A.C. 2010. Evaluation of chronic omega-3 fatty acids supplementation on behavioral and neurochemical alterations in 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. *Neurosci Res.* 66(3):256-64.
- Delattre, A., Carabelli, B., Mori, M., Kempe, P., Rizzo, L., Zanata, S., Machado, R., Suchecki, D., Andrade, B., Lima, M. y Ferraz, A. 2016. Maternal omega-3 supplement improves dopaminergic system in pre and postnatal inflammation-induced neurotoxicity in Parkinson's disease model. *Mol Neurobiol.*
- De Lau, L., Bornebroek, M., Witteman, J., Hofman, A. y Koudstaal, P. 2005. Dietary fatty acids and the risk of Parkinson disease: the Rotterdam study. *Neurology.* (64):2040-2045.
- Delion, S., Chalon, S., Héroult, J., Guilloteau, J., Besnard, J. y Durand, G. 1994. Chronic dietary alpha-linolenic acid deficiency alters dopaminergic and serotonergic neurotransmission in rats. *J. Nutr.* (124):2466-2476.
- Delion, S., Chalon, S., Guilloteau, J., Besnard, J.C. y Durand, G. 1996. α -Linolenic acid dietary deficiency alters age-related changes of dopaminergic and serotonergic neurotransmission in the rat frontal cortex. *J. Neurochem.* (66):1582-1591.
- De Velasco, P., Mendonca, H., Borba, J., Andrade Da Costa, B., Guedes, R., y Navarro, D. 2012. Nutritional restriction of omega-3 fatty acids alters topographical fine tuning and leads to a delay in the critical period in the rodent visual system. *Exp. Neurol.* (234):220-229.
- Doughman, S., Krupanidhi, S., Sanjeevi, C. 2007. Omega-3 fatty acids for nutrition and medicine: considering Microalgae oil as a vegetarian source of EPA and DHA. *Curr Diabetes Rev.* (3):198-203.

- Fabelo, N., Martín, V., Santpere, G., Marín, R.; Torrent, L., Ferrer, I. y Díaz, M. 2011. Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease. *Mol. Med.* (17):1107-1118.
- Federico Micheli. 2006. Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana. pp1-22.
- Finn, M., Jassen, A., Baskin, P., Chesler, E., Cousins, M. y Salamone, J. 1995. Animal models of parkinsonism: Further characterization of tremulous jaw movements in rats. *Soc. Neurosci. Abstr. Macology.* (88):467-471
- Finn, M., Jassen, A., Baskin, P. y Salamone, J. 1997. Tremulous characteristic of vacuous jaw movements induced by pilocarpine and ventrolateral striatal dopamine depletions. *Pharmacol Biochem Behav.* (57):243-249.
- Folch, J., Lees, M. y Sloane, S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* (226):497-509.
- Freedman, S., Patel, S., Marwood, R., Emms, F., Seabrook, G. y Knowles, M. 1994. Expression and pharmacological characterization of the human D3 dopamine receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* (268):417-26.
- German, D., Manaye, K. y Sonsalla, P. 1992. Brooks B. Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease and MPTP-induced parkinsonism: sparing of calbindin D28k-containing cells. *Ann N Y Acad Sci.* 648(11):42-62.
- Glenthoj, B. y Hemmingsen, R. 1989. Intermittent neuroleptic treatment induces long-lasting abnormal mouthing in the rat. *Eur J Pharmacol.* (164):393-6.
- Goldman, J. y Holden, S. 2015. Parkinson's Disease. *Encyclopedia of Mental Health.* 242-248.
- Gomez-Pinilla, F. 2008. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nat. Rev. Neurosci.* (9):568-578.
- Gómora, J., Avila, G. y Cota, G. 1996. Ca²⁺ current expression in pituitary melanotrophs of neonatal rats and its regulation by D₂ dopamine receptors. *J Physiol.* (492):763-73.
- González, S., Mena, M., Lastres-Becker, I., Serrano, A., de Yébenes, J., Ramos, J. y Fernández-Ruiz, J. 2005. Cannabinoid CB(1) receptors in the basal ganglia and motor response to activation or blockade of these receptors in parkin-null mice. *Brain Res.* (1046):195-206.
- Green, P., Glozman, S., Kamensky, B. y Yavin, E. 1999. Developmental changes in rat brain membrane lipids and fatty acids preferential accumulation of docosahexaenoic acid. *J. Lipid. Res.* (40):960-966.
- Hacioglu, G., Seval-Celik, Y., Tanriover, G., Ozsoy, O., Saka-Topcuoglu, E., Balkan, S. y Agar, A. 2012. Docosahexaenoic acid provides protective mechanism in bilaterally MPTP-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Folia Histochem.*

Cytobiol. (50):228-238.

Hamano, H., Nabekura, J., Nishikawa, M. y Ogawa, T. 1996. Docosahexaenoic acid reduces GABA response in *substantia nigra* neuron of rat. *J. Neurophysiol.* (75):1264-1270.

Healy-Stoffel, M., Levant, B. 2018. n-3 (omega-3) fatty acids: effects on brain dopamine systems and potential role in the etiology and treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Neurol Disord Drug.* (17):216–232.

Hernando, S., Requejo, C., Herran, E., Ruiz-Ortega, J., Morera-Herreras, T., Lafuente J.V., Ugedo, L., Gainza, E., Pedraz, J.L., Igartua, M., Hernández, R.M. 2019. Beneficial effects of n-3 polyunsaturated fatty acids administration in a partial lesion model of Parkinson's disease: The role of glia and Nrf2 regulation. *Neurobiol. Dis.* (121):252-262.

Horrobin, D. 2001. *The Madness of Adam and Eve: How Schizophrenia Shaped Humanity.* Bantam Press, London.

Humphrey, P. 1997. The characterization and classification of neurotransmitter receptors. *Ann New York Acad Sci.* (182):1-13.

Hyman, C., Hofer, M., Barde, Y., Juhasz, M., Yancopoulos, G. y Squinto, S. 1991. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the *substantia nigra*. *Nature.* (350):230-232.

Innis, S.M., 2000. The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain. *Dev. Neurosci.* 22, 474_480.

Innis, S.M., 2007. Fatty acids and early human development. *Early. Hum. Dev.* (83): 761-766.

Innis, S.M., 2011. The developing brain and dietary omega-3 fatty acids. In: Preedy, V.R.E.A. (Ed.), *Handbook of Behavior, Food and Nutrition.* Springer Science and Business Media.

Insua, M., Garelli, A., Rotstein, N., German, O., Arias, A. y Politi, L. 2003. Cell cycle regulation in retinal progenitors by glia-derived neurotrophic factor and docosahexaenoic acid. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (44):2235-2244.

Ishiwari, K., Mingote, S., Correa, M., Trevitt, J., Carlson, B. y Salamone, J. 2004. The GABA uptake inhibitor beta-alanine reduces pilocarpine-induced tremor and increases extracellular GABA in *substantia nigra pars reticulata* as measured by microdialysis. *J. Neurosci. Methods.* (140):39-46.

Ishiwari, K., Betz, A., Weber, S., Felsted, J. y Salamone, J. 2005. Validation of the tremulous jaw movement model for assessment of the motor effects of typical and atypical antipsychotics: effects of pimozide (Orap) in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* (80):351-362.

- Jackson, D. y Westlind-Danielsson, A. 1994. Dopamine receptor: molecular biology, biochemistry and behavioral aspects. *Pharmacol Ther.* (64):291-369.
- Jankovic, J., Chen, S. y Le, W. 2005. The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* (77):128-138.
- Ji, A., Diao, H., Wang, X., Yang, R., Zhang, J. y Luo, W. 2012. n-3 polyunsaturated fatty acids inhibit lipopolysaccharide-induced microglial activation and dopaminergic injury in rats. *Neurotoxicology.* (33):780-788.
- Jicha, G. y Salamone, J. 1991. Vacuous jaw movements and feeding deficits in rats with ventrolateral striatal dopamine depletion: Possible relation to parkinsonian symptoms. *J. Neurosci.* (11):3822-3829.
- Joardar, A., Sen, A. y Das, S. 2006. Docosahexaenoic acid facilitates cell maturation and beta-adrenergic transmission in astrocytes. *J. Lipid. Res.* (47):571-581.
- Julien, C., Berthiaume, L., Hadj-Tahar, A., Rajput, A., Bédard, P., Di Paolo, T., Julien, P. y Calon, F. 2006. Postmortem brain fatty acid profile of levodopa-treated Parkinson disease patients and parkinsonian monkeys. *Neurochem.* (48):404-414.
- Kamel, F., Goldman, S., Umbach, D., Chen, H., Richardson, G., Barber, M., Meng, C., Marras, C., Koerll, M. y Kasten, M. 2014. Dietary fat intake, pesticide use, and Parkinson's disease. *Park. Relat. Disord.* (20):82-87.
- Kebabian, J. y Calne, D. 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature.* (277):93-6.
- Kim, S., Zhang, Z., Saha, A., Sarkar, C. y Zhao, Z. 2010. Omega-3 and omega-6 fatty acids suppress ER and oxidative stress in cultured neurons and neuronal progenitor cells from mice lacking PPT1. *Neurosci. Lett.* (479):292-296.
- Kim, H., Spector, A. y Xiong, Z. 2011a. A synaptogenic amide N-docosahexaenoyl ethanolamide promotes hippocampal development. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* (96):114-120.
- Kim, H., Moon, H., Cao, D., Lee, J., Kevala, K. y Jun, S. 2011b. N-Docosahexaenoyl ethanolamide promotes development of hippocampal neurons. *Biochem. J.* (435):327-336.
- Kitajka, K., Sinclair, A., Weisinger, R., Weisinger, H. y Mathai, M. 2004. Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (101):10931-10936.
- Kodas, E., Vancassel, S., Lejeune, B., Guilloteau, D. y Chalon, S. 2002. Reversibility of n-3 fatty acid deficiency-induced changes in dopaminergic neurotransmission in rats: critical role of developmental stage. *J. Lipid. Res.* (43): 1209-1219.
- Kuperstein, F., Yakubov, E., Dinerman, P., Gil, S., Eylam, R. y Salem Jr, N. 2005. Overexpression of dopamine receptor genes and their products in the postnatal rat brain following maternal n-3 fatty acid dietary deficiency. *J. Neurochem.* (95):1550-1562.

