



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

### Posgrado en Ciencias Químicas

#### Maestría

Área: Bioquímica y Biología molecular

#### TESIS

#### Para obtener el grado de Maestría

“Estudio de los efectos neuroprotectores del tratamiento con los probióticos *L. rhamnosus* y *B. lactis* a nivel bioquímico y conductual en un modelo murino de enfermedad de Parkinson con disbiosis”

#### PRESENTA

QFB. Wendy Aurora Mayo Arellano

#### DIRECTORA DE TESIS

DC. Liliana Martínez Mendieta

#### ASESORA DE TESIS

DC. Victoria Palafox Sánchez

**JUNIO 2025**



**BUAP**

Oficio PCQ/114/2025

**Mtro. Alfredo Avendaño Arenaza**  
**Director General de Bibliotecas**  
**Presente**

A través de este medio me dirijo a usted para informarle que la tesis con título **Estudio de los efectos neuroprotectores del tratamiento con los probióticos *L. rhamnosus* y *B. lactis* a nivel bioquímico y conductual en un modelo murino de enfermedad de Parkinson con disbiosis**, ha sido avalada bajo los preceptos de integridad académica; por tanto, se autoriza la impresión de tesis de la alumna:

Nombre de la alumna: **Wendy Aurora Mayo Arellano**

Matrícula: **223470030**

Facultad: **Facultad de Ciencias Químicas – Instituto de Ciencias**

Programa Educativo: **Maestría en Ciencias Químicas**

Licenciatura o Posgrado: **Posgrado**

Sin más por el momento, agradezco la atención al presente.

**ATENTAMENTE**  
**“Pensar bien, para vivir mejor”**  
**H. Puebla de Z., a 19 de mayo de 2025**

  
**D.C. Juan Manuel Solano Altamirano**  
**Secretario Académico**



  
**D.C. Lilitana Martínez Mendieta**  
**Directora de Tesis**

  
**D.C. Victoria Palafox Sánchez**  
**Codirectora**

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Enfermedad de Parkinson .....	1
1.2 Fase prodrómica, síntomas motores y no motores en la EP .....	3
1.3 Hipótesis acerca del origen de la enfermedad de Parkinson.....	5
1.4 Microbiota intestinal .....	8
1.5 Microbiota y tracto gastrointestinal (TGI) en su papel inmunitario .....	14
1.6 Disbiosis intestinal .....	18
1.7 Disbiosis intestinal en la EP .....	20
1.8 Microbiota en modelos animales para el estudio de la EP .....	22
1.9 El modelo de lesión intraestriatal con LPS .....	25
1.10 Uso de probióticos en modelos experimentales de la EP .....	27
1.11 Marcadores metabólicos en plasma .....	29
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>33</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>34</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>5. DIAGRAMA DE TRABAJO</b> .....	<b>35</b>
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	<b>36</b>
6.1 Sujetos de estudio .....	36
6.2 Cirugía estereotáxica .....	36
6.3 Administración de tratamientos vía oral .....	37
6.4 Modelo del cilindro.....	37
6.5 Prueba Rotarod .....	39
6.6 Prueba de actividad intestinal, tasa de defecación y porcentaje de agua en heces ....	40
6.7 Recolección de heces para análisis del microbioma fecal .....	41
6.8 Eutanasia y recolección de muestras .....	41
6.9 Obtención de plasma/EDTA .....	42
6.10 Inmunohistoquímica (IHC) para TH e Iba-1 .....	42
6.10.1 Cuantificación del % de área teñida en el estriado .....	44
6.10.2 Cuantificación del número de neuronas en la SNpc .....	45
6.11 Análisis histopatológico del colon .....	46

6.11.1 Tinción de hematoxilina y eosina .....	47
6.11.2 Inmunohistoquímica (IHC) para MUC2 .....	48
6.12 Determinación de la proteína C- reactiva mediante el método de ELISA .....	50
6.13 Determinación de la Inmunoglobulina A (IgA) mediante el método de ELISA .....	52
6.14 Pruebas metabólicas en plasma.....	54
6.15 Extracción de ADN, análisis de calidad - concentración e integridad para el análisis del microbioma fecal .....	54
6.16 Análisis del microbioma fecal .....	56
6.16.1 Análisis de alfa diversidad .....	60
6.17 Análisis estadístico .....	61
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
7.1 El tratamiento agudo con probióticos no modifica la asimetría motora en un modelo de doble golpe en rata .....	62
7.2 El modelo de doble golpe no afecta la coordinación motora .....	63
7.3 El tratamiento agudo con probióticos previene la pérdida de la TH en el estriado en el modelo de doble golpe en ratas .....	64
7.4 El tratamiento agudo con probióticos no previene la pérdida de neuronas TH+ en la SNpc ipsilateral en el modelo de doble golpe.....	66
7.5 Los probióticos no disminuyen la activación de la microglía en el estriado dorsal en el modelo de doble golpe .....	68
7.6 La administración de LPS intraestriatal altera la actividad intestinal a 7 días post-lesión .....	70
7.7 El modelo de doble golpe no modifica la tasa de defecación, el peso húmedo y el porcentaje de agua en heces a 7 días post-lesión .....	71
7.8 El modelo de doble golpe no disminuyó la ganancia de peso en ratas .....	73
7.9 El tratamiento agudo con probióticos no previene el aumento del peso del ciego en un modelo de doble golpe en ratas .....	74
7.10 El tratamiento agudo con probióticos disminuye el daño en la citoarquitectura del colon distal en un modelo de doble golpe en rata.....	75
7.10.1 El tratamiento agudo con probióticos disminuye la pérdida de la expresión de mucina-2 en el colon distal en un modelo de doble golpe en rata .....	78
7.11 El modelo de doble golpe incrementa la concentración de la proteína C reactiva en plasma .....	81
7.12 El tratamiento agudo con probióticos no previene la disminución de la Inmunoglobulina A (IgA) en plasma .....	82

7.13 El modelo de doble golpe y el tratamiento agudo con probióticos no modifica marcadores metabólicos en plasma .....	83
7.14 El modelo de doble golpe y el tratamiento agudo con probióticos no modifica marcadores de actividad renal en plasma .....	84
7.15 El modelo de doble golpe y el tratamiento agudo con probióticos no modifica el nivel de proteínas en plasma .....	85
7.16 El modelo de doble golpe disminuye la riqueza y diversidad de especies en heces de acuerdo con los índices de Shannon y Fisher .....	86
7.17 El tratamiento con probióticos aumenta la abundancia del filo <i>Firmicutes</i> en heces.	88
7.17.1 El tratamiento con probióticos aumenta la abundancia de la clase <i>Bacilli</i> en heces .....	89
7.17.2 El tratamiento con probióticos aumenta la abundancia del orden <i>Lactobacillales</i> en heces .....	90
7.17.3 El tratamiento con probióticos aumenta la abundancia de la familia <i>Lactobacillaceae</i> en heces.....	91
7.17.4 El tratamiento con probióticos aumenta la abundancia del género <i>Lactobacillus</i> en heces .....	92
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>93</b>
8.1 Modelo de doble golpe en fase aguda (8 días).....	92
8.2 Tratamiento agudo con los probióticos <i>L. rhamnosus</i> y <i>B. lactis</i> .....	97
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>102</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>103</b>
<b>11. REFERENCIAS .....</b>	<b>103</b>

## 1.1 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) ocupa el segundo lugar después de la enfermedad de Alzheimer entre los trastornos neurodegenerativos más comunes, se ha pronosticado que la prevalencia de la enfermedad de Parkinson será de un estimado de 267 casos por cada 100,000 personas en 2050 (Su et al., 2021). Los síntomas clínicos de la EP son el temblor en reposo, rigidez muscular e inestabilidad postural. Sin embargo, desde hace mucho tiempo se reconocen, los síntomas no motores (SNM), como el dolor, las alteraciones sensoriales (hiposmia) y la disfunción gastrointestinal (Tolosa et al., 2021), ver tabla 1. Estos síntomas, en particular, se han considerado valiosos para el diagnóstico temprano de la EP porque pueden presentar varios años antes de que se manifiesten los síntomas motores (Gazerani, 2019).

La fisiopatología de la EP esta caracterizada por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra *pars compacta* (SNpc). Donde coexisten diferentes procesos como la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la neuroinflamación (activación de la microglía) (Poewe et al., 2017).

**Disfunción mitocondrial:** La actividad del complejo mitocondrial I, un componente de la cadena de transporte de electrones, se reduce en varios tejidos aislados de regiones cerebrales en pacientes con EP. Los genes diana del coactivador 1 $\alpha$  del receptor activado por proliferadores de peroxisomas- $\gamma$  (PGC1 $\alpha$ ), un regulador transcripcional de la biogénesis mitocondrial, generalmente esta disminuido en esta enfermedad (Bose & Beal, 2016). Se ha propuesto que niveles bajos de  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -Syn) están presentes de manera normal en las mitocondrias, pero que la acumulación de esta proteína dentro de las mitocondrias conduce a déficits en el complejo I mitocondrial y a estrés oxidativo. La activación de PGC1 $\alpha$  reduce la oligomerización de  $\alpha$ -Syn y disminuye la toxicidad in vitro, mientras que la deficiencia inducida de PGC1 $\alpha$  por silenciamiento genético aumenta la vulnerabilidad a los oligómeros de  $\alpha$ -Syn (Zheng et al., 2010).

**Estrés oxidativo:** La evidencia de que el estrés oxidativo, como consecuencia de la disfunción mitocondrial, está incrementado en el tejido cerebral de pacientes con EP es

convinciente, pero sigue siendo debatible si antes o durante la muerte neuronal (Dias et al., 2013). Las mutaciones en la proteína DJ1 (codificado por el gen PARK7), causa la EP autosómica recesiva de inicio temprano y están asociadas con un aumento del estrés oxidativo celular (Di Nottia et al., 2016.). Se ha sugerido que las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales son particularmente vulnerables al estrés metabólico y oxidativo por varias razones:

- 1) Poseen axones extremadamente largos (hasta 4.5 metros), no mielinizados, con un gran número de sinapsis (estimadas en 1–2.4 millones por neurona dopaminérgica nigroestriatal), lo que requiere una enorme cantidad de energía para mantenerse (Pissadaki & Bolam, 2013).
- 2) A diferencia de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral vecina, que son relativamente resistentes en la EP, las neuronas nigroestriatales exhiben una actividad de marcapasos autónoma que implica oscilaciones de calcio citosólico y su posterior liberación al espacio extracelular, procesos que consumen mucha energía (Surmeier et al., 2011).
- 3) Los niveles elevados de dopamina (DA) citosólica y sus metabolitos pueden generar estrés oxidativo (Mosharov et al., 2009).
- 4) Por último, la disfunción mitocondrial y el aumento del estrés oxidativo pueden llevar al agotamiento de los lisosomas y al deterioro funcional del sistema autofágico lisosomal (LAS, por sus siglas en inglés), demostrando que varias vías patogénicas están íntimamente relacionadas en la EP (Dehay et al., 2010).

**Neuroinflamación:** Estudios *post mortem* y de biomarcadores en fluidos muestran que la neuroinflamación es una característica destacada de la EP (Brochard et al., 2009; Qin et al., 2007). Aunque tal vez no sea el desencadenante inicial, la neuroinflamación probablemente contribuye de manera esencial a la patogénesis (Hirsch & Hunot, 2009). Se ha reportado que las neuronas catecolaminérgicas en el tejido cerebral de pacientes con EP y las neuronas dopaminérgicas cultivadas (cuando son expuestas a microglía activada o a L-DOPA) tienden a expresar proteínas de clase I del MHC, lo que las expone a la muerte mediada por células T citotóxicas si presentan antígenos (Cebrián et al., 2014). Durante la fase prodrómica de la EP, se ha sugerido que la inflamación del tejido en el sistema olfativo o en el intestino podría desencadenar un nivel suficiente de mal plegamiento de  $\alpha$ -Syn para que algunos agregados

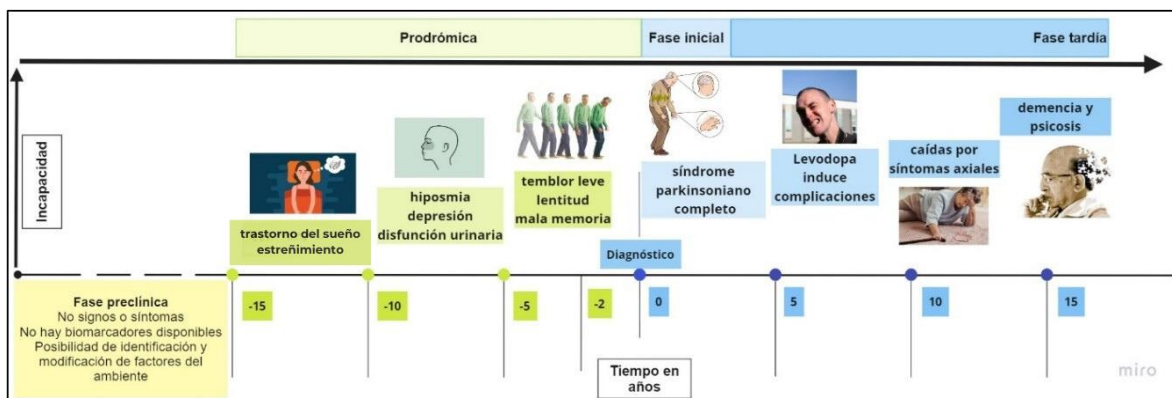
de  $\alpha$ -Syn escapen eventualmente de los mecanismos normales de degradación (Lema Tomé et al., 2013; Ouchi et al., 2009). De hecho, evidencias recientes de experimentos en ratones con sobreexpresión del gen que codifica para la  $\alpha$ -Syn sugieren un papel de la microbiota intestinal en la promoción de la activación de la microglía, la patología de ( $\alpha$ -Syn) y los déficits motores (Sampson et al., 2016).

La acumulación de  $\alpha$ -Syn mal plegada en la *SNpc*, que se encuentra en inclusiones intracitoplasmáticas llamadas cuerpos de Lewy (LBs), (Wakabayashi et al., 2013) tiende a propagarse a través de las neuronas de manera similar a los priones, y este mecanismo de transmisión probablemente subyace en la progresión de las alteraciones patológicas previamente descritas (Brundin et al., 2016). Además, algunos datos sugieren que la agregación de  $\alpha$ -Syn puede comenzar en los plexos autonómicos del intestino y propagarse en dirección craneal (Klingelhoefer & Reichmann, 2015).

En un estudio *post-mortem* se encontraron agregados de  $\alpha$ -Syn en el cerebro y tracto gastrointestinal (íleon, colon transverso y descendente) de pacientes con EP. Esta acumulación de  $\alpha$ -Syn en el sistema gastrointestinal ha generado un gran interés en la comunidad científica debido a su posible implicación en la fisiopatología de la EP (Gelpi et al., 2014). Sugiriendo, que los signos motores clásicos de la EP están relacionados con la degeneración nigral y la disminución de DA en el cuerpo estriado; mientras que los SNM probablemente estén relacionados con la neurodegeneración de otras estructuras, incluido el sistema nervioso autónomo (SNA).

## ***1.2 Fase prodrómica, síntomas motores y no motores en la EP***

El período en el que surgen los (SNM) se ha conceptualizado como la fase prodrómica de la EP, correspondiente a una etapa de la EP donde los cambios neurodegenerativos involucran sitios extranigrales (tronco encefálico, el bulbo, los tractos olfatorios y el SNA). Ver figura 1 (Gelpi et al., 2014).



**Figura 1. Etapas de la enfermedad de Parkinson.** La línea punteada indica que se desconoce la duración de la fase preclínica, a diferencia de la fase prodrómica, que puede extenderse entre 10 y 15 años. Posterior al diagnóstico representado a partir del “0” podemos ver la evolución de los síntomas. *Creado en miro app.*

**Características no motoras presentes en las primeras etapas. Es frecuente en el momento del diagnóstico.**

<b>Hiposmia</b>	La pérdida del olfato informada por hasta el 70% de los pacientes y cuando se realiza una prueba formal se presenta en casi el 90%. (Pruebas de olfato frecuentes utilizadas: UPSIT y Sniffin'sticks test)
<b>Trastornos del sueño</b>	Trastorno de conducta del sueño REM: parasomnia caracterizada clínicamente por sueños vívidos, generalmente desagradables (p. ej., ser atacado o robado) y conductas vigorosas en las que los pacientes parecen estar representando sus sueños (p. ej., golpear, gritar, reír).
<b>Características neuropsiquiátricas</b>	Apatía destacada, ansiedad: ansiedad generalizada, ataques de pánico y fobias sociales; depresión, generalmente leve, asociada a anhedonia y apatía.
<b>Disfunción autonómica</b>	Estreñimiento, retraso del vaciamiento gástrico, urgencia urinaria o incontinencia, disfunción eréctil, hipotensión ortostática, intolerancia al calor

**Características motoras que ocurren en las primeras etapas. Consideradas las características motoras “clásicas o cardinales” de la enfermedad de Parkinson**

<b>Bradicinesia</b>	Lentitud general y escasez de movimientos espontáneos; disminución del movimiento del brazo, reducción de la expresión
---------------------	--

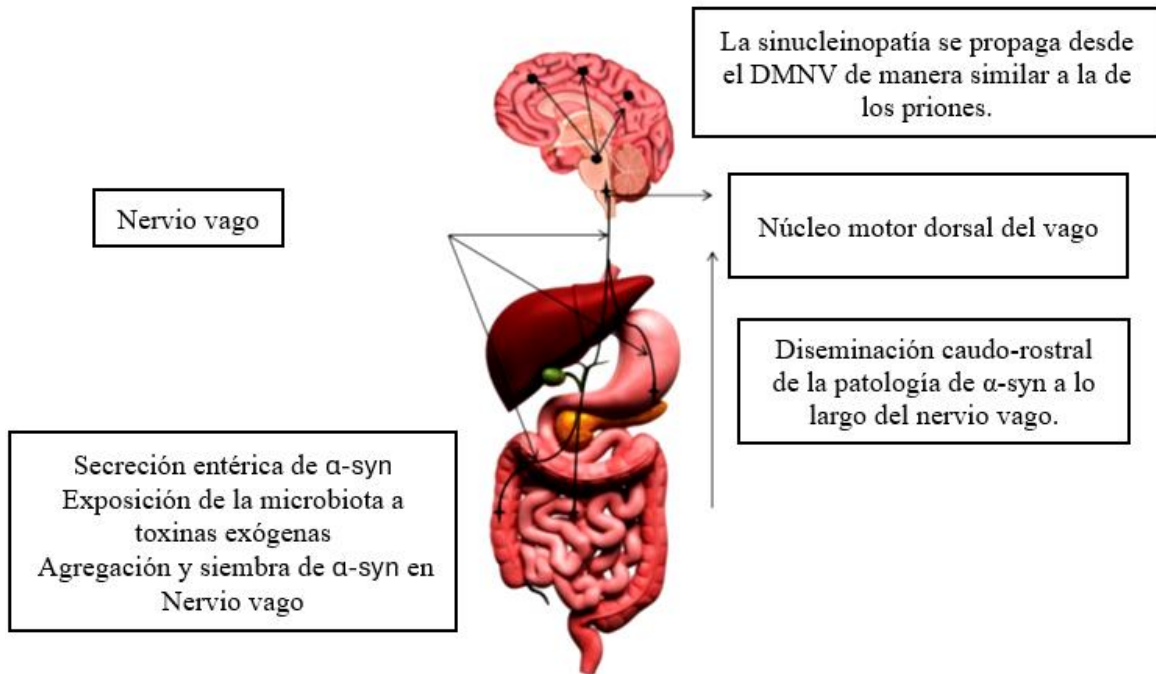
	facial, reducción de la gesticulación, micrografía, giros en la cama, hipofonía.
<b>Rigidez</b>	Aumento del tono muscular por una resistencia de movimientos pasivos de igual grado en grupos musculares opuestos (tipo “tubo de plomo”).
<b>Temblor</b>	Temblor en reposo de 4 a 6 Hz, común en las extremidades (“pastilla rodando” en las manos), labios, barbilla o mandíbula, más raro en la cabeza.
<b>Alteraciones de la marcha</b>	Disminución del balanceo del brazo; arrastrando una pierna; postura ligeramente inclinada al caminar

**Tabla 1.** Características motoras y no motoras en las primeras etapas. Tomado y modificado de (Tolosa et al., 2021)

### *1.3 Hipótesis acerca del origen de la enfermedad de Parkinson*

Las características patológicas de la EP en el tracto gastrointestinal (estreñimiento, aumento de la permeabilidad intestinal y alteraciones en la composición de la microbiota intestinal) de sujetos con EP fueron reconocidas rápidamente por tener implicaciones clínicas (Edwards et al., 1992; Oyanagi et al., 1990), pero encontraron relativamente poco eco entre la comunidad de estudiosos de los trastornos del movimiento.

Tomó 20 años y las publicaciones de Braak y sus colaboradores para que este tema cobrara importancia. En tres documentos entre 2003 y 2006 Braak sugirió que tanto la innervación extrínseca como la intrínseca del tracto gastrointestinal, el núcleo motor dorsal del nervio vago (DMNV) y el sistema nervioso entérico (SNE), respectivamente, se veían afectados tempranamente durante la progresión de la EP, incluso antes que la SNpc; ver figura 2 (Braak et al., 2003, 2006; Braak & Del Tredici, 2017).



**Figura 2. Propuesta de ruta de propagación de la patología de  $\alpha$ -syn desde el SNE hacia el cerebro.** Tomado y modificado de (Lionnet et al., 2018)

La acumulación de la  $\alpha$ -Syn en el DMNV, considerada la primera región vulnerable del sistema nervioso central (SNC) en verse afectada, podría revelar que la EP se origina en el SNE, donde las fibras vagales hacen sinapsis con neuronas ganglionares parasimpáticas. Potencialmente algún patógeno capaz de pasar a través del revestimiento mucoso del tracto gastrointestinal podría inducir el plegamiento incorrecto de  $\alpha$ -Syn en las terminales axónicas de las neuronas entéricas postganglionares, seguido de un transporte retrógrado a las neuronas preganglionares colinérgicas del DMNV, y desde allí propagarse en dirección caudo-rostral, involucrando otras estructuras cerebrales, como lo propusieron (Braak et al., 2003).

La presencia temprana de la  $\alpha$ -Syn en el SNE se ha encontrado repetidamente en varios estudios histológicos que analizan biopsias tanto en individuos afectados por la EP como en sujetos controles (Ruffmann & Parkkinen, 2016; Lebouvier et al., 2010; Pouclet et al., 2012; Visanji et al., 2014).

Se ha encontrado que el estreñimiento es uno de los SNM más recurrentes entre los pacientes con EP, precede a la aparición de síntomas motores en más de 10 años (Cersosimo et al., 2013; Travagli et al., 2020). Particularmente Abbott et al., 2001 recopiló información

sobre la frecuencia de las deposiciones entre 1971 y 1974 en 6790 hombres de 51 a 75 años sin EP en el *Honolulu Heart Program*, de los cuales 96 desarrollaron EP después de un promedio de 12 años de seguimiento y que habían reportado <1 de una evacuación/día. También el estudio de Savica et al., 2009 donde se observó que 196 sujetos que desarrollaron EP en el condado de Olmsted, Minnesota, entre 1976 y 1995 habían padecido estreñimiento por varios años.

Existe un creciente interés y evidencia que respaldan la conexión entre la alteración del microbioma intestinal y la EP (Lionnet et al., 2018). Esta asociación ha generado la hipótesis sobre la existencia de diferentes vías de propagación de la neurodegeneración en la EP, ya sea desde el SNE hacia el cerebro (caudo-rostral) o viceversa (rostral-caudal). La teoría de la progresión "caudo-rostral" sugiere que los cambios en el intestino podrían preceder a los síntomas neurológicos característicos de la EP. Por otro lado, la progresión "rostral caudal" plantea que las modificaciones en el cerebro podrían ser el punto de partida, y estas a su vez podrían influir en el microbioma intestinal. Esta dualidad de enfoques abre importantes interrogantes sobre los mecanismos subyacentes de la EP y sugiere nuevas líneas de investigación para comprender mejor su etiología (Nuzum et al., 2022).

Se ha encontrado evidencia experimental que resalta la importancia del SNE en la patogénesis de la EP. En ratones transgénicos que sobre expresan  $\alpha$ -Syn (Thy1- $\alpha$ -Syn), donde se demostró que la microbiota intestinal es crucial para el desarrollo del déficit motor y la activación de la microglía. Estos ratones fueron criados en un entorno libre de gérmenes ("*Germ free o GF*") o en un entorno libre de patógenos (*Specific pathogen free, SPF*). Los ratones con microbiota (SPF) que fueron trasplantados con microbiota de pacientes con EP, exhibieron una disminución progresiva en la función motora cuando se expusieron a la prueba de la viga y disminución en la tasa de defecación, mientras que este efecto se retrasó en los ratones GF. La observación de que las bacterias intestinales de pacientes con EP, en comparación con controles sanos, aumentan los déficits motores en un modelo de ratón proporciona evidencia de una contribución funcional de la microbiota a las sinucleinopatías; sin embargo, los mecanismos por los cuales las bacterias intestinales promueven la fisiopatología mediada por  $\alpha$ -Syn no se han esclarecido aún (Sampson et al., 2016).

## 1.4 Microbiota intestinal

Los avances del Proyecto del Microbioma Humano (HMP) y el Metagenoma del Tracto Intestinal Humano (MetaHIT) abrieron nuevos horizontes en la investigación del microbioma para una mejor comprensión de las interacciones huésped-microorganismo en cuatro sitios principales de colonización del cuerpo humano: oral, intestino, vagina y piel. De estos cuatro sitios, la microbiota intestinal humana ha llamado la atención de los microbiólogos por su importancia clínica (Qin et al., 2010).

El mantenimiento de una microbiota saludable es importante para la integridad de la barrera intestinal, la inmunidad, el metabolismo y la relación funcional entre el intestino y el cerebro, que se ha denominado eje microbiota-intestino-cerebro. Se ha destacado un papel potencial de este eje en varios trastornos asociados al SNC, incluida la esclerosis múltiple y la EP. Las alteraciones encontradas en la microbiota intestinal, incluido el número, la composición de la microbiota intestinal y los metabolitos microbianos, se han considerado parámetros valiosos para el diagnóstico temprano de varios trastornos neurodegenerativos incluida la EP (Spielman et al., 2018).

La microbiota intestinal humana se compone de varios tipos de microorganismos, incluidas bacterias, arqueas, eukarya, virus y parásitos. El microambiente intestinal favorece principalmente el crecimiento de bacterias, agrupadas en siete divisiones predominantes o filos (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Cyanobacteria*). Entre estos siete filos, los *Bacteroidetes* y *Firmicutes* constituyen más del 90% de la población total (Backhed et al., 2005). En la tabla 2 se muestra la cantidad de bacterias presentes en el intestino humano:

**Bacterias presentes en el intestino humano**

Ubicación	Concentración típica de bacterias (número/mL de contenido)	Volumen (mL)	Orden de magnitud ligado al número de bacterias.
Colon (intestino grueso)	$10^{11}$	400	$10^{14}$
Íleon	$10^8$	400	$10^{11}$
Duodeno y yeyuno	$10^3 - 10^4$	400	$10^7$

Tabla 2. Bacterias presentes en el intestino humano. Tomado y modificado de (Sender et al., 2016)

Además de la diferencia en la concentración de bacterias, podemos encontrar diferentes géneros bacterianos y sus respectivas especies dependiendo de la porción intestinal, como se muestra en la tabla 3:

**Géneros bacterianos descritos en las regiones luminal y mucosa del intestino delgado humano**

Filo	Firmicutes Bacillota	Pseudomonadota	Bacteroidota	Actinomicetota	Fusobacteriota
<b>Duodeno</b>					
<b>Lumen</b>	<i>Carnobacteriaceae</i> <sup>3b</sup> , <i>Gemella</i> <sup>2</sup> , <i>Gemellaceae</i> <sup>3b</sup> , <i>Lactobacillaceae</i> <sup>3b</sup> , <i>Streptococcaceae</i> <sup>3b</sup> , <i>Streptococcus</i> <sup>1,2,3a</sup> , <i>Veillonellaceae</i> <sup>3b</sup> , <i>Veillonella</i> <sup>2,3a</sup>	<i>Enterobacteriaceae</i> <sup>1,3a</sup> , <i>Escherichia-Shigella</i> <sup>1</sup> , <i>Haemophilus</i> <sup>1</sup> , <i>Pasteurellaceae</i> <sup>2</sup>	<i>Prevotella</i> <sup>2</sup>	<i>Rothia</i> <sup>3a</sup>	<i>Fusobacter</i> <sup>1,3a</sup>
<b>Mucosa</b>	<i>Faecalibacterium</i> <sup>6</sup> , <i>Lactobacillus</i> <sup>6b</sup> , <i>Streptococcaceae</i> <sup>4</sup> , <i>Streptococcus</i> <sup>5,6a</sup> , <i>Veillonellaceae</i> <sup>4</sup> , <i>Veillonella</i> <sup>5</sup>	<i>Acinetobacter</i> <sup>6b</sup> , <i>Bradyrhizobiaceae</i> <sup>4</sup> , <i>Escherichia</i> <sup>5</sup> , <i>Haemophilus</i> <sup>5</sup> , <i>Pseudomonadaceae</i> <sup>4</sup> , <i>Stenotrophomonas</i> <sup>6a</sup>	<i>Bacteroides</i> <sup>6</sup> , <i>Prevotellaceae</i> <sup>4</sup> , <i>Prevotella</i> <sup>5,6</sup>		
<b>Yeyuno</b>					
<b>Lumen</b>	<i>Carnobacteriaceae</i> <sup>3b</sup> , <i>Clostridiaceae</i> <sup>3b</sup> , <i>Gemella</i> <sup>2a,2c</sup> , <i>Lacto-</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> <sup>2b,2c,3a</sup> , <i>Escherichia</i> <sup>7</sup> , <i>Pasteurellaceae</i> <sup>2a,2b</sup> , <i>Pseudomonas</i> <sup>3a</sup>	<i>Prevotella</i> <sup>7</sup>	<i>Rothia</i> <sup>3a</sup>	<i>Fusobacter</i> <sup>7</sup>

	<i>bacillaceae</i> <sup>2,3b</sup> , <i>Streptococcaceae</i> <sup>3b</sup> , <i>Streptococcus</i> <sup>2, 7, 3a</sup> , <i>Veillonellaceae</i> <sup>3</sup> <sup>b</sup> , <i>Veillonella</i> <sup>a2, 7, 3a</sup>				
<b>Mucosa</b>	<i>Clostridium XIV</i> <sup>9</sup> , <i>Lactobacillus</i> <sup>10</sup> , <i>Streptococcaceae</i> <sup>4</sup> , <i>Streptococci</i> <sup>10</sup> , <i>Streptococcus</i> <sup>5,8,9</sup> , <i>Veillonellaceae</i> <sup>4</sup> , <i>Veillonella</i> <sup>5,8</sup>	<i>Actinobacillus</i> <sup>10</sup> , <i>Bradyrhizobiaceae</i> <sup>4</sup> , <i>Enterococcus</i> <sup>10</sup> , <i>Escherichia</i> <sup>5</sup> , <i>Haemophilus</i> <sup>5,8</sup> , <i>Klebsiella</i> <sup>10</sup> , <i>Pseudomonadaceae</i> <sup>4</sup> , <i>Proteobacteria</i> <sup>9</sup>	<i>Bacteroidetes</i> <sup>9</sup> , <i>Prevotellaceae</i> <sup>4</sup> , <i>Prevotella</i> <sup>8</sup>	<i>Actinomices</i> <sup>5</sup> , <i>Rothia</i> <sup>8</sup>	<i>Fusobacteri</i> <sup>9</sup>
<b>Íleon proximal</b>					
<b>Lumen y Mucosa</b>	<i>Clostridium IX</i> <sup>11</sup> , <i>Estreptococo</i> <sup>11</sup> , <i>Veillonella</i> <sup>1</sup>	<i>Enterococo</i> <sup>11</sup> , <i>Oxalobacter</i> <sup>11</sup>			
	<i>Streptococcaceae</i> <sup>4</sup> , <i>Streptococcus</i> <sup>5</sup> , <i>Veillonellaceae</i> <sup>4</sup> , <i>Veillonella</i> <sup>5</sup>	<i>Comamonadaceae</i> <sup>4</sup> , <i>Escherichia</i> <sup>5</sup> , <i>Haemophilus</i> , <i>Pseudomonadaceae</i> <sup>4</sup>	<i>Bacteroides</i> <sup>5</sup>	<i>Micrococcáceas</i> <sup>4</sup>	
<b>Colon (intestino grueso)</b>					
<b>Lumen y Mucosa</b>	<i>Clostridium</i> <sup>13</sup> , <i>Eubacteria</i> <sup>13</sup>				<i>Fusobacteria</i> <sup>13</sup>

**Tabla 3. Géneros bacterianos descritos en las regiones luminal y mucosa del intestino delgado humano.** La tabla incluye los cinco géneros principales (o un nivel superior si no se describe hasta el nivel de género) detectados en cada estudio. 1(Barlow et al., 2021), 2a (Seekatz et al., 2019) (yeyuno proximal), 2b (Seekatz et al., 2019) (yeyuno medio), 2c (Seekatz et al., 2019) (yeyuno distal), 3a (Leite et al., 2020) (grupo 2), 3b (Leite

et al., 2020) (grupo 3), 4 (Vuik et al., 2019), 5 (Nagasue et al., 2022), 6a (Li et al., 2015) (Mucus – líquido luminal), 6b (Li et al., 2015) (Biopsias de mucosas), 7 (Sundin et al., 2017), 8 (Dlugosz et al., 2014), 9 (Wang et al., 2005), 10 (Hayashi et al., 2005), 11 (Booiijink et al., 2010), 12 (Fan et al., 2020), y 13 (Pryde et al., 2002.)