- Kuperstein, F., Eilam, R. y Yavin, E. 2008. Altered expression of key dopaminergic regulatory proteins in the postnatal brain following perinatal n-3 fatty acid dietary deficiency. *J. Neurochem.* (106):662-671.
- Lane, M.A., Bailey, S.J. 2005. Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog Neurobiol.* (75):275–293.
- Latour, A., Grintal, B., Champeil-Potokar, G., Hennebelle, M., Laviaille, M. y Dutar, P. 2013. Omega-3 fatty acids deficiency aggravates glutamatergic synapse and astroglial aging in the rat hippocampal CA1. *Aging Cell.* (12):76-84.
- Lauritzen, I., Blondeau, N. y Heurteaux, C. 2000. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J.* (19):784-1793.
- Lengqvist, J., Mata de Urquiza, A., Bergman, A., Willson, T. y Sjoval, J. 2004. Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. *Mol. Cell. Proteomics.* (3):692-703.
- Levant, B., Radel, J. y Carlson, S. 2004. Decreased brain docosahexaenoic acid during development alters dopamine-related behaviors in adult rats that are differentially affected by dietary remediation. *Behav. Brain. Res.* (152):49-57.
- Levant, B., Ozias, M., Jones, K. y Carlson, S. 2006. Differential effects of modulation of docosahexaenoic acid content during development in specific regions of rat brain. *Lipids.* (41):407-414.
- Lledo, P., Homburger, V., Bockaert, J. y Vincent, J. 1992. Differential G protein-mediated coupling of D2 dopamine receptor to K⁺ and Ca²⁺ currents in rat anterior pituitary cells. *Neuron.* (8):455-63.
- Luchtman, D., Meng, Q. y Song, C. 2012. Ethyl-eicosapentaenoate (E-EPA) attenuates motor impairments and inflammation in the MPTP-probenecid mouse model of Parkinson's disease. *Behav. Brain. Res.* (226):386-396.
- Luchtman, D.W., Meng, Q., Wang, X., Shao, D., Song, C. 2013. ω -3 fatty acid eicosapentaenoic acid attenuates MPP⁺-induced neurodegeneration in fully differentiated human SH-SY5Y and primary mesencephalic cells. *J Neurochem.* (124):855–68.
- Mayorga, A., Carriero, D., Cousins, M., Gianutsos, G. y Salamone, J. 1997. Tremulous jaw movements produced by acute tacrine administration: Possible relation to parkinsonian side effects. *Pharmacol Biochem Behav.* (56):273-279.
- Melo, A., Monteiro, L., Lima, R., Oliveira, D., Cerqueira, M. y El-Bachá, R. 2011. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxid. Med. Cell Longev.* (46):71-80.
- Missale, C., Russel, N., Robinson, S., Jaber, M. y Caron, M. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* (78):189-225.
- Miyake, Y., Sasaki, S., Tanaka, K., Fukushima, W., Kiyohara, C., Tsuboi, Y.,

- Yamada, T., Oeda, T., Miki, T. y Kawamura, N. 2010. Dietary fat intake and risk of Parkinson's disease: A case-control study in Japan. *J. Neurol. Sci.* (288):117-122.
- Miyazawa, D., Yasui, Y., Yamada, K., Ohara, N. y Okuyama, H. 2010. Regional differences of the mouse brain in response to an alphinolenic acid-restricted diet: Neurotrophin content and protein kinase activity. *Life Sci.* (87):490-494.
- Moreira, J.D., Knorr, L., Ganzella, M., Thomazi, A.P., De Souza, C.G. y De Souza, D.G. 2010. Omega-3 fatty acids deprivation affects ontogeny of glutamatergic synapses in rats: relevance for behavior alterations. *Neurochem.* (56):753-759.
- Mori, M., Delattre, A., Carabelli, B., Pudell, C., Bortolanza, M., Staziaki, P., Visentainer, J., Montanher, P., Del Bel, E. y Ferraz, A. 2018. Neuroprotective effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the 6-OHDA model of Parkinson's disease is mediated by a reduction of inducible nitric oxide synthase. *Nutr. Neurosci.* (21):341-351.
- Mukherjee, P., Marcheselli, V., Serhan, C. y Bazan, N., 2004. NeuroprotectinD1, a docosahexaenoic acid derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (101):8491-8496.
- Muskiet, F. y Fokkema, M. 2004. Is docosahexaenoic acid (DHA) essential? Lessons from DHA status regulation, our ancient diet, epidemiology and randomized control trials. *J. Nutr.* (134):183-186.
- Nishikawa, M., Kimura, S. y Akaike, N. 1994. Facilitatory effect of docosahexaenoic acid on N-methyl-D-aspartate response in pyramidal neurons of rat cerebral cortex. *J. Physiol.* (475):83-93.
- O'Brien, J., Fillerup, D. y Mead, J. 1964. Quantification and fatty acid and fatty aldehyde composition of ethanolamine, choline, and serine glycerophosphatides in human cerebral gray and white matter. *J. Lipid. Res.* (5):329-338.
- Ozkan, A., Parlak, H., Tanriover, G., Dilmac, S., Ulker, S., Birsen, I. y Agar, A. 2016. The protective mechanism of docosahexaenoic acid in mouse model of Parkinson: The role of hemoxygenase. *Neurochem.* (101):110-119.
- Ozsoy, O., Tanriover, G., Derin, N., Uysal, N., Demir, N., Gemici, B., Kencebay, C., Yargicoglu, P., Agar, A. y Aslan, M. 2011. The effect of docosahexaenoic Acid on visual evoked potentials in a mouse model of Parkinson's disease: the role of cyclooxygenase-2 and nuclear factor kappa-B. *Neurotox Res.* 20(3):250-62.
- Ozsoy, O., Seval-Celik, Y., Hacioglu, G., Yargicoglu, P., Demir, R., Agar, A. y Aslan, M. 2011. The influence and the mechanism of docosahexaenoic acid on a mouse model of Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 59(5):664-70.
- Passos, P., Borba, J., Rocha De Melo, A., Guedes, R., Silva, R. y Melo Filho, W. 2012. Dopaminergic cell populations of the rat *substantia nigra* are differentially affected by essential fatty acid dietary restriction over two generations. *J. Chem.*

Neuroanat. (44):66-75.

Parlak, H., Ozkan, A., Dilmac, S., Tanriover, G., Ozsoy, O. y Agar, A. 2015. Neuronal nitric oxide synthase phosphorylation induced by docosahexaenoic acid protects dopaminergic neurons in an experimental model of Parkinson's disease. *Folia Histochem. Cytobiol.* (56):27-37.

Phillis, J., Horrocks, L. y Farooqui, A. 2006. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res. Rev.* (52): 201-243.

Pongrac, J., Slack, P. y Innis, S. 2007. Dietary polyunsaturated fat that is low in (n-3) and high in (n-6) fatty acids alters the SNARE protein complex and nitrosylation in rat hippocampus. *J. Nutr.* (137):1852-1856.

Prut, L. y Belzung, C. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology.* (463):3-33.

Rapoport, S., Rao, J. y Igarashi, M. 2007. Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* (77):251-261.

Robson, L., Dyall, S., Sidloff, D. y Michael-Titus, A. 2010. Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase the neurite outgrowth of rat sensory neurons throughout development and in aged animals. *Neurobiol. Aging.* (31):678-687.

Salamone J., Zigmond M. y Stricker E. 1990. Characterization of the impaired feeding behavior in rats given haloperidol or dopamine-depleting brain lesions. *Neuroscience.* (39):17-24.

Salamone J. y Baskin P. 1996. Vacuous jaw movements induced by acute reserpine and low-dose apomorphine: Possible model of parkinsonian tremor. *Pharmacol Biochem Behav.* (53):179-183.

Salamone, J., Mayorga, A., Trevitt, J., Cousins, M., Conlan, A. y Nawab, A. 1998. Tremulous jaw movements in rats: a model of parkinsonian tremor. *Prog. Neurobiol.* (56):591-611.

Salem Jr., N., Litman, B., Kim, H. y Gawrisch, K. 2001. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids.* (36):945-959.

Sarsilmaz, M., Songur, A., Ozyurt, H., Kus, I., Ozen, O. y Ozyurt, B. 2003. Potential role of dietary omega-3 essential fatty acids on some oxidant/antioxidant parameters in rats corpus striatum. *Prostaglandins Leukot. Essent Fatty Acids.* (69):253-259.

Schulte, E., Altmaier, E., Berger, H., Do, K., Kastenmüller, G., Wahl, S., Adamski, J., Peters, A., Krumsiek, J. y Suhre, K. 2016. Alterations in Lipid and Inositol Metabolisms in Two Dopaminergic Disorders. *PLoS ONE.* (11):e0147129.

- Selley, M. 1998. (E)-4-hydroxy-2-nonenal may be involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* (25):169-174.
- Sessler, A. y Ntambi, J.M., 1998. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J. Nutr.* (128):923-926.
- Serrano, N., Fernández, F., Luis, E., Granados, L., Juárez, T., Orozco, S., Pedraza, J., Orozco, M. y Jiménez, A. 2018. Docosahexaenoic acid protection in a rotenone induced Parkinson's model: Prevention of tubulin and synaptophysin loss, but no association with mitochondrial function. *Neurochem.* (121):26-37.
- Sharon, R., Bar-Joseph, I., Mirick, G., Serhan, C., Selkoe, D. 2003. Altered fatty acid composition of dopaminergic neurons expressing alpha-synuclein and human brains with alpha-synucleinopathies. *J Biol Chem.* (278): 49874-81.
- Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B. y Klenk, D. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analitical Biochemistry.* (150): 76-85.
- Smith MP y Cass WA. 2007. Oxidative stress and dopamine depletion in an intrastriatal 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 144(3):1057-66.
- Sprecher, H. 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim. Biophys.* (1486):219-231.
- Strömberg, I., Bickford, P. y Gerhardt, G. 2010. Grafted dopamine neurons: Morphology, neurochemistry, and electrophysiology. *Progress in Neurobiology.* 90(2):190-7.
- Sultana, A. y McMonagle, T. 2000. Pimozide for schizophrenia and related psychoses. *Cochrane Database Syst Rev.* (3):CD001949.
- Suzuki, S., Hinokio, Y., Ohtomo, M., Hirai, M., Hirai, A., Chiba, M., Kasuga, S., Satoh, Y., Akai, H. y Toyota, T. 1998. The effects of coenzyme Q10 treatment on maternally inherited diabetes mellitus and deafness, and mitochondrial DNA 3243 (A to G) mutation. *Dibetologia.* 41(5):584-8
- Thanos, P., Kim, R., Delis, F., Rocco, M., Cho, J. y Volkow, N. 2016. Effects of chronic methamphetamine on psychomotor and cognitive functions and dopamine signaling in the brain. *Behavioural Brain Research.* (16):31231-1.
- Tanabe, Y., Hashimoto, M., Sugioka, K., Maruyama, M., Fujii, Y. Y Hagiwara, R. 2004. Improvement of spatial cognition with dietary docosahexaenoic acid is associated with an increase in Fos expression in rat CA1 hippocampus. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* (31):700-703.
- Tanriover, G., Seval-Celik, Y., Ozsoy, O., Akkoyunlu, G. y Savcioglu, F. 2010. The effects of docosahexaenoic acid on glial derived neurotrophic factor and neurturin in