La determinación de la población bacteriana en cada porción del intestino delgado y grueso se realizó mediante el análisis de diversas muestras como se muestra en la tabla 4:

#### **Determinación de población bacteriana en intestino delgado**

<b>Tipo de muestra</b>	<b>Método de determinación bacteriana</b>	<b>Referencia</b>
250 muestras de aspirado duodenal y 21 muestras pareadas de duodeno-saliva obtenidas mediante esofagogastroduodenoscopia (EGD)	Estudio REIMAGINE que consiste en el análisis del gen 16S rRNA <sup>1</sup>	<sup>1</sup> (Barlow et al., 2021)
Se utilizó un catéter multicanal con múltiples puntos de aspiración, se procesaron muestras recolectadas del tracto gastrointestinal superior de 8 sujetos sanos durante 10 visitas de estudio diferentes	Análisis de la comunidad microbiana 16S rRNA	<sup>2a</sup> (Seekatz et al., 2019) (yeyuno proximal), <sup>2b</sup> (Seekatz et al., 2019) (yeyuno medio), <sup>2c</sup> (Seekatz et al., 2019) (yeyuno distal)
Aspirados lumbales se obtuvieron del duodeno y yeyuno de sujetos sometidos a EGD. Muestras de heces.	Secuenciación del gen 16S rRNA	<sup>3a</sup> (Leite et al., 2020) (grupo 2), <sup>3b</sup> (Leite et al., 2020) (grupo 3)
Biopsias de mucosa de nueve sitios diferentes en 14 individuos sometidos a enteroscopia de doble balón anterógrada y posterior retrógrada	La composición bacteriana se caracterizó mediante secuenciación del gen 16S rRNA	<sup>4</sup> (Vuik et al., 2019)
Muestras de mucosa de los seis sitios gastrointestinales (estómago, duodeno, yeyuno distal, íleon proximal, íleon terminal y recto) mediante enteroscopia asistida por balón. Se recogieron muestras fecales de todos los participantes.	Las estructuras microbianas de la microbiota de la mucosa del intestino delgado se compararon con las de las heces y otros sitios gastrointestinales mediante la secuenciación del gen 16S rRNA	<sup>5</sup> (Nagasue et al., 2022)

Nueve voluntarios sanos donaron biopsias y contenidos luminales del duodeno y el recto.	Secuenciación del gen 16S rRNA bacteriano	<sup>6a</sup> (G. Li et al., 2015) (Mucus – líquido luminal), <sup>6b</sup> (Li et al., 2015) (Biopsias de mucosas)
Muestras de la luz del yeyuno superior durante la enteroscopia de 20 sujetos de investigación.	El ADN de las mismas muestras se analizó mediante PCR cuantitativa específica del gen 16S rRNA	<sup>7</sup> (Sundin et al., 2017)
Biopsias del yeyuno de 35 pacientes (26 mujeres) con SII de entre 18, 36 años y 57 años, 16 voluntarios sanos (11 mujeres) de entre 20, 32 años y 48 años	Secuenciación paralela masiva del gen 16S Rrna.	<sup>8</sup> (Dlugosz et al., 2014)
Biopsias de mucosa del yeyuno humano, el íleon distal, el colon ascendente y el recto	Análisis del gen 16S rRNA	<sup>9</sup> (Wang et al., 2005)
Contenido intestinal del yeyuno, el íleon, el ciego y el colon sigmoide obtenido de tres individuos ancianos en la autopsia	Se comparó utilizando bibliotecas de genes de ARNr 16S y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP)	<sup>10</sup> (Hayashi et al., 2005)
Muestras de efluente ileal de siete individuos con ileostomías de Brooke y se compararon con muestras fecales de adultos sanos	Secuenciación de 16S rRNA	<sup>11</sup> (Booijink et al., 2010)
Treinta pacientes (15 con inflamación del íleon terminal y 15 controles) se sometieron a una colonoscopia y se tomaron biopsias del íleon terminal	Secuenciación de 16S rRNA	<sup>12</sup> (Fan et al., 2020)
Estudios in vitro con bacterias fecales humanas mixtas	Secuenciación de 16S rRNA	<sup>13</sup> (Pryde et al., 2002.)

**Tabla 4. Determinación de población bacteriana en intestino delgado.**

La microbiota del intestino delgado produce la hidrólisis de carbohidratos no digeribles, resistentes a las enzimas digestivas del huésped, a través de enzimas activas en carbohidratos (CAZymes), generando ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como

productos finales. Hasta la fecha, en el microbioma intestinal humano se han identificado 15,882 genes de CAZyme diferentes (Kaoutari et al., 2013), clasificados según similitudes en la secuencia de aminoácidos, en cinco familias:

1. Glucósidos hidrolasas (GH), las más prevalentes entre las bacterias intestinales, responsables de la hidrólisis y/o transglicosilación de los enlaces glicosídicos.
2. Glicotransferasas (GT), que catalizan la formación de enlaces glicosídicos transfiriendo un resto de una molécula donadora activada a moléculas donadoras específicas.
3. Polisacáridos liasas (PL), un grupo de 31 enzimas que escinden cadenas de polisacáridos que contienen ácido urónico.
4. Esterasas de carbohidratos (CE), que eliminan la modificación basada en ésteres en mono, oligo y polisacáridos, facilitando así la acción de las GH sobre polisacáridos complejos.
5. Los módulos de unión a carbohidratos (CBM), a menudo asociados a otras CAZyme y sin actividad enzimática *per se*, están dedicados a facilitar la interacción enzima-sustrato y potenciar la actividad enzimática (Wardman et al., 2022)

La utilización microbiana de los aminoácidos comienza en el intestino delgado y se ha descrito la composición bacteriana asociada al metabolismo de las proteínas. De hecho, en modelos animales se ha reportado un cambio en la composición de la microbiota ileal en respuesta al porcentaje de ingesta y las fuentes de proteínas dietéticas (Kar et al., 2017; Qiu et al., 2018). En particular, la riqueza bacteriana y la concentración de AGCC en el íleon disminuyen con la reducción de la ingesta de proteínas (Qiu et al., 2018).

El metabolismo de los lípidos en el intestino humano está indirectamente relacionado con la actividad de la microbiota del intestino delgado, que convierte los ácidos biliares primarios conjugados del huésped en análogos desconjugados y posteriormente convierte los ácidos biliares primarios en secundarios. La desconjugación de la reacción primaria de ácidos biliares está catalizada por la actividad de las hidrolasas de sales biliares microbianas (HSBM). A partir de un conjunto de datos metagenómicos constructivos de secuencias de diferentes cohortes en todo el mundo, Song y sus colegas informaron que las secuencias de HSBM, se distribuyen en 591 cepas bacterianas intestinales (Song et al., 2019). De hecho, la actividad de las HSBM proporciona una ventaja ecológica al mejorar la resistencia de las

bacterias a los ácidos biliares conjugados y promueve su supervivencia y colonización en el intestino (Jones et al., 2008) esto por parte de *Bacteroides*, *Eubacterium*, y géneros *Clostridium*. Tras la digestión de los lípidos, los enterocitos absorben los ácidos grasos mediante transportadores de membranas e independiente de proteínas.

Además, se han detectado concentraciones elevadas de lactato y butirato en el intestino delgado, lo que coincide con la presencia de *Streptococcus sp.* y *Clostridium cluster XIV sp.* Los genes asociados a la vía de fermentación del butirato se encuentran frecuentemente en el metagenoma del intestino delgado, pero no muestran un enriquecimiento significativo en comparación con los metagenomas del colon. Este hallazgo respalda la idea del predominio de los productores de butirato en el colon en lugar del intestino delgado (Pryde et al., 2002).

El butirato es utilizado principalmente por las células epiteliales del colon como fuente de energía, mientras que el propionato y el acetato se transportan principalmente al hígado a través de la vena porta (Pomare et al., 1985)

Aproximadamente el 95% del butirato producido por las bacterias del colon se transporta a través del epitelio a través de vesículas de membrana luminal, pero las concentraciones en la sangre portal suelen ser indetectables como resultado de su rápida utilización (Ritzhaupt, 1998).

El butirato induce los niveles de proteína p21, la cual detiene el ciclo celular en G1, lo que resulta en la inhibición de la proliferación celular. Esta interrupción del ciclo celular en G1 podría permitir la reparación del ADN y disminuir la tasa de mutaciones (Archer et al., 1998) (Zeng et al., 2020), Además, el butirato tiene efectos antiinflamatorios al inhibir la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y la consiguiente reducción de la síntesis de citoquinas proinflamatorias en cultivos de muestras de biopsia intestinal, células aisladas de la lámina propia y células mononucleares de sangre periférica (Segain, 2000).

### ***1.5 Microbiota y tracto gastrointestinal en su papel inmunitario***

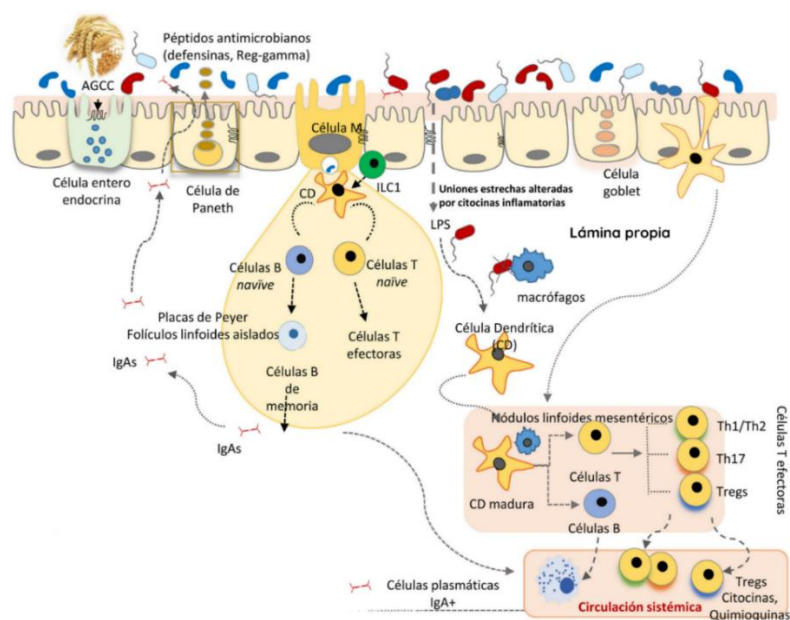
El tracto gastrointestinal (TGI) es una barrera selectiva constituida por células epiteliales, que limitan el contacto directo de microorganismos con las células inmunes especializadas de la lámina propia de la mucosa intestinal, y su propagación sistémica, contribuyendo a la homeostasis inmunológica. Esta barrera incluye enterocitos (90-95%),

células enteroendocrinas, células caliciformes (*goblet*), células M que participan en la captura de antígenos y células Paneth (Álvarez et al., 2021); ver figura 3. En el intestino delgado se encuentran las células de Paneth responsables de la secreción de péptidos antimicrobianos como las defensinas, que inhiben el crecimiento de determinadas bacterias e impiden su contacto directo con el epitelio. En la lámina propia los macrófagos fagocitan y eliminan los microorganismos que hubieran penetrado a través del epitelio intestinal. La homeostasis intestinal se mantiene mediante un sistema de controles y equilibrios entre las células T efectoras inflamatorias, que incluyen las células Th1 (CD4+ y CD8+ que migran al epitelio convirtiéndose en linfocitos intraepiteliales), las células Th17 y las células T reguladoras Foxp3+ antiinflamatorias (Tregs) (Sanz & De Palma, 2009).

**Mucina 2 (MUC2).** Las células caliciformes secretan mucina hacia el lumen; MUC2 es una glicoproteína de 520 kDa que se encuentra en el intestino delgado y grueso. Esta proteína contiene dos regiones repetitivas centrales ricas en posibles sitios de O-glicosilación (Thr o Ser) y Pro; parece que estos dominios son principalmente responsables de la naturaleza hidrofílica de la mucina intestinal (Gum et al., 1994). Al secretarse, la mucina forma trímeros con enlaces disulfuro N-terminales que generan polímeros apilados en forma de red, ideales para la generación de “filtros protectores”, es decir redes de mucina capaces de permitir el paso selectivo de bacterias (Ambort et al., 2012).

La MUC2 forma el esqueleto del sistema mucoso del colon con dos capas mucosas principales; una capa mucosa externa menos densa no adherida y una interna densa adherida. Las células caliciformes ensamblan mucina en polímeros grandes que, tras la secreción, generan grandes estructuras en forma de red que se escalonan una debajo de la otra para formar la capa mucosa interna adjunta. El tamaño de los poros de esta capa interna es pequeño y, en consecuencia, mantiene a las bacterias alejadas de las células epiteliales. En la interfase con la capa mucosa externa, el tamaño de los poros aumenta, lo que permite que las bacterias entren y degraden la mucina para generar AGCC, dentro de los cuales el ácido butírico sirve como sustrato energético para los colonocitos (Johansson et al., 2008a). La baja expresión de MUC2 da como resultado ausencia de moco y un aumento tanto de la adhesión bacteriana a las células epiteliales intestinales como de la permeabilidad intestinal (Grondin et al., 2020).

**Interacciones de la mucosa con microorganismos.** Las poblaciones microbianas están organizadas espacialmente a lo largo del intestino, así como desde el eje luminal al mucoso (Palestrant et al., 2004). La viscosidad del moco aumenta hacia la región distal del TGI. Este gradiente de viscosidad a lo largo del TGI determina la distribución espacial de la microbiota intestinal, de tal forma que la composición de las bacterias adyacentes a la mucosa es diferente a las poblaciones bacterianas que residen dentro del contenido luminal (Swidsinski et al., 2007). La capa mucosa sirve como fuente de carbono y energía, predominantemente en forma de glucanos, para las bacterias que residen en la mucosa. Como adaptación a residir en un ambiente rico en glucanos, estas bacterias producen enzimas que degradan el moco, como la glicosidasa, la sulfatasa y las sialidasas, que escinden la red de moco para mejorar la utilización del moco como fuente de energía. Una de las principales bacterias degradantes del moco es *Akkermansia muciniphila* (Derrien et al., 2004). En un modelo de disbiosis intestinal y colitis se observó una disminución en la expresión de MUC2 y de *Akkermansia muciniphila*, tanto en heces como en la mucosa del colon (López-Cauce et al., 2023). A su vez, las bacterias comensales regulan la expresión de los genes que codifican para MUC2 y MUC3 que modifican su patrón de glicosilación, así como la producción de péptidos antimicrobianos, contribuyendo a regular la adhesión, colonización e invasión microbiana.

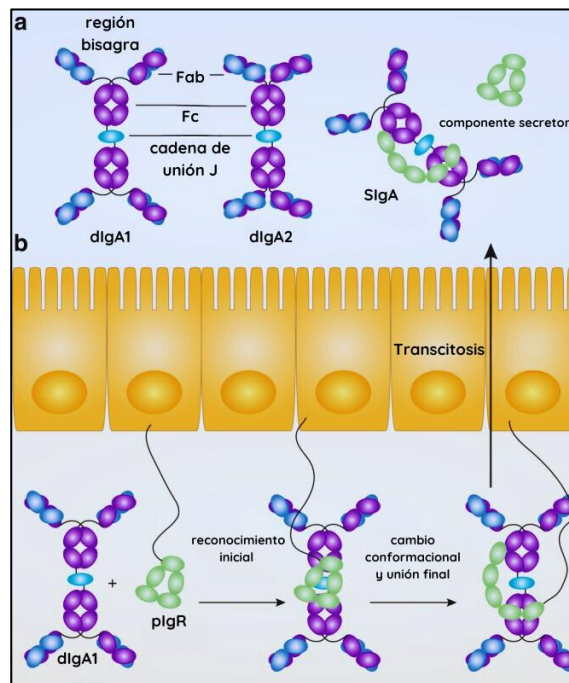


**Figura 3. Representación esquemática de la influencia de la microbiota y sus metabolitos sobre la función de la barrera intestinal en el sistema inmunitario.** Abreviaturas: LPS: lipopolisacárido, AGCC: ácidos grasos

de cadena corta, IgA: Inmunoglobulina A, ILC1: Células linfoides innatas tipo 1, Th1, Th2, Th2: linfocitos T helper 1, 2 y 17. Tregs: células T reguladoras. Tomado y modificado de (Álvarez et al., 2021).

Otro mecanismo defensivo es la producción de inmunoglobulina A secretora (IgAs) que limita el acceso de bacterias a la mucosa. Las células dendríticas reconocen y capturan pequeñas cantidades de bacterias e interactúan con las células B y T de las placas de Peyer, activando la producción de IgA específicas. Estas IgAs son transportadas a través del epitelio y, una vez en la luz, se une a bacterias intestinales contribuyendo al control de patógenos, neutralizando toxinas y favoreciendo su eliminación (Pabst & Slack, 2020).

La IgA está compuesta por fragmentos Fab y una región Fc, cada uno de los cuales consta de varios dominios de Ig (Ver figura 4). Sin embargo, a diferencia de la IgG y la IgA en el suero, en el intestino humano y murino, la IgA se produce como IgA polimérica (pIgA), principalmente como IgA dimérica. La expresión de IgA polimérica unida por una cadena J es una característica distintiva de las células plasmáticas de la mucosa y las distingue de las células plasmáticas de muchos otros compartimentos, como el bazo y la médula ósea (Hamburger et al., 2006).



**Figura 4. Formación de IgA** a) Diagramas esquemáticos que ilustran la estructura de la IgA1 dimérica humana, la IgA2 dimérica humana, la IgA1 secretora humana y el componente secretor libre (SC, que es una escisión) producto de pIgR b) La transcitosis de los complejos pIgR/dIgA resulta de la unión de reconocimiento inicial, cambios conformacionales y la unión final antes de que el complejo se transcite. Después de la transcitosis, las SC libres y la SIgA se liberan en la luz intestinal. Abreviaturas: Fab: sitio de unión a antígeno, Fc: porción que no se une al antígeno, pero determina función efectora, dIgA1: dimérica humana con región bisagra, dIgA2:

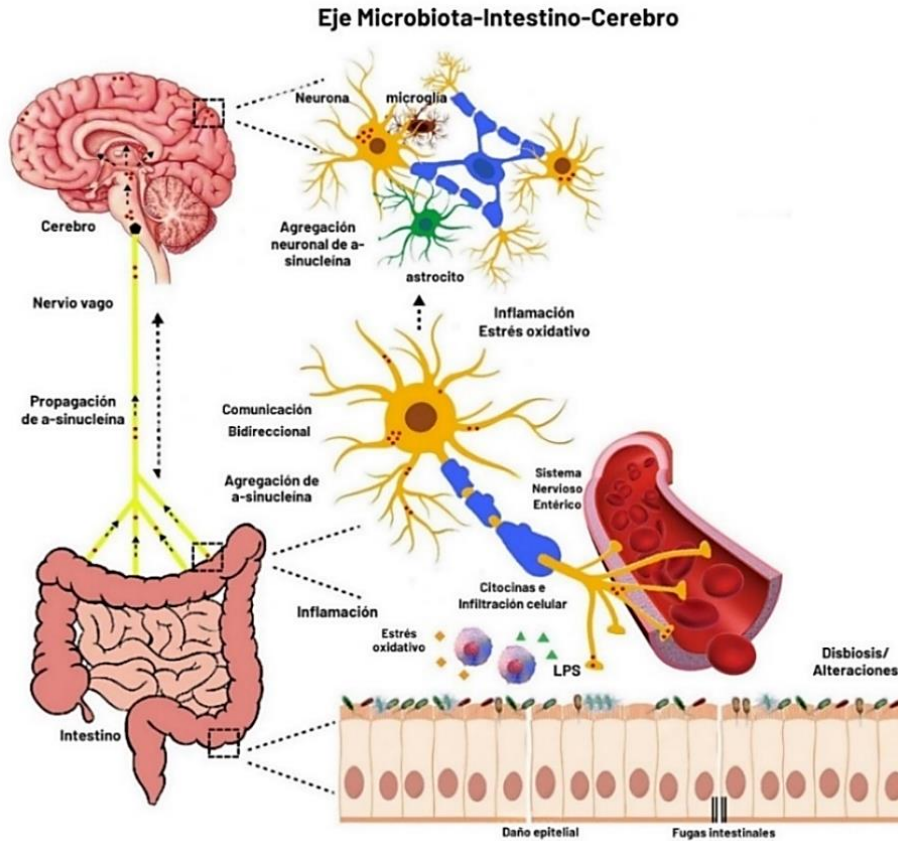
dimérica humana, (SIgA): IgA secretora intestinal, SC: componente secretor, pIgR: receptor polimérico de Ig. Tomado y modificado de (Pabst & Slack, 2020).

## ***1.6 Disbiosis intestinal***

La disbiosis intestinal es generada por el desequilibrio en la composición de la microbiota intestinal, que puede llevar a cambios en la función y estructura del intestino. Este desequilibrio puede desencadenar una serie de respuestas inflamatorias en el cuerpo, ya que el microbioma intestinal tiene un papel fundamental en la regulación del sistema inmunológico y en la homeostasis del organismo. Genera la pérdida de la integridad intestinal al promover la disminución de mucina y la fuga de componentes proinflamatorios desde el intestino hacia otros tejidos (Lubomski et al., 2020), ver figura 5.

Los principales factores que influyen en la composición de la microbiota intestinal son la dieta, fármacos, mucosa intestinal, sistema inmunológico y la propia microbiota. Los cambios moderados en la composición microbiana pueden brindar una ventana de oportunidad para que otros factores agravantes amplifiquen los cambios en grupos bacterianos específicos hasta el punto de desequilibrio. El estrés oxidativo, los bacteriófagos y las bacteriocinas son factores típicos que exacerban los cambios de la microbiota hasta el punto de la disbiosis (Weiss & Henet, 2017).

Específicamente, se ha visto una disminución de bacterias con capacidad antiinflamatoria y aumento de aquellas proinflamatorias, cuando se compara con individuos sanos; además el consumo a corto plazo de dietas compuestas solo de productos animales o vegetales altera la estructura de la comunidad microbiana, especialmente una dieta alta en alimentos de origen animal altera y disminuye la producción AGCC (David et al., 2014).



**Figura 5. Papel de la disbiosis intestinal en el eje microbiota-intestino-cerebro.** Se propone que los procesos inflamatorios en el intestino como consecuencia de la disbiosis generan la formación de agregados de  $\alpha$ -syn los cuales son capaces de migrar a través del nervio vago hacia el cerebro. Tomado y modificado de (Lubomski et al., 2020)

**Proteína C reactiva (PCR).** Al respecto, la disbiosis se ha asociado a niveles mayores de PCR, un marcador de inflamación. La PCR es una proteína de fase aguda de la familia de las pentraxinas producida principalmente en el hígado en respuesta a citocinas proinflamatorias como la interleucina-6 (IL-6) y la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Takahashi et al., 2016).

El papel de la PCR se extiende mucho más allá de su uso históricamente definido como un marcador no específico de inflamación. La PCR desempeña papeles clave en la activación de la vía clásica del complemento, induciendo la producción de óxido nítrico, mediando la fagocitosis y confiriendo protección contra patógenos (Sproston & Ashworth, 2018).

El papel principal de la PCR en la inflamación tiende a centrarse en la activación de la molécula C1q en la vía del complemento que conduce a la opsonización de patógenos.

Aunque la PCR puede iniciar las vías de fase humoral de la defensa del huésped activando la vía del complemento, también puede iniciar vías mediadas por células activando el complemento, así como uniéndose a los receptores Fc de IgG (Du Clos, 2003).

El microbioma intestinal afecta el estado de inflamación sistémico. Ciertas especies del microbioma intestinal podrían producir enzimas específicas que permiten la fermentación de nutrientes en formas absorbibles, incluida la de carbohidratos no digeribles en AGCC que pueden tener propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras (Bander et al., 2020). Además de las enzimas específicas producidas, algunos componentes de las bacterias, como el lipopolisacárido (LPS), los carbohidratos de la cápsula celular y otras endotoxinas pueden liberarse y activar una respuesta inflamatoria en el huésped (Bander et al., 2020).

La activación de la respuesta inmunitaria innata conduce a niveles crónicamente altos de mediadores de la inflamación que se sabe que causan enfermedades, incluido un amplio espectro de enfermedades neurológicas y psiquiátricas (Generoso et al., 2021). Estos mediadores de la inflamación, a su vez, atacan a las bacterias, causando disbiosis intestinal. Por lo tanto, la relación entre el microbioma intestinal y la inflamación es muy compleja. Un estudio detallado encontró que la proporción de *Akkermansia muciniphila* disminuyó en ratones obesos con niveles plasmáticos elevados de PCR. La abundancia de *Faecalibacterium* se correlacionó inversamente con los niveles de PCR (Citronberg et al., 2018). Sin embargo, aún no está claro si la PCR modula el microbioma intestinal o si el microbioma intestinal contribuye a la elevación de la PCR y su mecanismo exacto.

### ***1.7 Disbiosis intestinal en la EP***

Una característica fisiopatológica de la EP es la acumulación de agregados de la proteína  $\alpha$ -syn en todo el cerebro; sin embargo, la  $\alpha$ -syn también se expresa en neuronas entéricas. Los síntomas GI se informan con frecuencia en la EP, incluyendo estreñimiento, aumento de la permeabilidad intestinal y alteraciones en la composición de la microbiota intestinal; ver tabla 4 (Hill-Burns et al., 2017). En un modelo de EP en ratas, se empleó un virus adenoasociado (AAV) como vector de ARNm de  $\alpha$ -syn el cual fue inyectado en la SNpc para inducir su sobre expresión en las neuronas dopaminérgicas; dentro de los efectos observados se encontró una disminución en el número de neuronas entéricas y cambios en las poblaciones microbianas del intestino; se reportó una disminución de *Lachnospiraceae* y

*Faecalibacterium*, así como un aumento de *Coprococcus*, datos que son consistentes con lo observado en muestras fecales de pacientes con EP (O'Donovan et al., 2020). Estos datos sugieren que la disbiosis intestinal es un efecto consecuente en un proceso de neurodegeneración. En contraste, en un modelo transgénico con sobreexpresión de  $\alpha$ -syn (ratones SNCA p.A53T) se detectaron cambios en la microbiota intestinal desde los 2 meses de edad, sin embargo, los cambios neuropatológicos y déficits motores se presentaron a partir de los 6 meses de edad (Liang et al., 2022).

En la Tabla 4 se muestra el cambio en los filos bacterianos en muestras de pacientes con EP:

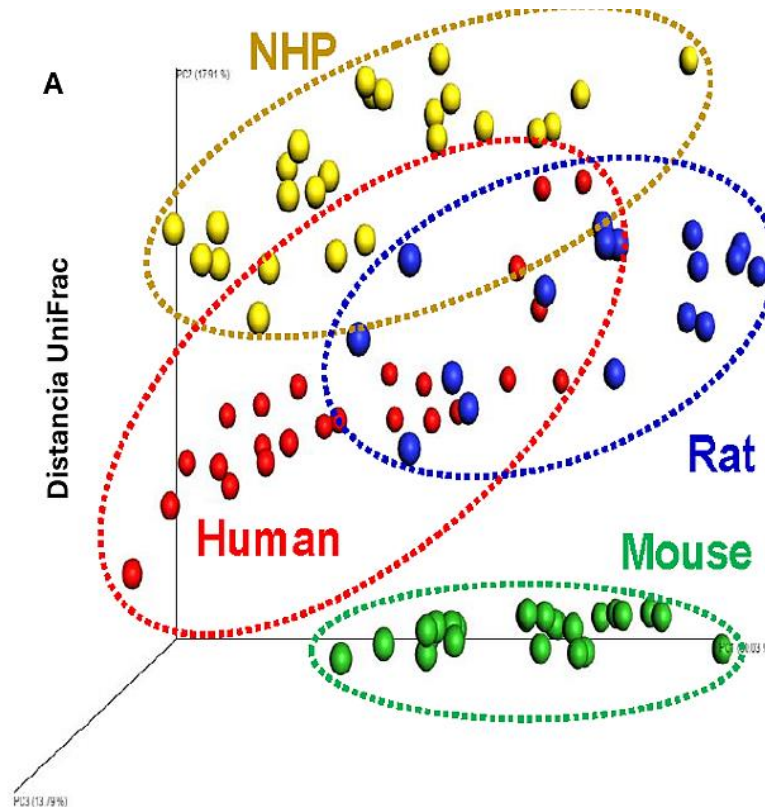
<b>Diferencias entre la microbiota intestinal de sujetos sanos y pacientes con Parkinson</b>	
<b>Sujetos sanos</b>	<b>Pacientes con Parkinson</b>
<p>Aumento de <i>Firmicutes</i> (filo): <i>Lactobacillaceae</i> (familia), <i>Lactobacillus</i> (género).</p> <p>Aumento de <i>Lachnospiraceae</i> (familia), <i>Blautia</i>, <i>Roseburia</i>, <i>Dorea</i> (géneros), <i>Faecalibacterium</i> (género)</p>	<p>Disminución de <i>Firmicutes</i> (filo): <i>Lactobacillaceae</i> (familia), <i>Lactobacillus</i> (género).</p> <p>Disminución de <i>Lachnospiraceae</i> (familia), <i>Blautia</i>, <i>Roseburia</i>, <i>Dorea</i> (géneros), <i>Faecalibacterium</i> (género)</p>
<p>Aumento de <i>Verrucomicrobia</i> (filo): <i>Verrucomicrobiaceae</i> (familia), <i>Akkermansia</i> (género), <i>Akkermansia municipihila</i> (especies)</p>	<p>Disminución de <i>Verrucomicrobia</i> (filo): <i>Verrucomicrobiaceae</i> (familia), <i>Akkermansia</i> (género), <i>Akkermansia municipihila</i> (especies)</p>
<p>Disminución de <i>Bacteroidetes</i> (filo): <i>Prevotellaceae</i> (familia), <i>Prevotella</i> (género), <i>Prevotella copri</i> (especies)</p>	<p>Aumento de <i>Bacteroidetes</i> (filo): <i>Prevotellaceae</i> (familia), <i>Prevotella</i> (género), <i>Prevotella copri</i> (especies)</p>

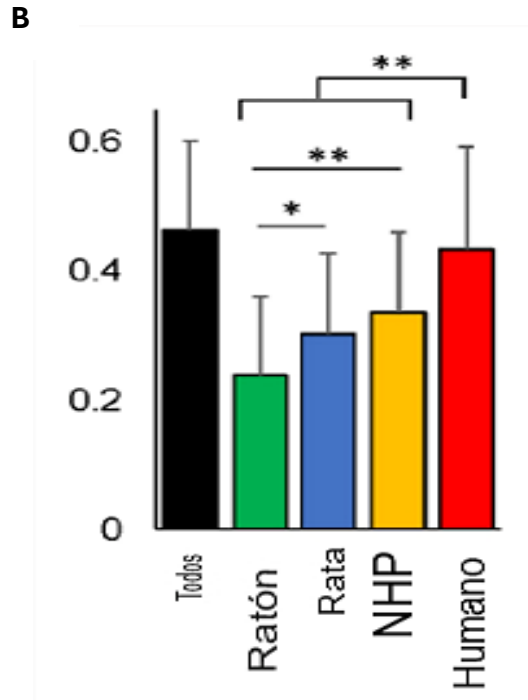
**Tabla 5. Microbiota intestinal en sujetos sanos vs Microbiota intestinal en EP.** Los datos mostrados corresponden a diversos estudios en heces humanas donde se analizó el gen 16S rRNA bacteriano. Datos obtenidos de estudios transversales realizados por (Barichella et al., 2019); (Qian et al., 2018); (Heintz-Buschart et al., 2018); (Hill-Burns et al., 2017); (Bedarf et al., 2017); (Scheperjans et al., 2015) y (O'Donovan et al., 2020).

## 1.8 Microbiota en modelos animales para el estudio de la EP

Dada la complejidad práctica y ética para realizar estudios en humanos acerca de la microbiota intestinal, se han desarrollado diferentes tipos de modelos animales, incluidos roedores (ratones, ratas, cobayas y hámsteres), que se utilizan con frecuencia para investigar las interacciones huésped-microbioma (Gootenberg et al., 2011).