- bilateral rat model of Parkinson's disease. *Folia. Histochem. Cytobiol.* (48):434-441.
- Tsukahara, T., Takeda, M., Shimohama, S., Ohara, O. y Hashimoto, N. 1995. Effects of brain-derived neurotrophic factor on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine-induced parkinsonism in monkeys. *Neurosurgery.* (37):733-739.
- Trevitt, J., Atherton, L., Aberman, J. y Salamone, J. 1998. Effects of subchronic administration of clozapine, thioridazine and haloperidol on tests related to extrapyramidal motor function. *Psychopharmacology (Berl).* (137):61-6.
- Uauy, R. y Dangour, A., 2006. Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. *Nutr. Rev.* (64):S24:S33.
- Vasconcelos, S., Nascimento, V., Nogueira, C., Vieira, C., Sousa, F., Fonteles, M. y Viana. G. 2003. Effects of haloperidol on rat behavior and density of dopaminergic D2-like receptors. *Behavioural Processes* (63):45–52.
- Venkateshappa, C., Harish, G., Mythri, R., Mahadevan, A., Srinivas Bharath, M., y Shankar, S. 2012. Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging human *substantia nigra* compared to striatum: implications for Parkinson's disease. *Neurochem. Res.* (37):358-369.
- Vines, A., Delattre, A., Lima, M., Rodrigues, L., Suchecki, D. y Machado, R. 2012. The role of 5-HT1A receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: a possible antidepressant mechanism. *Neuropharmacology.* (62):184-191.
- Vinot, N., Jouin, M., Lhomme, A., Guesnet, G., Alessandri, J., Aujard, F. y Pifferi, F. 2011. Omega-3 Fatty Acids from Fish Oil Lower Anxiety, Improve Cognitive Functions and Reduce Spontaneous Locomotor Activity in a Non-Human Primate. *Plos ONE.* (6):e20491.
- Volpicelli, F., Caiazzo, M., Greco, D., Consales, C., Leone, L. y Perrone-Capano, C. 2007. BDNF gene is a downstream target of Nurr1 transcription factor in rat midbrain neurons in vitro. *J. Neurochem.* (102):441-453.
- Wainwright, P.E. 2002. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proc. Nutr. Soc.* (61):61-69.
- Wang, W., Shinto, L., Connor, W. y Quinn, J. 2008. Nutritional biomarkers in Alzheimer's disease: The association between carotenoids, n-3 fatty acids and dementia severity. *J. Alzheimer's Dis.* (13):31-38.
- Whelan, J. 2008. (n-6) and (n-3) Polyunsaturated fatty acids and the aging brain: food for thought. *J. Nutr.* 138 (12):2521-2522.
- Wisniecki, A., Correa, M., Arizzi, M., Ishiwari, K. y Salamone, J. 2003. Motor effects of GABA antagonism in globus pallidus: studies of locomotion and tremulous jaw movements in rats. *Psychopharmacology.* (170):140–9.
- Xicoy, H., Wierringa, B. y Martens, G. 2019. The role of lipids in Parkinson's disease.

Cells. (8)27.

Yehuda, S., Rabinovitz, S. y Mostofsky, D. 2005. Essential fatty acids and the brain: from infancy to aging. *Neurobiol. Aging*. 26 (Suppl. 1):98-102.

Zhang, W., Li, P., Hu, X., Zhang, F., Chen, J. y Gao, Y. 2011. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the brain: metabolism and neuroprotection. *Front Biosci*. 1(16):2653-70.

Zimmer, L., Hembert, S., Durand, G., Breton, P., Guilloteau, D., Besnard, J.C. y Chalon, S. 1998. Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid diet-deficiency acts on dopamine metabolism in the rat frontal cortex: a microdialysis study. *Neurosci. Lett*. (240):177-181.

Zimmer, L., Delpal, S., Guilloteau, D., Aïoun, J., Durand, G. y Chalon, S. 2000a. Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency alters dopamine vesicle density in the rat frontal cortex. *Neurosci. Lett*. (284):25-28.

Zimmer, L., Delion, S., Durand, G., Guilloteau, D., Bodard, S., Besnard, J. y Chalon, S. 2000b. Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res*. (41):32-40.

Zimmer, L., Vancassel, S., Cantagrel, S., Breton, P., Delamanche, S. y Guilloteau, D. 2002. The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr*. (75):662-667.

10. ANEXOS

Anexo A. Gel de agarosa

Geles de agarosa 1% para electroforesis de RNA

Agarosa	0.3 g
TAE 50x	0.6 mL
Agua destilada	30 mL
Fundir en horno de microondas 1-2 min	
*Enfriar hasta 60 °C	

Amortiguador TAE

50x solución stock, pH 8.5	30 mL
242 g Tris base	121 g Tris base
57.1 mL ácido acético glacial	28.55 mL ácido acético
37.2 g Na ₂ EDTA*2H ₂ O	18.6 g Na ₂ EDTA*2H ₂ O
H ₂ O 1L	
30 mL de solución 1x 0.6 buffer 29.4 mL H ₂ O	300 mL de solución 1x 6 mL 294 mL H ₂ O

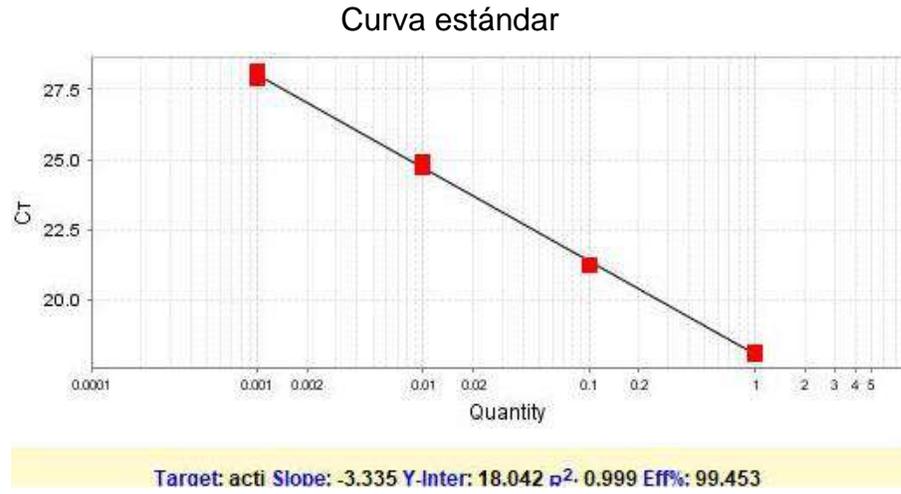
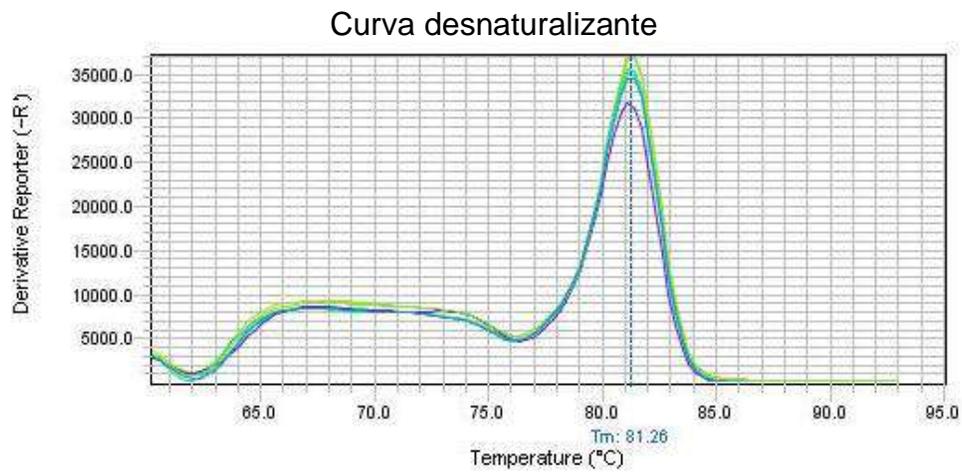
Anexo B. PCR**Primers**

QuantiTec Primers Assay envían los primers liofilizados a temperatura ambiente. Una vez reconstituidos se guardan a -20°C.

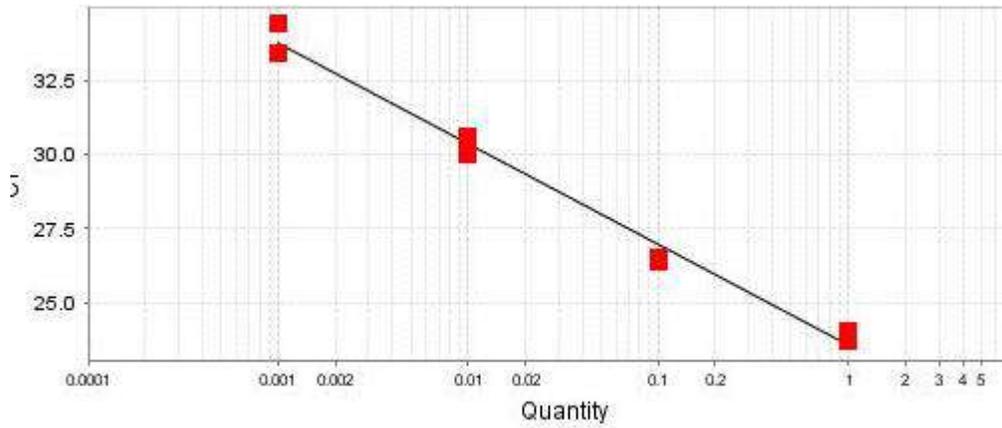
Para reconstituir a 10x, el vial se centrifuga brevemente y se le añade 1.1 mL de agua libre de nucleasas y se mezcla agitando el vial. Una vez reconstituido se hacen alícuotas para evitar el congelación y descongelación.

Composición de la mezcla de reacción (Master Mix) para qPCR con el Kit (biorad)

Reactivo	Cantidad
PCR-Agua libre de nucleasas	3.4 µL
Kapa Sybr Fast qPCR Master Mix (2) ²	5 µL
Primer directo (10 µM)	0.2 µL
Primer inverso (10 µM)	0.2 µL
Rox High/Low (50X)	0.2 µL
cDNA	1 µL
Volumen final de la reacción	10 µL

Figura 10.1. Curva de eficiencia para β -actina.Figura 10.2. Melt curve de la curva de la eficiencia de β -actina.

Curva estándar



Target: d2 Slope: -3.403 Y-Inter: 23.542 r^2 : 0.987 Eff%: 96.74

Figura 10.3. Curva de eficiencia para D₂.

Curva desnaturalizante

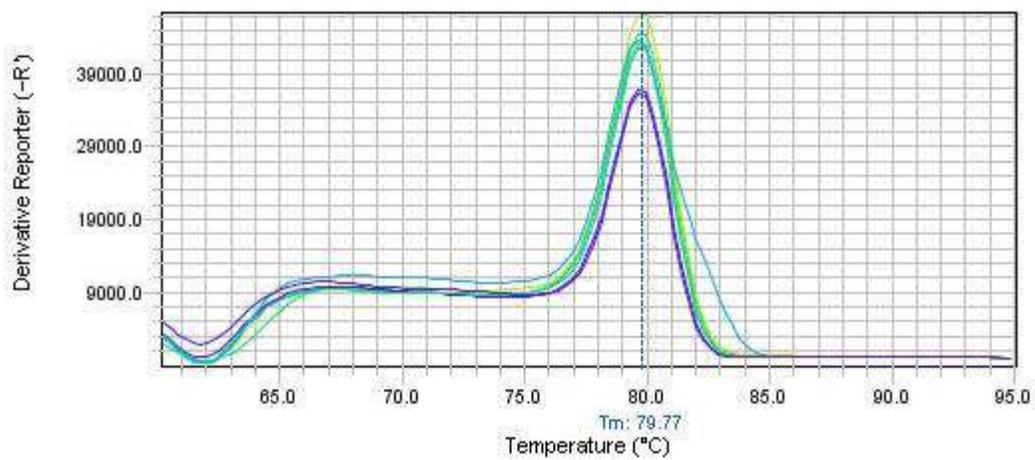


Figura 10.4. Curva desnaturalizante de la curva de la eficiencia de D₂.