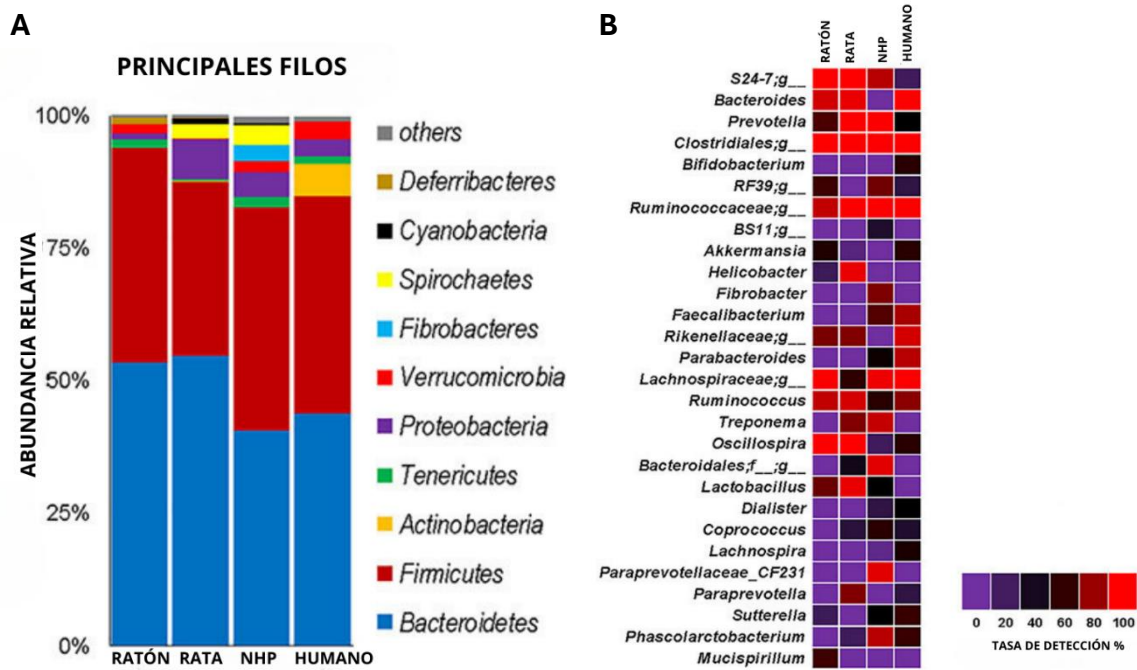
Elegir un modelo animal para el estudio taxonómico de la microbiota intestinal implica encontrar aquel que se asemeje más en abundancia y similitud bacteriana con la microbiota intestinal humana, para ello, uno de los criterios empleados es la distancia UniFrac ponderada (W-UniFrac), la cual es una medida que se utiliza para comparar comunidades biológicas y que toma en cuenta la abundancia de las especies (Wong et al., 2016). Como se observa en la figura 6, la microbiota intestinal en primates no humanos (NHP) se asemeja más a la microbiota intestinal humana de acuerdo a la medida UniFrac ponderada, sin embargo, resulta complejo el estudio en estos animales por diversos factores bioéticos y económicos. A pesar de esto, el estudio taxonómico en ratas resulta una buena elección ya que comparte una relación similar con los filos bacterianos en humanos.





**Figura 6. A) Distancia UniFrac ponderada en humano, primates no humanos (NHP), rata y ratón. B) Distancia UniFrac entre grupos** \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$  (Prueba de Kruskal–Wallis seguida de una prueba *post hoc* de Dunn con corrección de Bonferroni. Tomado y modificado de (Nagpal et al., 2018)

Por otra parte, la abundancia relativa y la tasa de detección también son criterios para establecer el estudio sobre un modelo animal. En el mismo caso observamos que la microbiota intestinal en ratas parece estar dominada por *Bacteroidetes* seguido de *Firmicutes*, la composición de la microbiota humana demostró una abundancia comparable o ligeramente mayor de *Firmicutes* frente a *Bacteroidetes*. Las *Actinobacterias* son más altas en los humanos, mientras que en ratas es apenas detectable. La abundancia de proteobacterias es mayor en ratas. La abundancia de *Tenericutes* fue notablemente menor en ratas y humanos. *Verrucomicrobia* no mostró ninguna diferencia significativa entre grupos, pero fue numéricamente muy baja en ratas en comparación con humanos (Nagpal et al., 2018), ver figura 7. A continuación, se muestran las similitudes y diferencias entre la microbiota intestinal de rata, humano, ratón y primates no humanos (NHP) a nivel de OTUS.



**Figura 7. A) Abundancia relativa media de los filos principales en rata y humano. B) Tasa de detección.** Porcentaje de prevalencia de las principales OTU (Unidades taxonómicas operativas) a nivel de género en ratas y humanos. Tomado y modificado de (Nagpal et al., 2018).

Debido a esta similitud taxonómica bacteriana, diversos investigadores han propuesto antibióticos o combinaciones de estos para promover alteraciones en la microbiota intestinal en modelos experimentales de ratón; ver tabla 5, analizando estos cambios mediante el análisis de secuenciación del gen 16S rRNA o bien cuantificando la producción de AGCC.

En un estudio comparativo de la administración oral de metronidazol o vancomicina sobre la microbiota intestinal, se encontró que los ratones tratados con metronidazol solo experimentaron alteraciones relativamente transitorias en sus comunidades microbianas fecales y volvieron a un estado similar a la composición previa al tratamiento entre 1 y 2 semanas después de suspender el tratamiento. Sin embargo, aquellos que recibieron vancomicina experimentaron un cambio profundo en la composición de su microbiota, y taxones como Bacteroidales S24–7 (parte de la microbiota intestinal normal) cayeron permanentemente por debajo del límite de detección y con un efecto menos favorable, propició la expansión de miembros del género *Enterococcus*, el cual se relaciona con infecciones (Lewis et al., 2015).

Método	Antibióticos	Dosis/día	Duración	Referencias
Sonda gástrica	Vancomicina + neomicina + ampicilina + metronidazol + gentamicina	Vancomicina 0.1 mg/ todos los demás 0.2 mg	3 días	(Kelly et al., 2015)
Sonda gástrica	Bacitracina + neomicina + estreptomina	200 mg/kg de peso corporal (c/u)	3 días	(Sayin et al., 2013)
Sonda + vía oral	Vancomicina + neomicina + ampicilina + metronidazol	10 mg c/u por sonda, luego 0,5–1,0 g/L c/u en el agua potable	5 días por sonda, seguidos de 7 a 10 días <i>ad libitum</i>	(Kuss et al., 2011)
Agua potable ( <i>ad libitum</i> )	Vancomicina + ampicilina + polimixina	Polimixina 0.1 g/L Ampicilina 1g/L Vancomicina 0.5 g/L	4 semanas <i>ad libitum</i>	(Kim et al., 2017)

Tabla 6. Diversos tratamientos con antibióticos que modifican la microbiota intestinal.

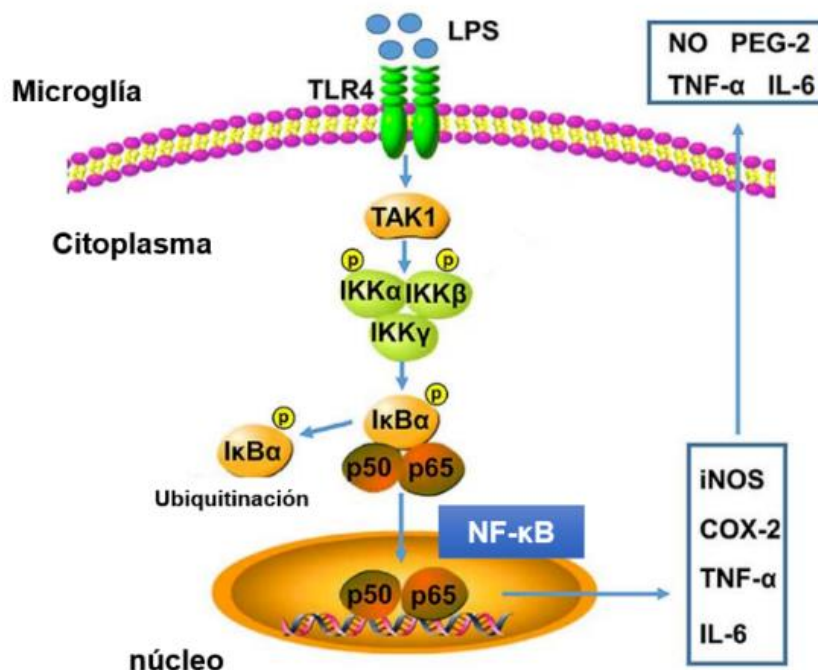
### 1.9 El modelo de lesión intraestriatal con LPS

El LPS es una molécula abundante en la membrana externa de la mayoría de las bacterias Gram negativas. La toxicidad mediada por LPS reside tanto en la actividad endotóxica del lípido A como en la capacidad del núcleo y del antígeno O para proporcionar a la bacteria resistencia a los mecanismos de defensa del huésped (Maldonado et al., 2016)

La administración de LPS intraperitoneal provoca una respuesta inflamatoria mediada principalmente por receptor tipo TOLL 4 (TLR4) y reactivación microglial, pérdida sináptica y finalmente muerte neuronal (Yang et al., 2020).

Las células de la microglía son la defensa clave contra patógenos invasores dentro del SNC y, por lo tanto, no es sorprendente que la activación de estas células ya sea por un solo tipo de ligando o una combinación de ligandos, conduzca a la secreción de citocinas y quimiocinas (Gu et al., 2018), ver figura 7. Por ejemplo, la estimulación de TLR4 en la microglía humana con LPS da como resultado la secreción de las citocinas proinflamatorias

TNF- $\alpha$  e IL-6, así como de la citocina antiinflamatoria interleucina 10 (IL-10) (Okun et al., 2009).



**Figura 8. Mecanismo de toxicidad.** Una vez que el receptor tipo Toll 4 (TLR4) se activa a través de su ligando exógeno LPS, TAK1 es reclutado por TLR4 y se autofosforila. La fosforilación de TAK1 conduce a una activación del complejo IKK (IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  e IKK- $\gamma$ ). El complejo IKK fosforila I $\kappa$ B $\alpha$ , lo que lleva a su ubiquitinación y posterior degradación, esto permite la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo el cual se dirige a expresiones de genes inflamatorios que incluyen iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$  e IL-6. Tomado y modificado de (Gu et al., 2018)

Debido a que en la etapa prodrómica ha sido reportada que la disfunción gastrointestinal acompañada de disbiosis intestinal podría afectar la patogénesis y la progresión de la EP, se ha reportado un modelo de doble lesión a través de la disbiosis intestinal inducida por la administración de ceftriaxona (CFX) durante 14 días y la inyección intraestriatal de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en ratones. El análisis taxonómico de las bacterias en las heces reveló que en los animales tratados con CFX hubo una disminución significativa de 26 géneros bacterianos, en comparación con los animales que no recibieron el antibiótico. De manera notable la disbiosis intestinal inducida por CFX exacerbó la pérdida de inervación dopaminérgica inducida con 6-OHDA, acompañada de un pobre desempeño de la coordinación motora en la prueba Rotarod en comparación al grupo sin disbiosis (Avagliano et al., 2022).

El modelo con LPS se ha utilizado para investigar el efecto de la activación microglial, que se ha asociado con la neurodegeneración dopaminérgica observada en la EP. En un estudio comparativo del modelo de lesión unilateral e intraestriatal utilizando LPS o 6-OHDA en ratas macho Wistar, se encontró que los animales administrados con LPS mostraron un mayor cambio en la morfología de la microglía (83% de células Iba-1+), predominando las formas ameboides y activadas, en comparación con aquellos que sufrieron daño por 6-OHDA. Sin embargo, al evaluar las neuronas TH+, se observó una mayor disminución en el modelo con 6-OHDA a los 14 días post-lesión (Parra et al., 2020). Además, al medir el daño motor, el mayor daño fue generado con 6-OHDA en comparación a LPS. Estos hallazgos sugieren que el deterioro motor inducido por LPS puede ser mediado principalmente la inflamación inducida en el estriado por la activación de la microglía, como se ha demostrado en un curso temporal (Parra et al., 2020).

Otro modelo estudiado en el laboratorio de neuroquímica es aquel donde se genera una doble lesión en ratas, el cual consta de: una lesión cerebral aplicando LPS en la zona dorsolateral del estriado y generando un proceso de disbiosis intestinal mediante la administración de antibióticos (amoxicilina y vancomicina). En los sujetos de estudio se ha observado pérdida de memoria e inducción de asimetría motora, así como cambios en la actividad intestinal, asociados a una disminución en la tasa de defecación (Tesis de Maestría Gutiérrez Alberto 2024- Lab Neuroquímica).

### ***1.10 Uso de probióticos en modelos experimentales de la EP***

El término probiótico se define como una mezcla de microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades adecuadas, proporcionan al huésped un beneficio para la salud (Gallo et al., 2016). Los mecanismos por los que se consiguen los efectos beneficiosos de los probióticos son la reducción de la permeabilidad intestinal, el aumento de la secreción de mucina por las células caliciformes, el aumento de las defensinas que impiden la colonización con patógenos, la producción de AGCC, la estimulación de la secreción de IgA, la disminución del pH, el aumento de la tolerancia de las células inmunes a los microorganismos comensales, mientras que para los patógenos, la tolerancia no disminuye (Barko et al., 2018). Los probióticos pueden producir efectos beneficiosos en el huésped sin cambiar el microbioma permanente, siendo esto posible mediante la colonización transitoria

del intestino. Por tanto, la administración de probióticos puede proteger la homeostasis intestinal durante la administración de antibióticos (Barko et al., 2018).

La evidencia preclínica y clínica sobre los efectos y mecanismos beneficiosos de los probióticos en la EP es todavía muy limitada. Estos pueden ser una herramienta poderosa para restaurar la composición de la microbiota asociada a la EP, mejorar la función gastrointestinal y, por lo tanto, reducir la permeabilidad intestinal y la translocación bacteriana. Sin embargo, aún no hay datos concluyentes que nos digan cuáles son las mejores mezclas de probióticos o incluso el mecanismo por el cual estos organismos generan beneficios a un organismo en neurodegeneración.

El uso de diversos probióticos se ha estudiado para mejorar los síntomas inflamatorios en diversas enfermedades entre ellas la EP, ver tabla 6.

Referencia	Cepa probiótica	Dosis y duración	Modelo estudiado	Efecto sobre mediadores inflamatorios	Pruebas de conducta
(Parra et al., 2023)	<i>L. rhamnosus</i> y <i>B. lactis</i>	1x10 <sup>9</sup> UFC/15 días antes de la adm. Intraestriatal con LPS	Inyección de LPS (32 µg) en estriado dorsolateral-ratas Wistar macho	↓ microgliosis	Mejoras en la marcha en el modelo de la viga
(Cuevas-Carbonell et al., 2022)	<i>L. rhamnosus</i> y <i>B. lactis</i>	1x10 <sup>9</sup> UFC/14 días antes y 21 días después de la adm. Intraestriatal con 6-OHDA	Inyección de 6-OHDA (8.75 µg) en estriado dorsolateral-ratas Wistar macho	↓ microgliosis	Preservó la función motora
(Sancandi et al., 2023)	<i>Symprove</i> <sup>TM</sup> <i>L. acidophilus</i> NCIMB 30175, <i>L. plantarum</i> NCIMB 30173, <i>L. rhamnosus</i> NCIMB 30174 y <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 30176	7x10 <sup>7</sup> UFC (0.5mL de <i>Symprove</i> <sup>TM</sup> ) /24 días a partir de la inyección intraperitonea 1	Inyección de DSP-4 (25 mg/kg) vía intraperitoneal y 4 días después 6-OHDA (15 µg) en el estriado dorsolateral-ratas Wistar macho	↓ microgliosis	No se evaluaron

(Michels et al., 2022)	<i>B. lactis</i> (LACT GB™), <i>L. rhamnosus</i> (RHAM GB™) y <i>L. reuteri</i> (REUT GB™)	1x10 <sup>9</sup> UFC/30 días antes de la adm. intraperitoneal con LPS	Inyección de LPS (15mg/kg) intraperitoneal -ratones macho BALB/c	↓ IL-6, IL-1β en intestino/grupos con probióticos ↓ IL-1β en cerebro/grupos con probióticos ↓ IL-10 en el grupo LPS	Prueba de laberinto en cruz elevado: los animales con <i>B. lactis</i> tuvieron más entradas en los brazos abiertos
(Alipour Nosrani et al., 2021)	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>L. reuteri</i> y <i>L. fermentum</i>	2x10 <sup>9</sup> /14 días antes de la adm. intraestriatal con 6-OHDA	Inyección de 6-OHDA (6 µg) en estriado dorsolateral-ratas Wistar macho	↑ Malondialdehído con 6-OHDA	Laberinto acuático de Morris: los probióticos disminuyeron la latencia de escape

**Tabla 7. Estudios in vivo de los efectos de diferentes cepas probióticas en la modulación de la inflamación en modelos de EP.**

### 1.11 Marcadores metabólicos en plasma

Como hemos descrito anteriormente, la presencia de disbiosis intestinal, así como la administración de LPS generan procesos inflamatorios a nivel neuronal y sistémico. En este modelo de doble golpe evaluamos si la administración concomitante de antibióticos y LPS pueden modificar el metabolismo de glucosa, lípidos, marcadores de actividad renal, aspartato aminotransferasa (AST) y proteínas transportadoras mediante la cuantificación de marcadores en plasma sanguíneo, ver tabla 7. Además, se conoce el papel de la microbiota intestinal sobre la glucosa y el colesterol (Haghikia et al., 2022; Zhou et al., 2022).

Metabolito	Indicador clínico	Referencia
<b>Glucosa:</b> Fuente principal de energía utilizada por el cuerpo, que se obtiene de los carbohidratos.	Un valor incrementado de glucosa después de un periodo de ayuno indica que no hay suficiente insulina para transportar la glucosa al interior de las células.	(Han et al., 2016)
<b>Colesterol:</b> Desempeña un papel esencial en la síntesis de la membrana celular y en el crecimiento y la diferenciación celular. En las células de los mamíferos, el colesterol puede	Los niveles elevados de colesterol se correlacionan con la acumulación de este en las paredes de las arterias (ateroesclerosis).	(Schade et al., 2020)

sintetizarse a partir de precursores de acetato o absorberse de fuentes dietéticas o exógenas.		
<b>Triglicéridos:</b> Representa la principal forma de almacenamiento y transporte de ácidos grasos dentro de las células y en el plasma.	Si el metabolismo hepático de los ácidos grasos se altera, conduce a la acumulación de triglicéridos dentro de los hepatocitos.	(Alves-Bezerra & Cohen, 2018)
<b>Creatinina:</b> Es un producto de desecho que proviene de la digestión de las proteínas en los alimentos y la descomposición normal del tejido muscular. Se elimina del organismo a través de los riñones.	Niveles elevados de creatinina indican que la sangre no está siendo suficientemente filtrada por los riñones.	(Bjornsson, 1979)
<b>Ácido úrico:</b> El ácido úrico (AU) es el producto final del metabolismo de las purinas (degradación de adenina y guanina), derivado principalmente de síntesis endógena y solo una parte menor de fuentes exógenas.	La mayor parte del urato se excreta por vía renal (solo un tercio se elimina por vía gastrointestinal), lo que implica tres fases: filtración, reabsorción y secreción. Si los niveles se encuentren elevados indica daño renal.	(Gherghina et al., 2022)
<b>Urea:</b> Compuesto químico orgánico que se encuentra en la orina, el sudor y las heces. La generación de urea cumple una función clave en el catabolismo proteico en los mamíferos.	La urea, como producto terminal, se excreta posteriormente fuera del organismo después de la generación. Es bien conocido durante siglos que aproximadamente el 90% de la urea se elimina en la orina por el riñón.	(Yang & Sands, 2014.)
<b>Nitrógeno ureico (BUN):</b> Cantidad de nitrógeno procedente de la urea.	Sirve para medir la cantidad de nitrógeno procedente de la urea en la sangre como índice de la función renal. La manifestación más común es la hipovolemia. Debido a la escasez de suministro de sangre renal, la tasa de	(B. Yang & Sands, 2014.)

	filtración glomerular se reduce, lo que provoca un aumento del BUN.	
<b>AST:</b> Es una enzima no específica de órganos que se encuentra en muchos tejidos del cuerpo humano, donde cataliza la reacción reversible de transaminación. Debido a la baja concentración de L-aspartato (L-Asp) en la sangre, la AST es la única enzima que suministra este aminoácido como sustrato para muchos procesos metabólicos, como el ciclo de la urea o los nucleótidos de purina y pirimidina en el hígado, la síntesis de L-arginina en el riñón y el ciclo de nucleótidos de purina en el cerebro y el músculo esquelético.	Los niveles elevados de aspartato aminotransferasa (AST) en la sangre pueden indicar una lesión hepática o muscular.	(Panteghini, 1990)
<b>Proteínas totales:</b> Componentes importantes de todas las células y tejidos. Forman la parte estructural de la mayoría de los órganos, forman enzimas y hormonas que regulan las funciones corporales.	Un bajo valor de proteínas totales indica daño a nivel hepático o renal. También puede deberse a una malabsorción de proteínas por parte del intestino.	(Barrero & Masgrau, 2001)
<b>Globulinas:</b> Son un grupo de proteínas de la sangre, algunas producidas por el hígado y otras por el sistema inmunitario. Ayudan a combatir las infecciones y a transportar nutrientes. Hay cuatro tipos principales: alfa 1, alfa 2, beta y gamma.	Su aumento indica una pérdida de albúmina y una disminución puede indicar una menor producción de inmunoglobulinas	
<b>Albúmina:</b> Tiene un peso molecular (PM) de 65.000 daltons (Da). Tiene como funciones: a) fijación y transporte de sustancias. b) responsable del	Se encuentra aumentada en la deshidratación y disminuida en los siguientes procesos: hepatopatías, infección crónica, neoplasias,	

control del equilibrio de líquidos entre los compartimientos intra y extravascular.	nefropatía, hemorragia, inanición y desnutrición.	
---	---	--

**Tabla 8. Marcadores metabólicos en plasma.**

## 2. JUSTIFICACIÓN

La EP se caracteriza principalmente por el deterioro motor, resultado de la degeneración dopaminérgica en la SNpc, sin embargo, recientemente se reconocen también los síntomas no motores (SNM), entre los cuales destaca la disfunción gastrointestinal, siendo el estreñimiento uno de los síntomas más frecuentes (Tolosa et al., 2021). Los cambios en el intestino incluso preceden a los síntomas neurológicos característicos de la EP (Nuzum et al., 2022). Además, existe evidencia que respaldan la conexión entre la alteración del microbioma intestinal en pacientes con EP en comparación con personas sanas (Lionnet et al., 2018).

En este contexto, en el laboratorio de Neuroquímica se propone el uso de un modelo de doble golpe (generando neuroinflamación con la inyección estriatal de LPS y disbiosis intestinal con antibióticos) para evaluar síntomas motores y no motores. Además, en el presente proyecto se evaluará el impacto de la inyección de LPS y la administración de antibióticos sobre la microbiota intestinal y si hay inflamación sistémica. Este enfoque integral podría proporcionar una comprensión más completa del eje microbiota-intestino-cerebro en un modelo de la EP.

Algunas líneas de investigación sugieren que tratamientos con probióticos podrían tener un impacto positivo en la función cerebral y en la inflamación sistémica, factores relacionados con la EP. Por ejemplo, (Parra et al., 2023) reportaron que la administración de *L. rhamnosus* y *B. lactis* como tratamiento profiláctico a una lesión intracerebral con LPS generó una disminución de la microglia y las alteraciones motoras. Asimismo, (Cuevas-Carbonell et al., 2022) demostraron una disminución de la pérdida dopaminérgica y la activación microglial. El presente trabajo busca expandir nuestra comprensión de cómo los probióticos en un tratamiento agudo de 8 días, específicamente *L. rhamnosus* y *B. lactis*, pueden influir en la respuesta del sistema nervioso central ante desafíos inflamatorios, modificar la microbiota, promover la integridad de la barrera intestinal y ejercer efectos inmunomoduladores a nivel sistémico.

### 3. HIPÓTESIS:

**Hi:** El tratamiento agudo con los probióticos *L. rhamnosus* y *B. lactis* ejercen un efecto inmunomodulador asociado a la microbiota y disminuye los síntomas motores y no motores en un modelo de lesión “doble golpe” en rata.

**Ho:** El tratamiento agudo con los probióticos *L. rhamnosus* y *B. lactis* no ejercen un efecto inmunomodulador, por lo tanto, no modifican la microbiota y no genera cambios en los síntomas motores y no motores en un modelo de lesión “doble golpe” en rata.

### 4. OBJETIVOS

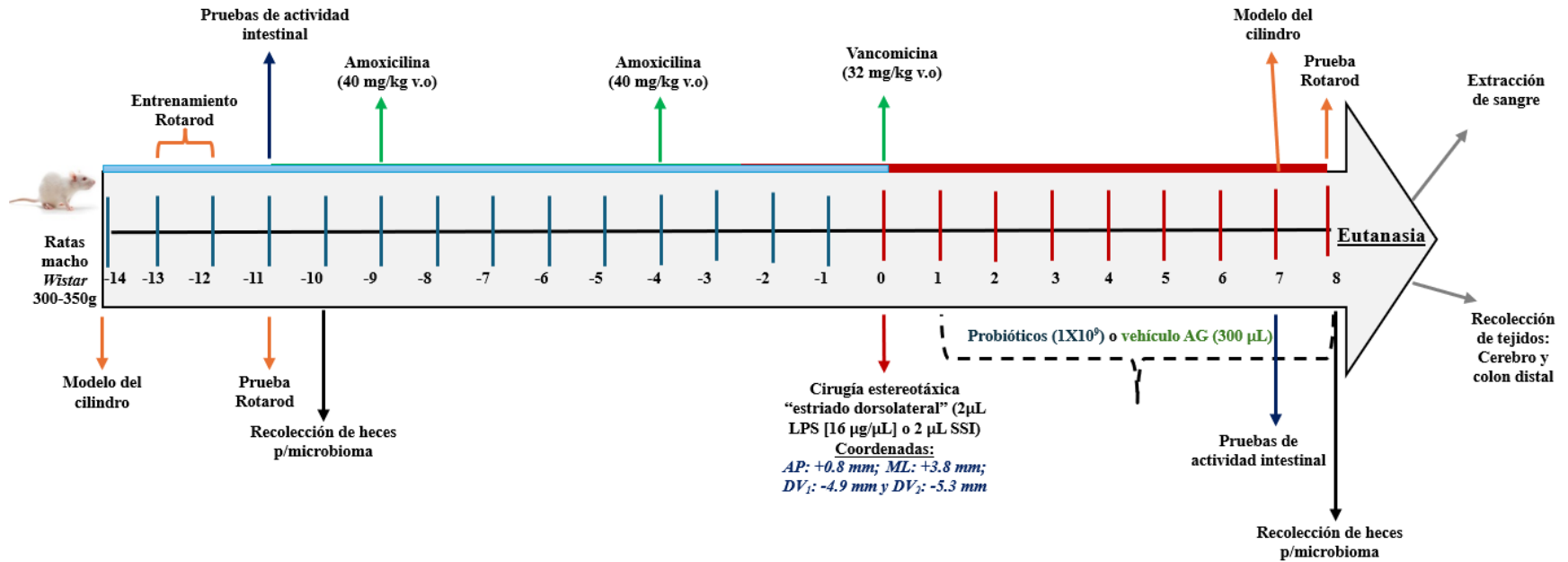
#### Objetivo General:

Determinar los efectos del tratamiento agudo con *L. rhamnosus* y *B. lactis* sobre la coordinación motora, la actividad intestinal y los efectos inmunomoduladores asociados con la microbiota intestinal en un modelo de lesión “doble golpe” en rata.

#### Objetivos particulares:

1. Evaluar los efectos de *L. rhamnosus* y *B. lactis* en la asimetría y la coordinación motora y determinar el daño *dopaminérgico* en el estriado y la SNpc.
2. Evaluar los efectos de *L. rhamnosus* y *B. lactis* en la actividad intestinal, las alteraciones histopatológicas y en la expresión de MUC2 en el colon distal.
3. Determinar los efectos de *L. rhamnosus* y *B. lactis* sobre la modulación de la proteína C reactiva, IgA y marcadores en plasma.
4. Evaluar los efectos de *L. rhamnosus* y *B. lactis* sobre la microbiota intestinal mediante el análisis de la subunidad ARNr 16S.

## 5. DIAGRAMA DE TRABAJO



Grupo experimental	n	Tratamiento
Intacto	7	Sin tratamiento
Sham	6	Inyección intraestriatal SSI
Antibióticos-Sham	7	Amoxicilina y vancomicina v.o e inyección intraestriatal con SSI
LPS	6	inyección intraestriatal con LPS
Antibióticos-LPS	7	Amoxicilina y vancomicina v.o e inyección intraestriatal con LPS
Antibióticos-LPS-Veh	7	Amoxicilina y vancomicina v.o e inyección intraestriatal con LPS Vehículo (aceite de girasol)
Antibióticos-LPS-Probióticos	8	Amoxicilina y vancomicina v.o e inyección intraestriatal con LPS Probióticos (cepas <i>L. rhamnosus</i> y <i>B. lactis</i> )

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Sujetos de estudio

Para el desarrollo de los experimentos se usaron ratas macho de la cepa *Wistar* con un peso de (300 – 350 g, n= 48), fueron proporcionados por el Bioterio Claude Bernard de la Benemérita universidad Autónoma de Puebla siguiendo la norma NOM-062-ZOO-1999 para su uso y cuidado, y se alojaron en el vivario del laboratorio de Neuroquímica de la FCQ y fueron mantenidos en las siguientes condiciones:

- Ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas.
- Alimento y agua *Ad libitum*, temperatura ( $24 \pm 2$  °C) y % humedad ( $45 \pm 10\%$ ).

Como parte de los cuidados, se realizó la técnica “*handling*” durante 3 min/rata/día con el fin de evitar estrés en los sujetos de estudio, además se pesaron tres veces por semana.

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

1. Intacto n=7
2. Sham n=6
3. Antibióticos-Sham n=7
4. LPS n=6
5. Antibióticos-LPS n=7
6. Antibióticos-LPS-Vehículo (aceite de girasol + vitamina E) n=7
7. Antibióticos-LPS-Probióticos n=8

### 6.2 Cirugía estereotáxica

El procedimiento quirúrgico se realizó bajo anestesia con ketamina (115.4 mg/mL) a una dosis de 85 mg/kg, y xilacina (8.56 mg/mL) administrada a una dosis de 16 mg/kg vía i.p. El modelo hemiparkinsoniano se indujo con la inyección de 2  $\mu$ L de LPS [16  $\mu$ g/ $\mu$ L] de (*Escherichia coli* serotipo O26:B6; Sigma-Aldrich) en el estriado dorsolateral, a una velocidad de infusión de 0.2  $\mu$ L/min, mientras que al grupo control (Sham) se le administró 2  $\mu$ L de solución salina isotónica (SSI) [0.9% de NaCl] bajo las mismas condiciones. Para localizar el sitio de inyección, se usaron las siguientes coordenadas (*AP*: +0.8 mm; *ML*:

+3.8 mm;  $DV_1$ : -4.9 mm y  $DV_2$ : -5.3 mm), correspondiente al estriado dorsolateral de acuerdo con( G. Paxinos and C. Watson, 2007).

Finalizada la cirugía, se llevaron a cabo cuidados postoperatorios que incluyeron la limpieza de la herida con solución antiséptica Microdacyn® y la aplicación de lidocaína. Además, se administró 1 mL de SSI [0.9% de NaCl] vía s.c. inmediatamente después de la cirugía y una hora después se administró 1 mL de glucosa al 5% por la misma vía. Durante la recuperación también se midió la temperatura vía sublingual cada 15 minutos hasta que éste alcanzara una temperatura corporal de 38°C. El animal se mantuvo en observación sobre una manta de calefacción hasta que éste empezara a deambular, cumpliendo estas condiciones se consideró apto para regresar al vivario con agua y alimento.

### **6.3 Administración de tratamientos vía oral**

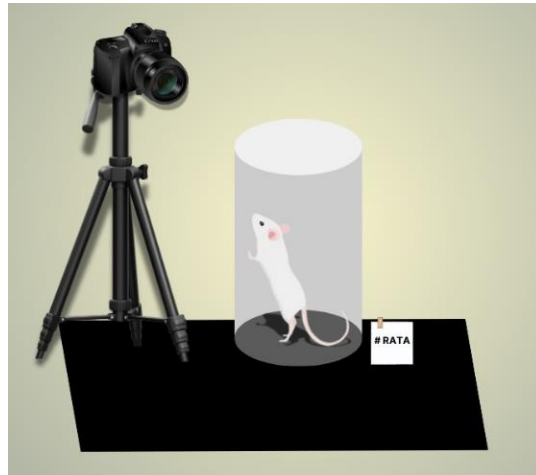
**Antibióticos.** Con el fin de generar disbiosis intestinal, se administró amoxicilina (Sigma-Aldrich) (40 mg/kg v.o) a los 9 y 4 días antes de la cirugía, posteriormente se dio una dosis de vancomicina (Sigma-Aldrich) (32 mg/kg v.o) una hora antes de la cirugía estereotáxica. Estos fármacos fueron administrados antes de los probióticos, debido a que ambos antibióticos eliminan cocos y bacilos gram-positivos.

**Probióticos y vehículo.** Se administró una mezcla de probióticos de la marca comercial Microbiot® (*producto donado por los laboratorios Columbia S.A de C.V.*) que contiene las cepas *L. rhamnosus* GG y *B. animalis ssp lactis Bb12* [ $1 \times 10^9$  UFC de cada una de las cepas contenidos en 300  $\mu$ L] durante 8 días o bien su vehículo que consiste en 300  $\mu$ L de aceite de girasol (Droguería Cosmopolita S.A de C.V., No. 8001-21-6) (182-194 KOH/g) + 0.228  $\mu$ L de vitamina E (Gelpharma®;100 mg/mL).

### **6.4 Modelo del cilindro**

Se evaluó el grado de asimetría motora mediante la prueba del cilindro. Para ello, las ratas fueron colocadas en un cilindro de acrílico transparente (20 cm de diámetro x 45 cm de altura) y se videograbaron durante 5 minutos como se muestra en la figura 9. Se registraron los contactos de ambas extremidades, así como la extremidad anterior ipsilateral y contralateral, posteriormente, se contó el porcentaje de contactos de ambas

extremidades, extremidad ipsilateral y contralateral (Miyanishi et al., 2019; Schallert & Tillerson, 2000).