Anexo C. Obtención de proteínas**Amortiguador de lisis de proteínas (100mL)**

Tris (50 mM)	0.6057 g	Al utilizar agregar:	
NaCl (150mM)	0.877 g		
EDTA (2.5 mM)	0.0744 g	PMSF (0.1 M)	10 µL/mL
EGTA (1.9 mM)	0.076 g	Na ₃ VO ₄ (200mM)	2 µL/mL
Triton X-100 (0.2%)	200 µL	Proteasas (1x)	1%
NP-40 (0.3%)	300 µL	Fosfatasas (1x)	1%

*Guardar a 4 °C

Anexo D. Geles de poliacrilamida (PAGE)**Gel de resolución (10mL)**

	12.5%	
	1 gel	2 geles
Acilamida	4.2 mL	8.4 mL
Tris 1M pH 8.8	3.73	7.46 mL
SDS 10%	0.1 mL	0.2 mL
H ₂ O bd	2 mL	4 mL
APS 10%	0.1 mL	0.2 mL
TEMED	6.7 µL	14 µL

Gel de empaquetamiento (10mL)

	5%	
	1 gel	2 geles
Acilamida	0.668 mL	1.336 mL
Tris 1M pH 6.8	0.5 mL	1 mL
SDS 10%	40 µL	80 µL
H ₂ O bd	2.8 mL	5.6 mL
APS 10%	40 µL	80 µL
TEMED	2.5 µL	5 µL

*Tris 1M (P.M = 121.14 g/mol), conservar 4°C
 - 60.57 g/ 500mL H₂O (pH 8.8)
 - 12.11 g/ 100ml H₂O (pH 6.8)

*SDS 10%, conservar a temperatura ambiente (proteger contra la luz).
 - 5 g/ 50mL H₂O

*APS 10% (Persulfato de amonio (NH₄)₂S₂O₈, P.M= 228.18 g/mol), conservar a 4°C resuspendido en 0.1 g/mL H₂O

Amortiguador de la muestra 5x

	10 mL (5x)
2% de SDS	1 g
10% glicerol	5 mL
0.0625 mM Tris	0.303 g
0.002% Azul de bromofenol	0.001 g
H ₂ O	Aforar a 10 mL

*Al volumen final a utilizar se le agrega 5 % de β-mercaptoetanol

Amortiguador de corrida (10x)

	1L (10x)	Para 1x (L)
Tris	30.2 g	100 mL de amortiguador de corrida + 900 mL H ₂ O
Glicina	144.2 g	
SDS	10 g	

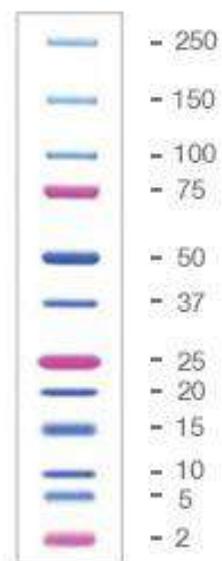
Marcador de peso molecular de proteínas

Figura 10.5. Marcador de peso molecular de proteína. Precision Plus Proteína™ Dual Xtra (#1610377).

Anexo E. Soluciones para Western BlotAmortiguador de transferencia (10x)

	1L (10x)	Para 1 X (L):
Tris	58.15 g	100 mL de amortiguador de transferencia + 900 mL de H ₂ O + 200mL de metanol.
Glicina	29.28 g	
SDS	3.7 g	

TBS (10x)

	1L (10x)	TBS-T 1x (1L)
Tris	24.2 g	100 mL de TBS+ 900 mL de H ₂ O + 1 mL de Tween 20.
NaCl	80 g	
*Ajustar pH 7.5		

Amortiguador de lavado

	500 mL
Glicina	7.5 g
Ajustar pH 2.5	

Anexo F. Composición del suplemento de aceite de alga.*Life´sDHA™ S10-P200*

Ingredientes: jarabe de glucosa, aceite de alga, almidón de maíz modificado, manitol, ascorbato de sodio, y 2% o menos de polifosfato de sodio, mono y di estearato de glicerol, fosfato tricálcico, aceite de girasol alto en oleico, lecitina de girasol, sabores naturales, tocoferoles naturales mixtos y palmitato de ascorbilo (como antioxidantes).

Tabla 10.1. Composición del suplemento de aceite de alga rico en omega 3.

Jarabe de glucosa	30 - 40%
Aceite de alga	30 - 40%
Almidón de maíz modificado	20 - 25%
Manitol	5 - 10%
Ascorbato de sodio	1 - 5%
Polifosfato de sodio	2.0%
Mono y di estearato de glicerol	2.0%
Fosfato tricálcico	2.0%
Aceite de girasol alto en oleico	2.0%
Lecitina de girasol	2.0%
Sabores naturales	2.0%
Tocoferoles naturales mixtos	2.0%
Palmitato de ascorbilo	2.0%

Anexo H. Composición del alimento.

Tabla 10.2. Perfil de ácidos grasos del alimento (croqueta).

Compuesto	Alimento (%)
Ácido mirístico (C14:0)	4.39
Ácido palmítico (16:0)	37.91
Ácido palmitoleico (C16:1)	1.44
Ácido esteárico (18:0)	18.73
Ácido oléico (C18:1)	15.09
Isomero ácido oleico	1.16
Ácido linoléico (18:2)	16.46
Ácido linolénico (C18:3)	0.54
Ácido araquídico (20:0)	2.24
Ácido behénico (22:0)	0.27
Ácido araquidónico (20:4)	0.16
Ácido eicosapentanoico (20:5)	1.24
Ácido docosapentanoico (22:5)	0.28



Beneficial effects of an algal oil rich in ω -3 polyunsaturated fatty acids on locomotor function and D_2 dopamine receptor in haloperidol-induced parkinsonism

Alejandra Barroso-Hernández ^a, Abril Ramírez-Higuera ^b, Carolina Peña-Montes ^a, Sergio Alberto Cortés-Ramírez ^c, Mauricio Rodríguez-Dorantes ^c, Óscar López-Franco ^d and Rosa María Oliart-Ros ^a

^aUnidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA), Tecnológico Nacional de México/IT Veracruz, Veracruz, México; ^bCátedras Conacyt, Tecnológico Nacional de México/IT Veracruz, Veracruz, México; ^cLaboratorio de Oncogenómica, Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), CDMX, México; ^dInstituto de Ciencias de la Salud, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

ABSTRACT

Introduction: Parkinson's disease (PD) is a chronic neurological disorder whose pathogenesis involves the loss of dopaminergic neurons and dopamine terminals, formation of Lewy bodies, and microgliosis. Its treatment includes dopamine-based drugs with limited results and adverse effects. Additionally, some neuroleptic drugs used for mental disorders produce side effects referred to as parkinsonism. Dietary interventions with ω -3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFA) have attracted attention since they play a key role in most of the processes associated with PD etiology. **Objective:** The purpose of our work was to investigate the effects of an ω -3 PUFA rich algal oil on locomotive alterations induced by haloperidol and D_2 receptor protein and gene expression in Wistar rats. **Methodology:** Pre- and co-supplementation of algal oil (300 mg of ω -3 FA/kg/day for six weeks) and haloperidol (1.5 mg/kg/day for two weeks) were evaluated. **Results:** Haloperidol provoked locomotive alterations in the Open Field Test and a 43% diminution in D_2 receptor in brain membranes; in pre-supplemented rats a 93% increase in D_2 receptor protein expression and a partial maintenance of locomotory performance were observed, while in co-supplemented rats D_2 receptor protein expression was maintained as in control rats, although locomotive behavior was found diminished as in haloperidol rats.

Conclusions: These results confirm the beneficial effects of ω -3 PUFA over locomotory alterations and as neuroprotective and neurorestorative compounds and demonstrates a stimulatory action on D_2 receptor presence, as a mechanism by which these fatty acids participate in brain health.

KEYWORDS

Parkinsonism; omega-3 PUFA; algal oil; haloperidol; D_2 dopamine receptor

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most frequent chronic neurological disorder in the world affecting 1% of population above 60 years and 4% over 80 years [1]. It is characterized by motor symptoms including resting tremor, rigidity, bradykinesia and postural instability, as well as sleep disorders, and autonomic, gastrointestinal, sensory, and neuropsychiatric symptoms [2, 3].

Its pathogenesis involves the slow and progressive loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta*, which leads to the loss of dopamine terminals in the striatum, formation of Lewy bodies, and microgliosis [4, 5]. Although the etiology of idiopathic PD remains unknown, oxidative stress, apoptosis, endosomal-lysosomal and mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, altered protein handling, excitotoxicity, inflammation and immune response have been associated with PD pathology [1, 5, 6]. The main treatment for PD consists of dopamine-based

drugs administration, including the dopaminergic precursor 3,4-dihydroxy-phenylalanine (L-DOPA), that control symptoms but does not affect the course of the disease and produce adverse effects after chronic administration [5, 7].

In addition to the neurodegenerative form of the disorder, considerable evidence indicates that some neuroleptic drugs used for the treatment of mental disorders as psychoses and schizophrenia, produce side effects as a result of the dopamine antagonism or the D_2 dopamine receptors (D_2R) blockade, that are similar to those found in PD, and are referred to as parkinsonian syndromes or parkinsonism. Typical motor disorders of parkinsonism include motor slowing, loss of spontaneous movement, impairments in skilled motor control and locomotion, postural abnormalities, rigidity, tardive dyskinesia, resting tremor, and vacuous jaw movements [8].

One of the most potent and widely used antipsychotic drugs is the butyrophenone Haloperidol, whose

CONTACT Rosa María Oliart-Ros  roliart@itver.edu.mx

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

mechanism of action involves the blockade of post-synaptic D₂R [9]. It induces parkinsonism due to oxidative stress, cell damage and neurotoxicity generated by haloperidol-produced free radicals and a reduction in antioxidant enzyme's levels, causing damage in motor regions of the brain [10]. Neuron damage is particularly important at membranes, and the undesirable effects may persist for months, years or even be irreversible after drug withdrawal, depending on the length of the treatment [11].

Due to the prevalence of PD and the secondary effects caused by dopamine-based drugs and neuroleptics, several studies in humans and animal models have focused on the development of therapies to treat and prevent this disease. In that respect, dietary interventions have attracted much attention, such as the consumption of ω -3 PUFA, particularly eicosapentaenoic acid (C 20:5, EPA) and docosahexaenoic acid (C 22:6, DHA) [1]. Several studies in humans have reported an association of a high intake of ω -3 PUFA with low rates of cognitive decline, better working memory, improved cognitive performance [12], processing speed and cognitive flexibility [13], as well as a reduced PD risk. In rodents, the intake of ω -3 PUFA has been found critical to perform learning and behavioral tasks [14, 15]. On the other side, several reports indicate that low levels of PUFA, especially a diet low in DHA, results in learning disorders and cognitive function [16], and it's linked to neurological diseases such as Alzheimer's disease, PD, suicide, depression, anxiety, bipolar disorders, and dementia [16, 17]. In most studies, fish oil has been used as source of ω -3 PUFA; however, algal and krill oils are also good sources of EPA and DHA, that are commercially available and can be considered as an alternative to fish products in vegetarian diets. An example is the oil obtained from the micro-algae *Schizochytrium*, which contains high levels of DHA and is Generally Recognized as Safe (GRAS) as a nutritional food ingredient [18].

The purpose of this study was to evaluate the effect of a ω -3 PUFA rich algal oil in the locomotive function and D₂R protein and gene expression in a parkinsonism model induced by haloperidol, using two experimental approaches: pre-supplementation (algal oil administered previous to haloperidol) and co-supplementation (algal oil administered with haloperidol).

2. Materials and methods

2.1. Animals

Forty-two male Wistar rats (21 days old) (Envigo RMS S.A. de C.V.) were housed in individual stainless-steel cages and maintained in an inverted 12 h light/dark

cycle at $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Rats were acclimated for one week before experimentation. Animals were fed with Rodent laboratory Chow 5001 (Purina) and water *ad libitum*. Experiments were performed during the dark cycle, and in accordance with the Guide for the Care Use of Laboratory Animals of the Mexican Council for Animal Care (NOM-0-62-ZOO-1999) and International Committee guidelines. The protocol was approved by the Scientific Research Committee from the Tecnológico Nacional de México/IT Veracruz.

2.2. Experimental model

The experimental period lasted eight weeks (Figure 1). During the first six weeks animals were randomly divided into two groups ($n=14$, each) and treated either with an intragastrical dose of 4 g/kg/day of the algae oil supplement (AO) equivalent to 300 mg of ω -3 PUFA/kg/day (Figure 1, group B), or an intragastrical dose of water (a volume equivalent to AO) (Figure 1, group A). All the animals received a daily intraperitoneal injection of saline solution (1.5 mL/kg/day) for the rats to get used to this procedure and avoid interferences with behavior tests. In the last two weeks, animals formed six groups, four derived from group A (C, H, AO-Co and AO+H-Co) and two derived from B (AO-Ps and AO+H-Ps) (Figure 1): C ($n=7$) received an intragastrical dose of water (a volume equivalent to AO) and an intraperitoneal injection of saline solution (1.5 mL/kg/day); H ($n=7$) received an intragastrical dose of water and an intraperitoneal injection of haloperidol (1.5 mg/kg/day); AO-Co ($n=7$) received the intragastrical dose of AO and an intraperitoneal injection of saline solution (1.5 mL/kg/day); AO+H-Co ($n=7$) received the intragastrical dose of AO and an intraperitoneal injection of haloperidol (1.5 mg/kg/day); AO-Ps ($n=7$) received the intragastrical dose of AO and an intraperitoneal injection of saline solution (1.5 mL/kg/day); and AO+H-Ps ($n=7$) received the intragastrical dose of AO and an intraperitoneal injection of haloperidol (1.5 mg/kg/day).

Haloperidol (Sigma-Aldrich #H0100100) in 0.3% phosphoric acid saline solution was administered every day at the same time during the dark cycle, after the intragastrical dose of water/algal oil supplement. The AO supplement (DHA S10-P200, DSM Nutritional Products Ltd.) was dissolved in purified water and administered with an intragastrical canula. AO supplement components are: glucose syrup solids (30–40%), algal oil (30–40%), modified corn starch (20–25%), mannitol (5–10%), sodium ascorbate (1–5%), and 2% or less of sodium polyphosphate, glycerol mono- and di-stearate, tricalcium phosphate, high oleic sunflower oil, sunflower

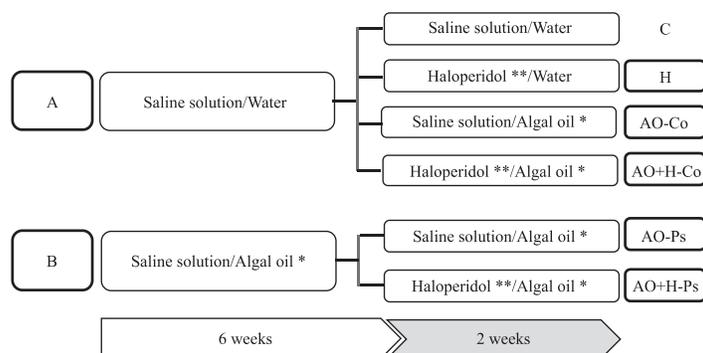


Figure 1. Experimental design. Pre-supplementation for six weeks with water (A) or Algal oil (AO) (B) ($n=14$). Co-supplementation for two weeks ($n=7$): C, control; H, haloperidol treated; AO-Co, supplemented with AO; AO + H-Co, supplemented with AO and treated with haloperidol; AO-Ps, supplemented with AO; AO + H-Ps, supplemented with AO and treated with haloperidol. * Algae oil supplement (AO) 4 g/kg/day equivalent to 300 mg of ω -3 PUFA/kg/day, intragastrical; ** Haloperidol 1.5 mg/kg/day, intraperitoneal.

lecithin, natural flavors, mixed natural tocopherols and ascorbic palmitate. AO's fatty acids profile is shown in Table 1.

At the end of the experimental protocols, rats were sacrificed by decapitation and brains were laterally dissected, frozen in liquid nitrogen and kept at -70°C until use. Frontal cortex and posterior region were used for fatty acid's profile analysis; the midbrain (including the *substantia nigra* and the ventral tegmental area) was used to determine D_2R protein and gene expression.

2.3. Behavior testing

The Open-field test was conducted to evaluate rats' spontaneous locomotor activity the day before haloperidol administration (S1), and at days 1 (S2), 7 (S3) and 14 (S4) of haloperidol treatment, four hours after haloperidol injection.

Table 1. Fatty acid profile of the ω -3 PUFA enriched algal oil.

Fatty acids	(%)
Myristic acid (C14:0)	8.93
Palmitic acid (C16:0)	35.78
Palmitoleic acid (C16:1)	0.26
Stearic acid (C18:0)	14.25
Oleic acid (C18:1)	13.78
Isomeric Oleic acid	1.60
Linoleic acid (C18:2)	2.64
Arachidic acid (C20:0)	0.18
Linolenic acid (C18:3)	0.83
Behenic acid (C22:0)	0.68
Arachidonic acid (C20:4)	2.19
Eicosapentaenoic acid (C20:5)	0.70
Docosapentaenoic acid (C22:5)	7.24
Docosahexaenoic acid (C22:6)	10.87

An opaque acrylic box ($44 \times 33 \times 20$ cm) was used, with 12 squares drawn on the bottom (11×11 cm). Four motor parameters were video registered under red light during 5 min: the number of crossed squares (one crossed square was considered when $\frac{3}{4}$ of the body was in the next square), the time spent in vertical position (rearing), in horizontal position (locomotion), and in immobility. A preliminary 5 min test was carried out for habituation of the animal, which was discarded for the statistical analysis. The floor was cleaned with 5% ethanol to eliminate possible interferences caused by odor of previous animals. Videos were analyzed by three blind evaluators in a computer program.

2.4. Lipids extraction and analysis

200 mg of frozen frontal cortex and posterior region from each brain were pulverized in a frozen stainless-steel mortar and resuspended in 50 mM Tris-MgCl₂ buffer, pH 7.5. Lipids were extracted by the Folch method. Fatty acids (FA) were methylated with 0.5 M sodium methoxide in methanol at 80°C for 10 min, extracted with hexane and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry in an Agilent Technologies 5977A MSD GC system (Model 7890B).

Column temperature was set at 100°C for 5 min, then increased to 240°C by $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and finally increased to 220°C by $1.7^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The injector and detector temperatures were 200 and 250°C , respectively. Nitrogen was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 ml/min; injection was in split mode (1:20) and the injection volume was 1.0 μl . FA composition

was expressed as % of total FA as mean \pm standard deviation.

2.5. Western blot analysis of d_2r

300 mg of frozen medial portion of brain was pulverized in a sterilized stainless-steel mortar and resuspended in 0.5 mL 50 mM Tris-EDTA buffer with 1% of the protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma-Aldrich México) and 1% of the phosphatase inhibitor cocktail 3 (P0044, Sigma-Aldrich México). After 1 h on ice at 90 rpm, samples were centrifuged at 12,000 xg for 10 min at 4°C and protein concentration was measured by the BCA method (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher). Proteins were resolved by 12.5% SDS-PAGE, transferred onto PVDF membranes and analyzed with transitory staining with Ponceu's Red (Sigma-Aldrich). After clearance, membranes were immunoblotted with anti- D_2 receptor antibody (Millipore, Cat. AB508AP, 1:1000), visualized by chemiluminescence (Luminata™ Forte Western HRP Substrate), and reprobed with anti- α -tubulin antibody (Abcam, Cat. Ab52866, 1:5000) as loading control.

2.6. mRNA expression

A frozen portion of the medial region of the brain (100 mg) was pulverized in a sterilized stainless-steel mortar and RNA was extracted in 1 mL of Trizol (Invitrogen). RNA concentration was determined in a NanoDrop 2000 UV-Vis spectrophotometer (NanoDrop Technologies). Total RNA was reverse transcribed using the ReverAit kit K1622 (Thermo Fisher Scientific). Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using the SYBR-Green method (kit #KK4601, KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix) in a StepOne™ Thermal Cycler Real Time PCR System (Applied Biosystems), with these conditions: 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. D_2R gene primers (# QT01081990) were acquired in Quantitec® Primer Assay (Quiagen). All samples were analyzed in duplicate and normalized to β -actin gene. Ct-values for the target and housekeeping genes were documented, and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ value was used to semiquantitatively express D_2R mRNA expression.

2.7. Statistical analysis

Data are given as mean \pm standard deviation. Statistical significance was calculated with analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. The differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Brain fatty acids' profile

No differences in brains FA composition were found among C, H, AO-Co and AO + H-Co, but significant differences were observed in pre-supplemented groups, particularly in C20:4 ω -6 that diminished 53% in AO-Ps and 50% in AO + H-Ps, and ω -3 PUFA (C18:3 + C20:5 + C22:5 + C22:6) that increased 235% in AO-Ps and 254% in AO + H-Ps compared to C. The ω -3/ ω -6 ratio was also higher in pre-supplemented groups in comparison to C: 4.7 in AO-Ps and 4.8 in AO + H-Ps vs 0.95 in C (Table 2).

3.2. Effect of AO on locomotor function

Haloperidol and AO supplementation induced significant changes in rats' locomotor activity. The percentage of time spent in vertical position is shown in Figure 2(A). In S1, all groups spent a similar time in rear position. However, after haloperidol administration the percentage of time spent in rear position of H rats diminished significantly to <10% in the three sessions; in AO + H-Ps percentage diminished to 53-83%, with no significant differences with C in S3 and S4; in AO + H-Co percentage diminished to <12% in S2 and S3, but in S4 percentage increased to $38.7 \pm 3.4\%$ probably because the positive effect of AO was starting to be evident. AO per se did not have any effect over rearing behavior (AO-Ps and AO-Co), except for AO-Co in S2 ($60.1 \pm 14\%$), which might be due to an alteration caused by the initiation of AO administration, that was restored after rats' habituation.

The time spent in exploratory horizontal activity in H and AO + H-Co diminished to <30% (Figure 2B). In AO + H-Ps activity diminished to 59-75%, with no statistical differences amongst the three sessions, significantly lower than C (22% in average) but higher than H. AO per se did not have any effect over horizontal activity (AO-Ps, AO-Co).