**Figura 9. Modelo del cilindro.** El animal explora la pared del cilindro y coloca sus extremidades delanteras de acuerdo con el grado de asimetría motora.

Para los cálculos se usaron las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned} & \% \text{ Uso de la} \\ & \text{extremidad ipsilateral} \\ & = \left( \frac{\text{extremidad ipsilateral}}{\text{ambas extremidades} + \text{extremidad ipsilateral} + \text{extremidad contralateral}} \right) 100 \end{aligned}$$

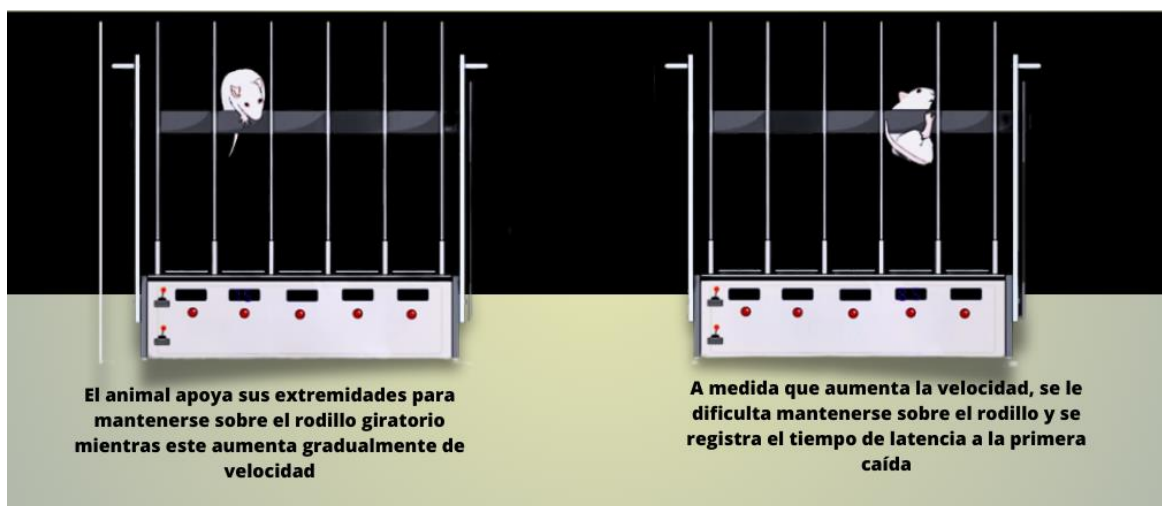
$$\begin{aligned} & \% \text{ Uso de la} \\ & \text{extremidad contralateral} \\ & = \left( \frac{\text{extremidad contralateral}}{\text{ambas extremidades} + \text{extremidad ipsilateral} + \text{extremidad contralateral}} \right) 100 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \% \text{ Uso de ambas} \\ & \text{extremidades} \\ & = \left( \frac{\text{ambas extremidades}}{\text{ambas extremidades} + \text{extremidad ipsilateral} + \text{extremidad contralateral}} \right) 100 \end{aligned}$$

## 6.5 Prueba Rotarod

La coordinación motora de los sujetos experimentales se evaluó mediante una prueba de aceleración utilizando el equipo de rotarod (OMNIALVA). El protocolo indicado señala entrenamiento por dos días consecutivos, llevándose a cabo en el día 13 y 12 previos a la lesión, días en que se les expuso a un rodillo giratorio con una velocidad inicial de 4 rpm y que se incrementó gradualmente hasta alcanzar una velocidad aproximada de 10.8 rpm, en un tiempo total de 90 segundos, los animales tienen que alcanzar este tiempo para proceder a realizar las evaluaciones posteriores (Lundblad et al., 2003).

Para las evaluaciones se siguieron las siguientes condiciones: velocidad inicial de 4 rpm, velocidad final de 40 rpm y un tiempo máximo del equipo en movimiento de 300 segundos. En las pruebas de evaluación (día 11 pre-lesión y día 8 post-lesión) se midió el tiempo de latencia a la primera caída como se muestra en la figura 10.



**Figura 10. Esquema de la prueba con rotarod.** La prueba mide la capacidad de una ratita para mantenerse sobre un rodillo giratorio que aumenta la velocidad en forma creciente.

## 6.6 Prueba de actividad intestinal, tasa de defecación y porcentaje de agua en heces

Para evaluar si el modelo de disbiosis inducido con antibióticos y lesión intraestriatal con LPS modifican el tránsito intestinal, se realizaron las siguientes pruebas:

**Actividad intestinal:** Se sometieron los sujetos de estudio a 1 h de ayuno, posteriormente se colocaron dentro de una caja de prueba (caja de acrílico transparente de 50 cm de largo × 50 cm de ancho × 35 cm de alto aprox.). Durante esta prueba se recolectaron los pellets en una caja Petri estéril (previamente pesada) y se registró el número de pellets defecados cada 5 minutos, durante un lapso de 20 minutos.

**Tasa de defecación y porcentaje de agua en heces:** Se contó el número de pellets defecados durante 1 hora. Posteriormente se pesaron los pellets fecales recolectados para obtener el peso húmedo de las heces, después se colocaron en una estufa a 55°C durante 24 horas para obtener el peso seco y calcular el porcentaje de agua en heces con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de agua} = \frac{\text{peso húmedo} - \text{peso seco}}{\text{peso húmedo}} \times 100$$

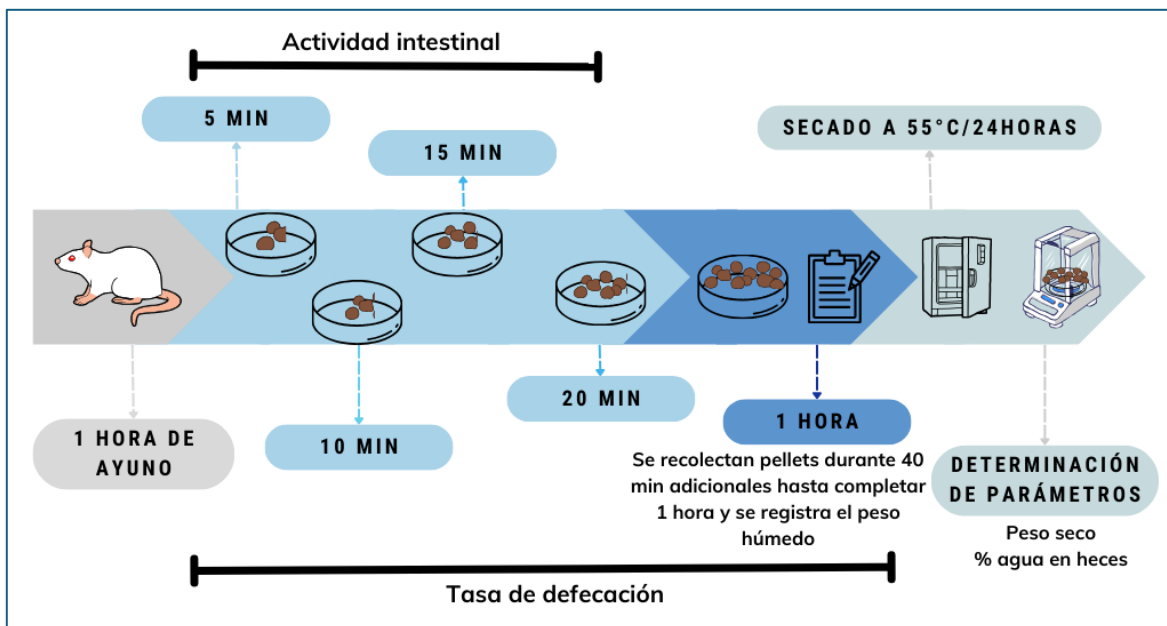


Figura 11. Esquema de trabajo para tasa de defecación y actividad intestinal. Después de 1 hora de ayuno, se evalúa la actividad intestinal y la tasa de defecación como indica la flecha.

## 6.7 Recolección de heces para análisis del microbioma fecal

Se colocó una caja en un área previamente desinfectada y se limpió en su interior con alcohol al 70%, se colocó al sujeto de estudio dentro de la caja hasta que empezara a defecar. Los pellets fecales se recogieron con agitadores de madera estéril y se depositaron en una caja Petri estéril. De inmediato se pesaron entre 200-250 mg de heces y se colocó esta cantidad en un microtubo, registrando el peso de la muestra en cada tubo. Posteriormente se almacenaron las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$  para preservar la integridad del ADN y realizar análisis posteriores (ver figura 12).

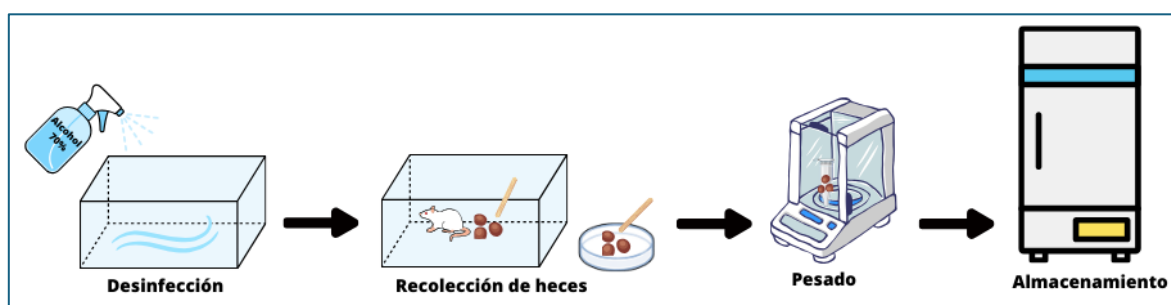


Figura 12. Esquema de trabajo de recolección de heces para el análisis del microbioma fecal.

## 6.8 Eutanasia y recolección de muestras

La eutanasia se realizó a los 8 días post-lesión en una cámara de gas ( $\text{CO}_2$ ), antes de realizar la perfusión de los tejidos, se realizó una extracción de sangre por punción cardiaca con una jeringa previamente heparinizada (ver obtención de plasma/EDTA). Se realizó perfusión intracardiaca con buffer de fosfato sódico (PBS; pH 7.4) durante 10 minutos y posteriormente con paraformaldehído (PFA) al 4% disuelto en (PBS; pH 7.4) durante 15 minutos. Se recolectó el colon distal, el ciego y el cerebro. El ciego se pesó con su contenido fecal y se determinó el índice de peso del ciego respecto al peso corporal del animal, con la fórmula:

$$\text{Índice de peso del ciego} = \frac{\text{peso ciego}}{\text{peso corporal}} \times 100$$

Los tejidos seleccionados se mantuvieron en paraformaldehído durante 15 días y después se transfirieron a una solución de PBS hasta su procesamiento.

## 6.9 Obtención de plasma/EDTA

El día de la eutanasia (8 días post-lesión), se tomó una muestra de sangre por punción intracardiaca y se depositó en un tubo con EDTA previamente guardado en el refrigerador a 4°C, se centrifugó la muestra a 2500 rpm por 10 min para separar el plasma sanguíneo del resto de paquete globular. Se colocó el plasma dentro de un microtubo y se almacenó una alícuota de 1.5 mL a -20°C para el procesamiento de diversas pruebas metabólicas y una alícuota de 500 µL a -80°C para la cuantificación de IgA y proteína C-reactiva (ver figura 13).

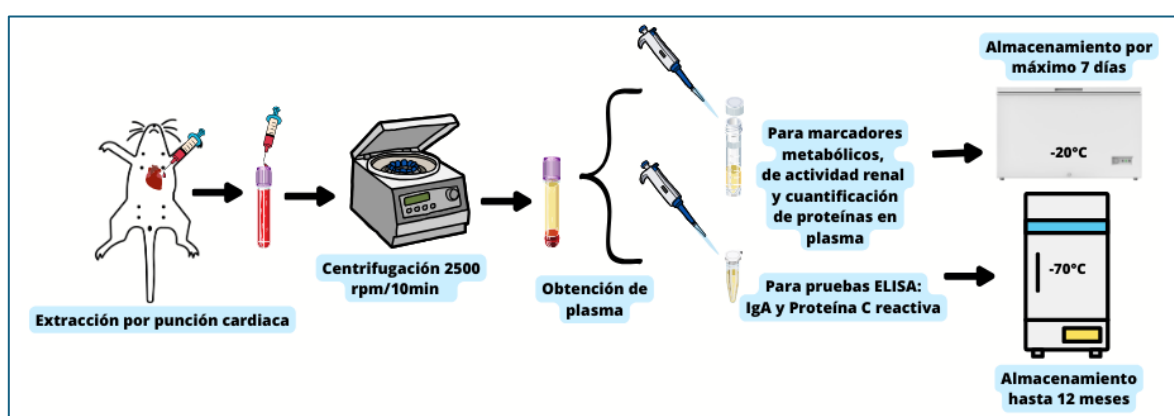


Figura 13. Esquema de trabajo para la obtención de plasma en EDTA y su posterior almacenamiento.

## 6.10 Inmunohistoquímica (IHC) para TH e Iba-1 en el cerebro

Los cerebros se sometieron a cortes coronales de 60 µm de grosor a nivel de la SNpc y estriado en un microtomo de deslizamiento Leica SM 2010R.

El fundamento de la inmunohistoquímica se basa en la capacidad de los anticuerpos para unirse específicamente a antígenos particulares. Se usó para visualizar la presencia, distribución y cantidad de antígenos en tejido cerebral mediante el uso de los anticuerpos anti-TH y para la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (anti-Iba-1). Los pasos se muestran en la figura 14.

-Para la inmunotinción de TH se utilizó el método de peroxidasa con el anticuerpo primario anti-rabbit (TH; Merck, 1:1000) y para la inmunotinción de Iba-1 se utilizó el anticuerpo primario anti-rabbit (Iba-1; Wako, 1:500).

Posterior a la inmunotinción, se montaron los tejidos en portaobjetos gelatinizados, seguido de un proceso de deshidratación utilizando una serie de alcoholes (70%, 80 %, 96 % y 100 %) y xilol (5 min por cada solución). Finalmente, se fijaron los tejidos con resina y cubreobjetos y se dejaron secar durante 24 horas. Se tomaron fotografías 1x para el análisis del área inmunorreactiva a TH en el estriado dorsolateral con ayuda de una cámara CANON EOS SL3 y el análisis de densitometría se realizó con el software IMAGEJ®.

Por otro lado, se tomaron fotomicrografías con el microscopio Axiolab-5 en los aumentos 5X y 20X en los cortes de la SNpc, el aumento 5X se usó para delimitar el área de conteo de neuronas TH+ y el aumento 20X se empleó para contar las neuronas dopaminérgicas con el software IMAGEJ®.

El análisis de imágenes para Iba-1 se realizó tomando cuatro fotomicrografías alrededor del sitio de lesión, las cuales se analizaron por densitometría con el software IMAGEJ®.

Para todos los análisis se obtuvieron de 2 a 4 cortes representativos de cada lado (ipsilateral y contralateral) por cada uno de los animales.

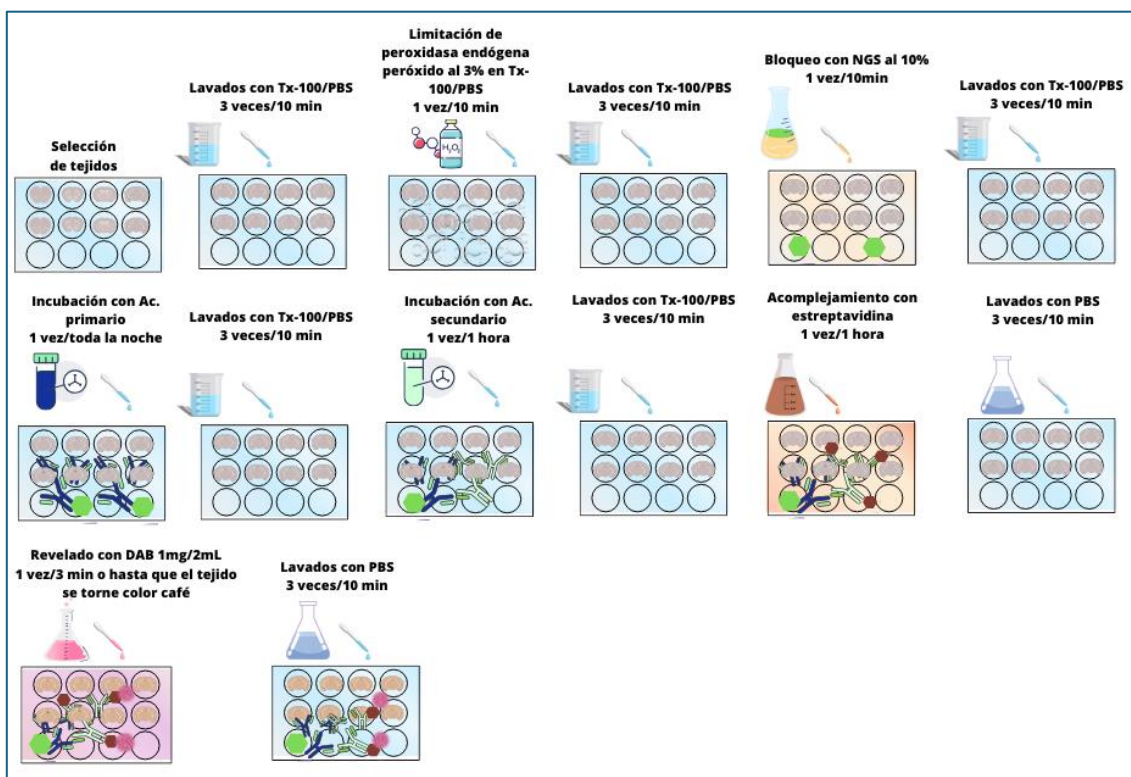


Figura 14. Esquema de trabajo de la técnica inmunohistoquímica por el método de peroxidasa. Se muestran los pasos para el acoplamiento antígeno-anticuerpo.