Time in immobility significantly increased to 206-238 s in H, and to 156-221s in AO + H-Co, with no significant differences among sessions. In AO + H-Ps the immobility time was 26-120 s, without significant differences with C; the higher immobility time observed in S2 might be due to the initiation of haloperidol administration (Figure 2C).

The number of crossed squares dropped to <3.4 in H and AO + H-Co, with no differences among sessions. However, in AO + H-Ps, rats crossed 18-36 squares, a number significantly higher than H and AO + H-Co, and lower than C, who crossed 88 squares in average (Figure 2D).

Table 2. Fatty acid profile of brain tissue (frontal and occipital cortex) from experimental groups.

Fatty acids	C (%)	H (%)	AO + H-Ps (%)	AO + H-Co (%)	AO-Ps (%)	AO-Co (%)
Myristic Acid (C14:0)	1.43 ± 0.38 ^a	1.17 ± 0.14 ^a	8.53 ± 0.84 ^b	1.38 ± 0.42 ^a	8.54 ± 0.49 ^b	1.22 ± 0.25 ^a
Palmitic Acid (C16:0)	36.91 ± 0.58 ^a	36.98 ± 1.48 ^a	32.2 ± 2.53 ^a	37.32 ± 2.63 ^a	34.34 ± 2.02 ^a	36.21 ± 1.26 ^a
Palmitoleic Acid (C16:1)	0.29 ± 0.06 ^a	0.28 ± 0.04 ^a	0.24 ± 0.04 ^a	0.29 ± 0.04 ^a	0.24 ± 0.01 ^a	0.29 ± 0.02 ^a
Stearic Acid (C18:0)	24.69 ± 1.6 ^a	25.77 ± 1.49 ^a	15.5 ± 2.63 ^b	25.76 ± 3.67 ^a	15.49 ± 2.56 ^b	25.73 ± 2.34 ^a
Oleic Acid (C18:1)	17.58 ± 1.72 ^a	17.4 ± 1.13 ^a	13.25 ± 1.22 ^b	16.85 ± 2.28 ^a	12.83 ± 0.66 ^b	16.1 ± 0.56 ^a
Isomeric Oleic Acid	3.03 ± 0.92 ^a	3.63 ± 0.32 ^a	1.71 ± 0.12 ^b	3.21 ± 0.33 ^a	1.64 ± 0.10 ^b	4.17 ± 1.90 ^a
Linoleic Acid (C18:2)	2.39 ± 0.63 ^a	2.04 ± 0.22 ^a	2.59 ± 0.37 ^a	1.83 ± 0.79 ^a	2.4 ± 0.19 ^a	1.67 ± 0.26 ^a
Arachidic Acid (C20:0)	1.38 ± 0.05 ^a	1.31 ± 0.11 ^a	0.78 ± 0.10 ^b	1.22 ± 0.24 ^a	0.73 ± 0.06 ^b	1.2 ± 0.15 ^a
Linolenic Acid (C18:3)	0.07 ± 0.03 ^a	0.06 ± 0.02 ^a	0.16 ± 0.02 ^b	0.06 ± 0.03 ^a	0.15 ± 0.01 ^b	0.05 ± 0.02 ^a
Behenic Acid (C22:0)	0.97 ± 0.07 ^a	0.96 ± 0.08 ^a	0.64 ± 0.08 ^b	1.02 ± 0.12 ^a	0.6 ± 0.06 ^b	0.99 ± 0.04 ^a
Arachidonic Acid (C20:4)	4.2 ± 0.23 ^a	4.23 ± 0.22 ^a	2.1 ± 0.29 ^b	4.5 ± 0.55 ^a	1.96 ± 0.18 ^b	4.24 ± 0.38 ^a
Eicosapentaenoic acid (C20:5)	0.02 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.0 ^a	0.62 ± 0.09 ^b	0.02 ± 0.00 ^a	0.6 ± 0.06 ^b	0.03 ± 0.01 ^a
Docosapentaenoic acid (C22:5)	0.28 ± 0.04 ^a	0.26 ± 0.06 ^a	6.4 ± 1.05 ^b	0.28 ± 0.11 ^a	5.82 ± 1.07 ^b	0.37 ± 0.22 ^a
Docosahexaenoic acid (C22:6)	5.94 ± 0.35 ^a	5.85 ± 0.49 ^a	15.21 ± 1.00 ^b	6.2 ± 1.03 ^a	14.6 ± 1.82 ^b	7.66 ± 0.96 ^a
Total n-3	6.31	6.19	22.39	6.56	21.17	8.11
n-3 / n-6	0.95	0.98	4.7	1.03	4.8	1.3

Note: C: control; H: haloperidol treated; AO + H-Ps: pre-supplemented with AO and treated with haloperidol; AO + H-Co: co-supplemented with AO and treated with haloperidol; AO-Ps: pre-supplemented with AO; AO-Co: co-supplemented with AO. Values are mean ± standard deviation. Statistical significance determined by ANOVA and Tukey's test. Different letters mean statistical difference between groups ($p < 0.05$).

3.3. Effect of AO in D₂R protein and gene expression

As shown in Figure 3(A), haloperidol (H) reduced 43% D₂R protein. AO did not affect D₂R in AO-Co, but showed a protective effect over the receptor protein

diminution exerted by haloperidol in AO + H-Co, since expression was 78% higher than in H. In pre-supplemented rats, D₂R protein was higher than C (increases of 107% in AO-Ps and 93% in AO + H-Ps) and 238% higher in AO + H-Ps than H. These results

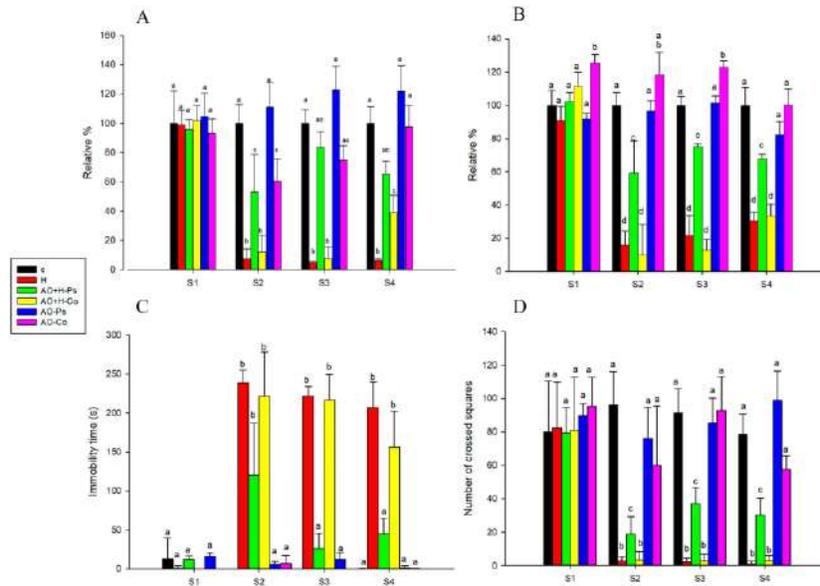


Figure 2. Locomotor function of rats in the Open Field Test. **A.** Percentage of time spent in vertical position. **B.** Percentage of time spent in horizontal position. **C.** Total time spent in immobility. **D.** Number of crossed squares. C: control; H: haloperidol treated; AO + H-Ps: pre-supplemented with AO and treated with haloperidol; AO + H-Co: co-supplemented with AO and treated with haloperidol; AO-Ps: pre-supplemented with AO; AO-Co: co-supplemented with AO. S1: day before haloperidol administration; S2: day 1 of haloperidol administration; S3: day 7 of haloperidol administration; S4: day 14 of haloperidol administration. Recordings made four hours after haloperidol injection. Values are mean ± standard deviation. Statistical significance determined by ANOVA and Tukey's test. Different letters mean statistical difference between groups ($p < 0.05$).

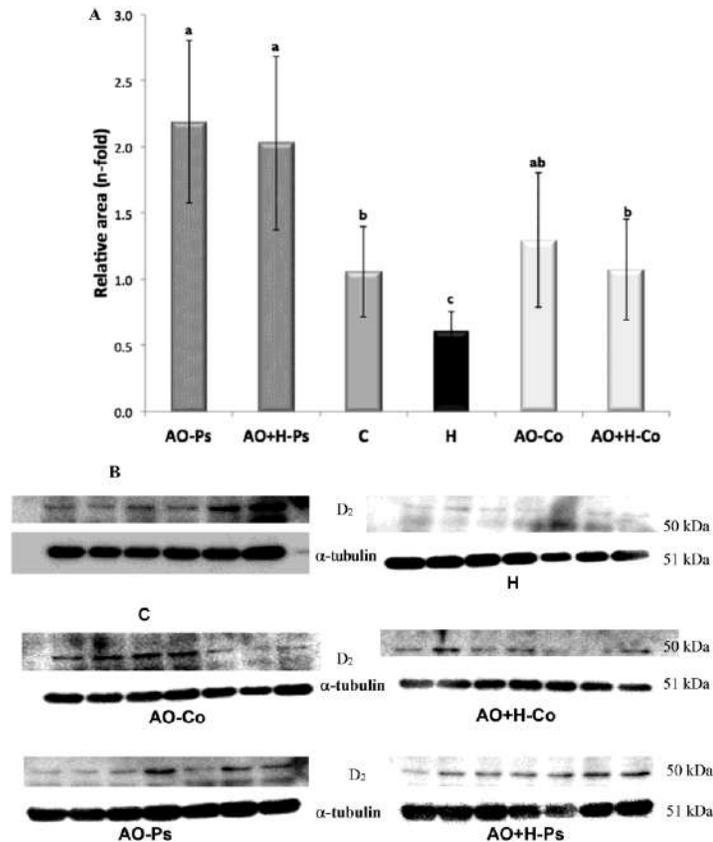


Figure 3. A. – D₂ dopamine receptor expression with respect to α-tubulin. B. – D₂ dopamine receptor immunoblots of experimental groups. C: control; H: haloperidol treated; AO + H-Ps: pre-supplemented with AO and treated with haloperidol; AO + H-Co: co-supplemented with AO and treated with haloperidol; AO-Ps: pre-supplemented with AO; AO-Co: co-supplemented with AO. Values are mean ± standard deviation. Statistical significance determined by ANOVA and Tukey's test. Different letters mean statistical difference between groups ($p < 0.05$).

suggest that AO supplementation for eight weeks not only protected over haloperidol effect but exerted a stimulatory action on the presence of the D₂R protein in midbrain cells' membranes.

With respect to D₂R gene (Figure 4), a 21% increased expression was observed in H in comparison with C, which could be due to a compensatory mechanism for the lower presence of the receptor protein at the membrane level (Figure 3A). In AO + H-Co, the increase in D₂R gene expression was even higher (92% vs C and 58% vs H), suggesting that AO potentiated the compensatory effect observed in H, which is manifested by the higher presence of the D₂R protein observed in this group (Figure 3A). In AO-Ps, D₂R gene expression was

similar to C and 44% lower in AO + H-Ps, which suggests that after eight weeks of AO supplementation, an equilibrium was reached between gene expression and D₂R protein at the membrane level.

4. Discussion

The fundamental role of ω-3 PUFA in brain development and function, and the link between an ω-3 deficiency and neurological diseases such as PD, have been extensively reported [1, 16, 17, 19–21]. Although the mechanisms underlying ω-3 PUFA actions on brain function are not completely established, they have been related to their incorporation into brain

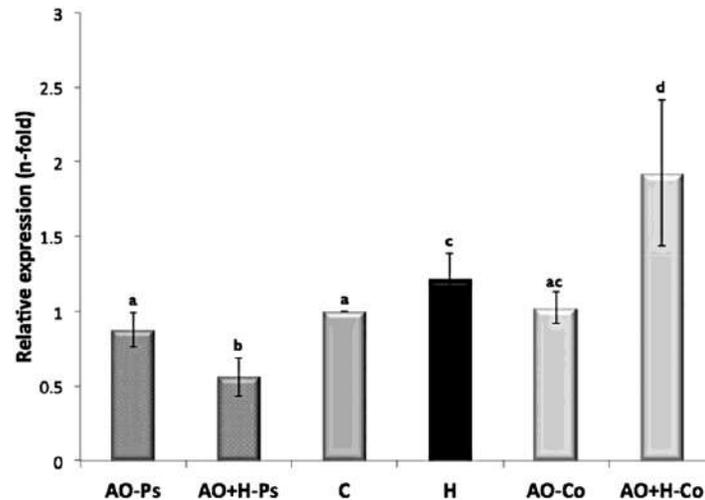


Figure 4. Relative expression of the D_2 dopamine receptor with respect to β -actin. C: control; H: haloperidol treated; AO + H-Ps: pre-supplemented with AO and treated with haloperidol; AO + H-Co: co-supplemented with AO and treated with haloperidol; AO-Ps: pre-supplemented with AO; AO-Co: co-supplemented with AO. Values are mean \pm standard deviation. Statistical significance determined by ANOVA and Tukey's test. Different letters mean statistical difference between groups ($p < 0.05$).

membranes and participation in membrane receptors function and activation, stimulation of signal transduction, as ligands of transcription factors in gene expression, as precursors of anti-inflammatory (resolvins, maresins, neuroprotectin D1, elovonoids) and anti-apoptotic (neuroprotectin D1, electrophile oxo-derivatives (EFOXs)) compounds, as antioxidants and inhibitors of cytokines, nitric oxide and ROS production, and as promoters of synaptogenesis, synaptic function, neuronal differentiation, brain growth and development [10, 17, 19, 22–28].

In rodent models of PD, neuroprotective and neurorestorative actions of ω -3 PUFA have been related to their antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic and neurogenesis stimulatory effects. In most of these studies parkinsonism is induced in rats or mice with the neurotoxins MPTP [29–33], 6-OHDA [5, 26, 34–36], and rotenone [37], that cause motor dysfunction by the degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons due to mitochondrial dysfunction and subsequent oxidative stress [38]. In our work, parkinsonism was induced by the neuroleptic haloperidol, commonly used as an antipsychotic drug, that causes locomotive disorders in rats similar to those observed in PD patients; its mechanism of action is mediated by the blockade of D_2R [9, 39]. Given the need to find therapeutic agents with neuroprotective effects for PD and parkinsonism, the purpose of our work was to investigate the preventive

effects of a ω -3 PUFA rich AO on locomotive alterations induced by haloperidol in Wistar rats, and to deepen in the mechanisms implicated by analyzing its relationship with the D_2R protein and gene expression.

To the best of our knowledge, ω -3 PUFA administration effects have been analyzed in the haloperidol-induced model in two other investigations: Barcelos et al. (2010) who reported that fish oil supplementation, 4 weeks previous and 4 weeks during haloperidol and fluphenazine administration, resulted in the prevention or attenuation of orofacial dyskinesia and memory loss, suggesting that the results might be due to a reduction of lipid peroxidation and ROS production; [10] and de Araújo et al. (2017) who co-administered haloperidol with lipoic acid and/or fish oil to male Wistar rats for 31 days, observing an improvement in motor performance associated to the reduction in ROS levels and the increase of antioxidant enzymes [21]. There are no other published works where the algae oil supplement utilized in our investigation has been evaluated.

In our study, we used two approaches: the pre-supplementation of a ω -3 PUFA rich AO for six weeks prior and during haloperidol administration for two weeks, and the co-supplementation of AO and haloperidol for two weeks, in Wistar rats, and analyzed the effect on rats' spontaneous locomotive function and D_2R protein and gene expression. Haloperidol diminished significantly the spontaneous locomotion of rats as

evidenced by the decrease in the time spent in rearing position (94%), locomotion (78%), number of crossed squares (98%), and the increase in immobility time (221%). AO pre-supplementation, but not co-supplementation, partially protected the rats over the effects of haloperidol, since the alterations in locomotive behavior were much less pronounced in pre-supplemented rats, while no differences with haloperidol treated rats were found in co-supplemented animals.

D₂R mediate dopamine function in the brain and control locomotive behavior, its degeneration has been associated with PD progression and are the target of many centrally acting drugs, mainly of antipsychotics [40]. In our work, in addition to the alterations in locomotive function, haloperidol provoked a significant reduction of D₂R protein in the midbrain, accompanied by a compensatory increase in D₂R mRNA, which could be explained by the blockade of D₂R and neuron damage due to the generation of oxidative stress and lipid peroxidation in membranes associated with haloperidol [9, 10, 41].

AO co-supplementation protected rats against D₂R protein loss since its presence was higher than in haloperidol treated rats and similar to control rats, accompanied with a greater increase in receptor gene expression, suggesting a neuroprotective action on dopaminergic system neurons. However, it was not sufficient to compensate for haloperidol-blocked receptors since locomotor function was not restored, except for rearing behavior that showed a significant increase at the end of the experiment. A longer treatment with AO must be necessary to observe improvements in locomotory behavior, as suggested by pre-supplemented groups.

Interestingly, in pre-supplemented rats with (AO + H-Ps) or without (AO-Ps) haloperidol, D₂R was higher than in control rats, suggesting a neuroprotective action of AO against haloperidol effects and a stimulatory action on D₂ receptors presence in brain membranes. D₂R gene expression was not increased, which might indicate that an equilibrium was reached after eight weeks of AO administration. The D₂R increase was accompanied by an improved locomotory performance, particularly in rearing and immobility that reached the levels observed in control rats. It is interesting to note that similar results were observed in a group of rats that were supplemented with AO for six weeks and then treated with haloperidol without AO (data not shown), suggesting that pre-supplementation for six weeks was sufficient to exert the protective effect, at least under the evaluated conditions.

There are various interconnected mechanisms that might underlie the beneficial effects of ω -3 PUFA, that are based on their incorporation into cells membranes,

in particular the long and highly unsaturated EPA and DHA. In that respect, a 3.5-fold increase in ω -3 PUFA was observed in brain membranes of pre-supplemented rats. An important aspect of ω -3 PUFA, and specially DHA, is their role as ligands and activators of a variety of receptors that act as transcription factors, such as the retinoid X receptor (RXR), that in conjunction with the nuclear receptor-related-1 protein (Nurr1) and the nerve growth factor 1B (Nur77), play a crucial role in the development and survival of the dopaminergic system. In particular, RXR regulates the expression of the D₂R gene, so the increase in D₂R density and expression in supplemented rats might have been the result of the binding of DHA to the RXR alpha ligand-binding domain and its interaction with the D₂R gene promoter [28, 42]. In addition, as constituents of phospholipids of cell membranes, ω -3 PUFA contribute to membrane fluidity and to the formation and function of lipid rafts where many proteins involved in signal transduction, such as the dopamine receptors, are predominantly located, favoring their insertion, functionality and signal transduction [28], which might have also contributed to the increased presence of D₂R protein in midbrain membranes.

There are additional mechanisms reported in other PD experimental models that could have contributed to the observed results, although they were not evaluated in this work. For example, neurogenesis could also be implicated in the increase in D₂R in the midbrain since ω -3 PUFA modulates the expression of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), that stimulates the growth and enlargement of neurons; [30, 34] an effect of DHA over cell survival and apoptosis blockade, probably mediated by the activation of PI3K/Akt pathway; [29, 31] the diminution of lipid peroxidation and nitrites levels; [35] the reduction of ROS, nitric oxide and the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ levels; [32, 43] or the decrease in astrogliosis and microgliosis [6, 36].

In conclusion, the administration of a ω -3 PUFA rich AO to male Wistar rats protected dopaminergic neurons from the D₂R loss provoked by haloperidol injection. When AO was administered for eight weeks (six weeks prior and two weeks during haloperidol treatment), neuroprotection was manifested as an increase in D₂R density and in the improvement of locomotory performance; when algal oil was administered at the same time as haloperidol (two weeks), D₂R protein was maintained in normal levels, although locomotive behavior was found affected as in haloperidol treated rats, indicating that a longer treatment is necessary to restore locomotion.

Our results confirm the beneficial effects of ω -3 PUFA over locomotory alterations and as neuroprotective and

neurorestorative compounds in PD related models. In addition, our work demonstrates that ω -3 PUFA exert protective and stimulatory actions on D₂R presence in the midbrain, as other mechanism by which these fatty acids participate in brain health. In consequence, ω -3 PUFA rich D₂R could be considered as a nutraceutical option to prevent or alleviate the progression of Parkinson's disease and of parkinsonism induced by neuroleptic drugs.

Acknowledgements

Alejandra Barroso-Hernández acknowledges the National Council for Science and Technology (Conacyt, México) for her PhD scholarship. Authors thank Conacyt for funding (grant number 105636).

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

Alejandra Barroso-Hernández acknowledges the National Council for Science and Technology (Conacyt, México) for her PhD scholarship. Authors thank Conacyt for funding [grant number 105636].

Notes on contributors

MC. Alejandra Barroso-Hernández, is a PhD student in Food Science (Mexican Technological Institute/Technological Institute of Veracruz), Graduate in Clinical Chemistry (University of Veracruz) and master in Biochemical Engineering (Mexican Technological Institute/Technological Institute of Veracruz). Areas of experience and research: biochemistry, molecular biology and degenerative diseases.

Dra. Abril Ramírez-Higuera is a Conacyt researcher/professor and head of the Nutritional Biochemistry laboratory at the Food Research and Development Unit of the Mexican Technological Institute/Technological Institute of Veracruz. Her work contemplates the effect of natural bioactive compounds on chronic non-communicable diseases, in relation to the biochemical pathways implicated and their genetic and epigenetic regulation, using in vivo and in vitro models, as well as in human population.

Dra. Carolina Peña-Montes has a Food Chemistry BSc, Master's and Doctorate in Biochemical Sciences. She is a full-time Research Professor and head of the Genetics laboratory at the Food Research and Development Unit, Mexican Technological Institute/Technological Institute of Veracruz. Her research interests are Biotechnology (Molecular methods for the analysis of food, purification and characterization of enzymes, expression of enzymes in heterologous systems, microbial ecology and food metagenomics, detection of GMOs by molecular methods), biocatalysis and applications of enzymes.

Mr. Sergio Alberto Cortés-Ramírez is bachelor in Pharmaceutical Chemistry and a Biomedical Sciences PhD student, both at UNAM (National Autonomous University of Mexico). His expertise areas are molecular biology, genomics and hormone mechanisms.

Dr. Mauricio Rodríguez-Dorantes is a head of a prostate cancer lab at the National Institute of Genomic Medicine in Mexico City. He is interested in hormones, molecular and epigenetic mechanisms related to the development of the disease. Dr Rodríguez has published several papers in the field. He has been professor at the National University of México and in the Monterrey Technological Institute.

Dr. Óscar López-Franco is a Senior Research in University of Veracruz-México. Graduate in Biochemistry by Complutense University and Doctorate with Honours by Autonomía University (Madrid-Spain, 1998 and 2004, respectively). More than 20 years of research experience. During this time he has worked in three laboratories: Renal and Vascular Research Group led by Prof. J. Egido (Jimenez Diaz Foundation, Madrid, Spain); Cardiovascular Research Group (led by Prof. A.H. Baker, Glasgow, UK) and Biomedical Research Group (led by Prof. G.J. Graham, Glasgow, UK), both in University of Glasgow (from 1999 to 2013). Since 2014, he has led the group "Translational Medicine" in the Health Science Institute of the University of Veracruz. His research activities focus on the molecular mechanisms of immune renal, diabetes and atherosclerosis diseases, with special interest in Fc receptors, SOCS proteins, gene therapy and microRNAs. Working as part of a multidisciplinary groups composed of both scientist and clinicians has been invaluable in developing research projects. Member of National System of Researchers and referee of research projects.

Dra. Rosa María Oliart-Ros Oliart-Ros has a Biology BSc, Master's and Doctorate in Cellular Biology. She is a senior Research Professor at the Food Research and Development Unit from the Mexican Technological Institute/Technological Institute of Veracruz, head of the Biochemistry Laboratory. She is interested in the nutrigenetic and nutrigenomic effects of natural bioactive compounds in chronic diseases, particularly metabolic syndrome, Parkinson disease and cancer.

ORCID

Alejandra Barroso-Hernández  <http://orcid.org/0000-0002-6078-173X>

Abril Ramírez-Higuera  <http://orcid.org/0000-0002-1430-2689>

Carolina Peña-Montes  <http://orcid.org/0000-0002-4767-1210>

Sergio Alberto Cortés-Ramírez  <http://orcid.org/0000-0002-5967-0768>

Mauricio Rodríguez-Dorantes  <http://orcid.org/0000-0003-4249-7222>

Óscar López-Franco  <http://orcid.org/0000-0001-5069-3763>

Rosa María Oliart-Ros  <http://orcid.org/0000-0003-1204-8792>

References

- [1] Xicoy H, Bé W, Martens G. The role of Lipids in Parkinson's disease. *Cell*. 2019;8:27.

- [2] Chaudhuri K, Schapira A. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol.* 2009;8:464–474.
- [3] Andalib S, Vafaei MS, Gjedde A. Parkinson's disease and mitochondrial gene variations: A review. *J Neurol Sci.* 2014;346:11–19.
- [4] Schapira A. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2008;7:97–109.
- [5] Gómez-Soler M, Cordobilla B, Morató X, Fernández-Dueñas V, Domingo JC, Ciruela F. Triglyceride form of Docosahexaenoic acid Mediates neuroprotection in experimental parkinsonism. *Front. Neurosci.* 2018;12:604.
- [6] Hernando S, Requejo C, Herran E, Ruiz-Ortega JA, Morera-Herreras T, Lafuente JV, et al. Beneficial effects of n-3 polyunsaturated fatty acids administration in a partial lesion model of Parkinson's disease: The role of glia and Nrf2 regulation. *Neurobiol. Dis.* 2019;121:252–262.
- [7] Huot P, Johnston TH, Koprich JB, Fox SH, Brotchie JM. The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Pharmacol. Rev.* 2013;65:171–222.
- [8] Salamone J, Mayorga A, Trevitt J, Cousins M, Conlan A, Nawab A. Tremulous jaw movements in rats: a model of parkinsonian tremor. *Prog. Neurobiol.* 1998;56:591–611.
- [9] Vasconcelos S, Nascimento V, Nogueira C, Vieira C, Sousa F, Fonteles M, et al. Effects of haloperidol on rat behavior and density of dopaminergic D2-like receptors. *Behav Process.* 2003;63:45–52.
- [10] Barcelos RC, Benvegnú DM, Bouffleur N, Reckziegel P, Müller LG, Pase C, et al. Effects of omega-3 essential fatty acids (omega-3 EFAs) on motor disorders and memory dysfunction typical neuroleptic-induced: behavioral and biochemical parameter. *Neurotox Res.* 2010;3:228–37.
- [11] Guzen FP, Lopes JR, Lopes DM, Praxedes LG, Martins MS, Azevedo AN, et al. Haloperidol-induced preclinical tardive dyskinesia model in rats. *Current Protocols in Neuroscience.* 2019;68:88.
- [12] Solfrizzi V, Scafato E, Capurso C, D'Introno A, Colacicco AM, Frisardi V, et al. Metabolic syndrome and the risk of vascular dementia: the Italian longitudinal study on ageing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010;81:433–440.
- [13] Kalmijn S, van Boxtel MP, Ocke M, Verschuren WM, Kromhout D, Launer LJ. Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology.* 2004;62:275–280.
- [14] Fedorova I, Salem N. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2006;75:271–289.
- [15] Carrie I, Abellan Van Kan G, Rolland Y, Gillette-Guyonnet S, Vellas B. PUFA for prevention and treatment of dementia? *Curr. Pharm. Des.* 2009;15:4173–4185.
- [16] Chen CT, Green JT, Orr SK, Bazinet RP. Regulation of brain polyunsaturated fatty acid uptake and turnover. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty. Acids.* 2008;79:85–91.
- [17] Whelan J. (n-6) and (n-3) polyunsaturated fatty acids and the aging brain: food for thought. *J. Nutr.* 2008;138:2521–2522.
- [18] Doughman SD, Krupanidhi S, Sanjeevi CB. Omega-3 fatty acids for nutrition and medicine: considering Microalgae oil as a vegetarian source of EPA and DHA. *Curr Diabetes Rev.* 2007;3:198–203.
- [19] Bazinet RP, Laye S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2014;15:771–785.
- [20] Janssen CI, Kiliaan AJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Prog. Lipid Res.* 2014;53:1–17.
- [21] de Araújo DP, Camboim TGM, Silva AP, Silva CD, de Sousa RC, Barbosa MD, et al. Behavioral and neurochemical effects of alpha lipoic acid associated with omega-3 in tardive dyskinesia induced by chronic haloperidol in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017;95:837–843.
- [22] Sharon R, Bar-Joseph I, Mirick G, Serhan C, Selkoe D. Altered fatty acid composition of dopaminergic neurons expressing alpha-synuclein and human brains with alpha-synucleinopathies. *J Biol Chem.* 2003;278:49874–81.
- [23] Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Arita M. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2004;73:155–72.
- [24] Serhan CN, Yang R, Martinod K, Kasuga K, Pillai PS, Porter TF, et al. Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *J Exp Med.* 2009;206:15–23.
- [25] Lukiw WJ, Bazan NG. Docosahexaenoic acid and the aging brain. *J Nutr.* 2008;138:2510–4.
- [26] Delattre A, Kiss A, Szawka RE, Anselmo-Franci JA, Bagatini PB, Xavier LL, et al. Evaluation of chronic omega-3 fatty acids supplementation on behavioral and neurochemical alterations in 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. *Neurosci Res.* 2010;66:256–64.
- [27] Groeger AL, Cipollina C, Cole MP, Woodcock SR, Bonacci G, Rudolph TK. Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids. *Nat Chem Biol.* 2010;6:433–41.
- [28] Healy-Stoffel M, Levant B. n-3 (omega-3) fatty acids: effects on brain dopamine systems and potential role in the etiology and treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Neurol Disord Drug.* 2018;17:216–232.
- [29] Bousquet M, Saint-Pierre M, Julien C, Salem Jr N, Cicchetti F, Calon F. Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J.* 2008;22:1213–25.
- [30] Bousquet M, Gibrat C, Saint-Pierre M, Julien C, Calon F, Cicchetti F. Modulation of brain-derived neurotrophic factor as a potential neuroprotective mechanism of action of omega-3 fatty acids in a parkinsonian animal model. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009;33:1401–1408.
- [31] Hacıoğlu G, Seval-Celik Y, Tanriover G, Ozsoy O, Saka-Topcuoğlu E, Balkan S, et al. Docosahexaenoic acid provides protective mechanism in bilaterally MPTP-

- lesioned rat model of Parkinson's disease. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2012**;50:228–238.
- [32] Luchtman D, Meng Q, Song C. Ethyl-eicosapentaenoate (E-EPA) attenuates motor impairments and inflammation in the MPTP-probenecid mouse model of Parkinson's disease. *Behav. Brain. Res.* **2012**;226:386–396.
- [33] Ozkan A, Parlak H, Tanriover G, Dilmac S, Ulker S, Birsen I, et al. The protective mechanism of docosahexaenoic acid in mouse model of Parkinson: The role of hemeoxygenase. *Neurochem.* **2016**;101:110–119.
- [34] Coulombe K, Saint-Pierre M, Cisbani G, St-Amour I, Gibrat C, Giguere-Rancourt A, et al. Partial neurorescue effects of DHA following a 6-OHDA lesion of the mouse dopaminergic system. *J Nutr Biochem.* **2016**;30:133–42.
- [35] Barros A, Crispim R, Cavalcanti J, Souza R, Lemos J, Cristino Filho G, et al. Impact of the chronic omega-3 fatty acids supplementation in Hemiparkinsonism model induced by 6-Hydroxydopamine in rats. *Basic Clin. Pharmacol Toxicol.* **2017**;120:523–531.
- [36] Mori M, Delattre A, Carabelli B, Pudell C, Bortolanza M, Staziaki P, et al. Neuroprotective effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the 6-OHDA model of Parkinson's disease is mediated by a reduction of inducible nitric oxide synthase. *Nutr. Neurosci.* **2018**;21:341–351.
- [37] Serrano-García N, Fernández F, Luis E, Granados L, Juárez T, Orozco S, et al. Docosahexaenoic acid protection in a rotenone induced Parkinson's model: prevention of tubulin and synaptophysin loss, but no association with mitochondrial function. *Neurochem.* **2018**;121:26–37.
- [38] Jiang P, Dickson DW. Parkinson's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* **2018**;135:13–32.
- [39] Menegatti R, Fraga CA, Barreiro EJ, Lima VL, Rates SM, Costa TD. Esquizofrenia: Quarenta anos da hipótese dopaminérgica sob ótica da química medicinal. *Quim Nova.* **2004**;27:447–455.
- [40] Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* **2011**;63(1):182–217.
- [41] Samad N, Haleem DJ. Antioxidant effects of rice bran oil mitigate repeated haloperidol-induced tardive dyskinesia in male rats. *Metab Brain Dis.* **2017**;32:1099–1107.
- [42] Lane MA, Bailey SJ. Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog Neurobiol.* **2005**;75:275–293.
- [43] Luchtman DW, Meng Q, Wang X, Shao D, Song C. ω -3 fatty acid eicosapentaenoic acid attenuates MPP⁺-induced neurodegeneration in fully differentiated human SH-SY5Y and primary mesencephalic cells. *J Neurochem.* **2013**;124:855–68.