### 6.10.1 Cuantificación del % de área teñida en el estriado

Para el cálculo del área inmunorreactiva a TH+ e Iba1+ se delimitaron áreas equivalentes en ambos estriados excluyendo el núcleo accumbens, además se seleccionó de modo manual el umbral de color en el programa IMAGEJ.

Para el umbral se seleccionaron los comandos de la siguiente manera: Image>Type>8-bit (la imagen ahora se verá en escala de grises) >seleccionar herramienta “freehand selections” para delimitar el área de análisis, que podemos observar cómo la zona trazada en color azul.

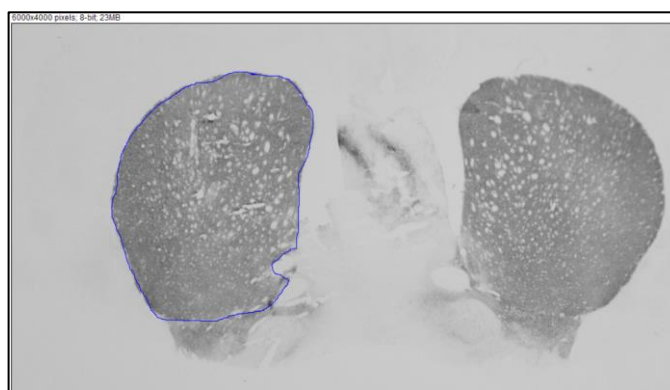


Figura 15. Delimitación de área para el análisis del estriado. (zona con contorno azul).

Posteriormente se seleccionó de nuevo Image>Adjust>Threshold> (Se abre una ventana con opciones para realizar el ajuste del umbral), siendo el siguiente el ajuste propuesto:

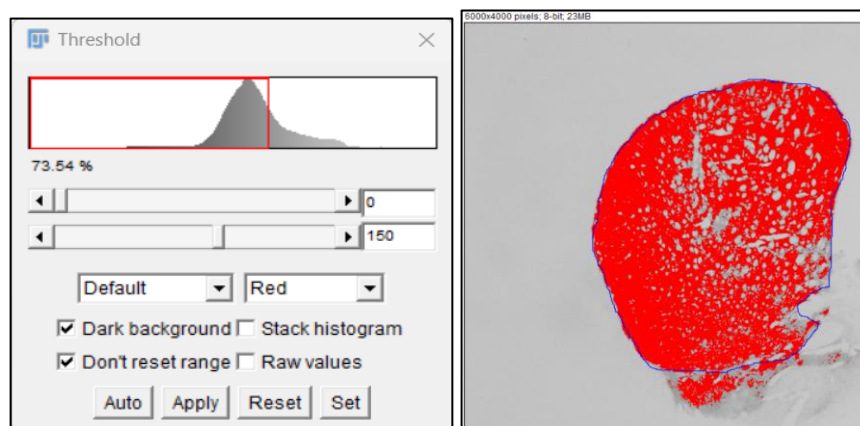


Figura 16. Ajusta de umbral para el análisis en el software IMAGEJ®.

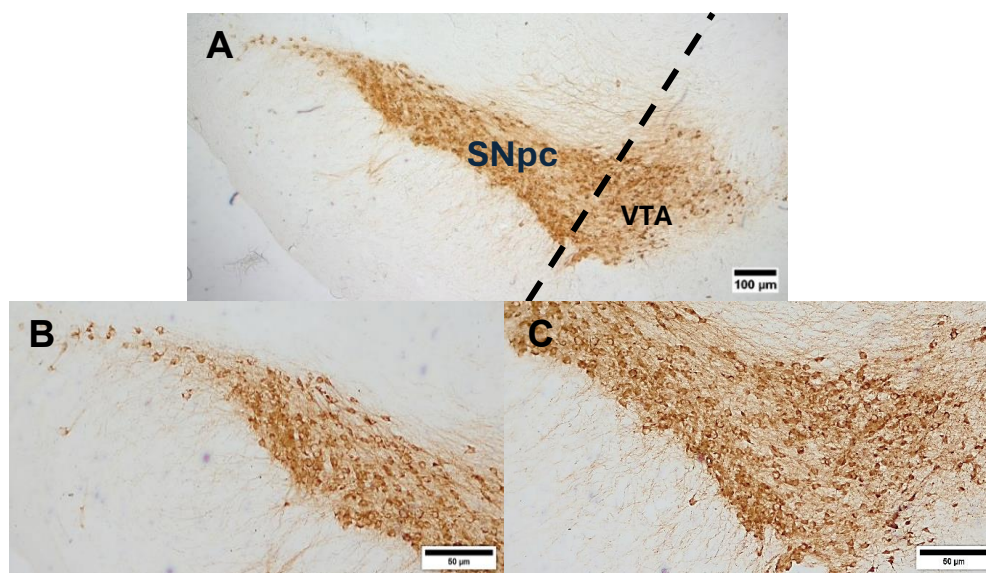
Los pasos mostrados en las figuras 15 y 16 se realizan en todos los cortes representativos por cada animal, posteriormente obtenemos el área teñida al seleccionar AnalyzeàMeasureà Al final se obtuvo un archivo en formato .csv con los datos de medición de cada uno de los cortes, en donde podemos visualizar el % área teñida como se muestra en la figura 17.

A	B	C	D	E	F	G	H	I
	Label	Area	Mean	IntDen	%Area	RawIntDen	MinThr	MaxThr
1	ESTRIADO 1.jpg	171828	209.45	35989476	94.46	35989476	0	150
2	ESTRIADO 2.jpg	161230	211.75	34140634	88.07	34140634	0	150
3	ESTRIADO 3.jpg	161454	212.68	34337816	91.1	34337816	0	150
4	ESTRIADO 4.jpg	173321	210.44	36473498	93.55	36473498	0	150
				<b>PROMEDIO=</b>	<b>91.795</b>			

**Figura 17. Archivo .csv obtenido con el software IMAGEJ® donde observamos el % área teñida por cada corte.**

### ***6.10.2 Cuantificación del número de neuronas en la SNpc***

Para la sustancia nigra (SNpc), se tomaron fotografías panorámicas en aumento 5X para delimitar el área de interés sobre el conteo de neuronas excluyendo el área ventral tegmental (VTA), posteriormente se tomaron fotografías en aumento 20X para visualizar con detalles las neuronas dopaminérgicas y realizar el conteo manual con el programa IMAGEJ®, como se muestra a continuación:



**Figura 18. Cuantificación del % de área teñida en la SNpc. A)** Imagen tomada en aumento 5X; en donde se delimitó la región de la SNpc respecto a VTA. La barra indica 100  $\mu$ m. **B) y C)** Imágenes tomadas en aumento 20X para el conteo de neuronas en SNpc. La barra indica 50  $\mu$ m.

En todos los casos el cálculo de inmunorreactividad TH+ o Iba1+ y el conteo de neuronas se realizó en 2 a 4 cortes coronales de cerebro por animal. La inmunorreactividad se expresó como porcentajes en el lado ipsilateral y contralateral.

### *6.11 Análisis histopatológico del colon*

La sección del colón distal que previamente había sido fijada se sometió a un proceso de deshidratación e inclusión en parafina. **Deshidratación:** Se colocó el colon distal en *cassettes* para tejidos, rotulados con lápiz para su identificación, posteriormente se sumergió en alcoholes y parafina como se indica en la tabla siguiente:

Alcohol al 70%	30 minutos
Alcohol al 80%	30 minutos
Alcohol al 96%	1 hora y 30 minutos
Alcohol absoluto	1 hora y 30 minutos
Xilol	1 hora
Parafina	Dejar toda la noche para una mejor inclusión a una temperatura de 60°C

**Inclusión en parafina:** Se vertió parafina caliente en cada bloque de un molde de plástico desmontable hasta la mitad de su capacidad, luego se colocó el colon distal de forma vertical para obtener cortes transversales, se llenó el bloque con parafina y por último se llevó al refrigerador a una temperatura de 4°C durante al menos 90 minutos, esto con el fin de que se solidifiquen los bloques. Los bloques se cortaron y se montaron sobre los casetes de plásticos para cortes posteriores.

Posteriormente para el análisis de las estructuras histológicas se realizaron cortes transversales en el microtomo, estas secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), se tomaron fotomicrografías, se evaluaron las imágenes con el software IMAGEJ®.

**Cortes en microtomo:** Los bloques se sometieron a cortes de 5  $\mu$ m de grosor en un microtomo de deslizamiento Leica SM 2010R, estos cortes se dejaron secar sobre una parrilla de calentamiento a 50°C para adherirlos a los portaobjetos.

### ***6.11.1 Tinción de hematoxilina y eosina***

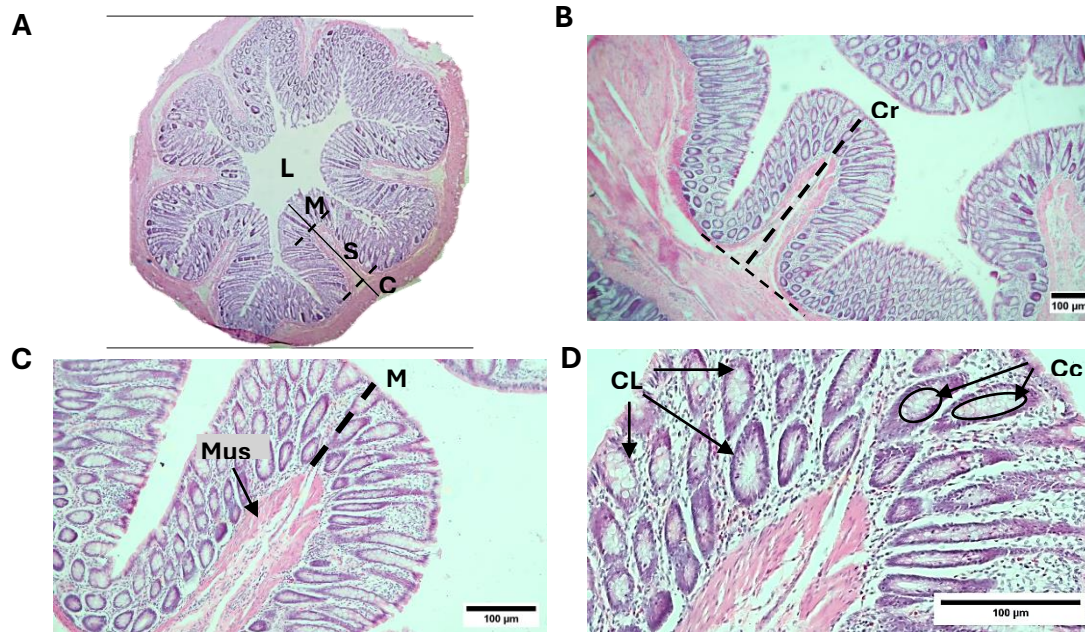
Se usaron las siguientes soluciones para teñir los tejidos:

1. Xilol (primer paso para desparafinación – 20 minutos)
2. Alcohol 96% (10 minutos)
3. Agua destilada (3 minutos)
4. Hematoxilina (2 minutos)
5. Carbonato de litio (2-3 inmersiones)
6. Alcohol ácido (HCL + alcohol al 95%, 2-3 inmersiones)
7. Eosina (1 minuto y 15 segundos)
8. Alcohol 96% (2 minutos)
9. Alcohol Absoluto (2 minutos)
10. Xilol (4 minutos)

Al final los tejidos fueron cubiertos con resina y cubreobjetos y se dejaron secar 24 horas.

**Toma de fotomicrografías:** Se tomaron fotomicrografías con el microscopio Axiolab-5 con los aumentos 5X, 10X y 20X, con el fin de observar las distintas estructuras histológicas: (crestas, criptas de Lieberkühn y capas del tejido epitelial).

**Evaluación de imágenes con el software IMAGEJ®:** Se midieron el tamaño de las crestas y la capa submucosa, se emplearon de 2 - 4 cortes por animal y se consideraron distintas crestas en todos los cortes. El aumento 5X se usó para medir el tamaño de las crestas, el tamaño 10X para obtener el tamaño de la capa mucosa y el aumento 20X y 40X para observar infiltración leucocitaria y cambios en las criptas de Lieberkühn. Como se muestra en la figura 19.



**Figura 19. Fotomicrografías del colon distal.** A) Foto panorámica de un corte transversal del colon distal, B) Fotomicrografía en aumento 5X, C) Fotomicrografía en aumento 10X, D) Fotomicrografía en aumento 20X. Abreviaturas: L: lumen, M: mucosa, SM: submucosa, CM: capa muscular, Cr: cresta, MusM: muscularis de la mucosa, CL: criptas de Lieberkühn, Cc: células caliciformes. Las barras indican 100 µm.

### Evaluación histológica

Se consideraron 4 parámetros para la evaluación del daño en el colon distal:

1. Evaluación del daño tisular (0 a 4 puntos): Disminución del tamaño de la cresta
2. Extensión del daño tisular (0 a 3 puntos): Daño en las capas del colon distal (mucosa, submucosa y muscular).
3. Grado de inflamación (0 a 3 puntos): Se evaluó el grado de infiltración leucocitaria en las capas del colon distal.
4. Extensión del daño de la cripta (0 a 4 puntos): Daño en las criptas de Lieberkühn (disminución en tamaño y número de criptas).

### 6.11.2 Inmunohistoquímica (IHC) para MUC2 en el colon

Los bloques se sometieron a cortes de 5 µm de grosor en un microtomo de deslizamiento Leica SM 2010R, estos cortes se dejaron secar sobre una parrilla de calentamiento a 50°C para adherirlos a los portaobjetos.

-Para la inmunotinción de MUC2 se utilizó el método de peroxidasa con el anticuerpo primario anti-rabbit (MUC2; Invitrogen, 1:250).

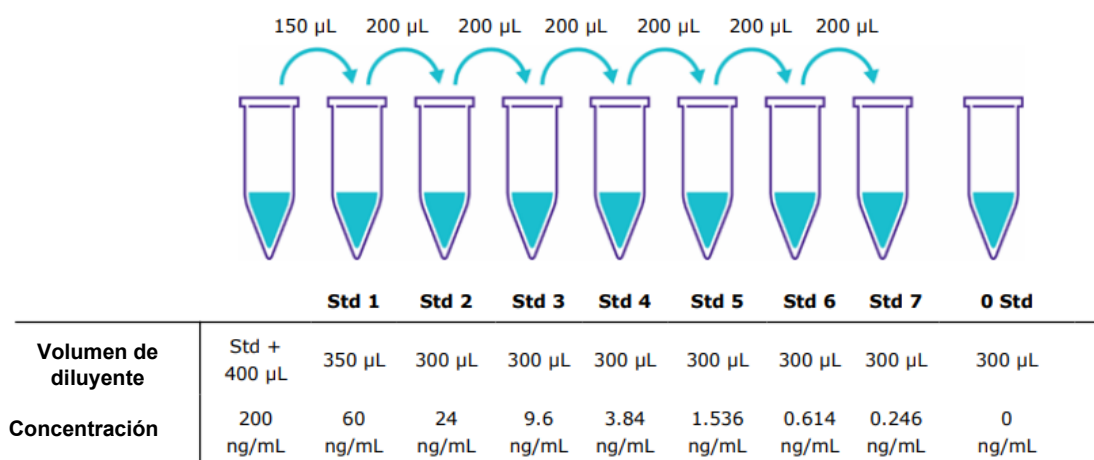
Las secciones incluidas en parafina se desparafinaron en tolueno (3 veces x 5 min) y se rehidrataron en isopropanol al 100% (3 veces x 5 min). Después se sometieron a recuperación de epítipo inducida por calor en tampón EDTA (pH 8,0).

El bloqueo se realizó con suero de cabra al 10%. Luego los tejidos se incubaron con 2 µg/mL (1:250) de anticuerpo anti-MUC2 durante toda la noche a 4 °C. Se usó una dilución (1:100) de IgG Goat anti-rabbit biotinilado como anticuerpo secundario y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Los tejidos se sometieron al complejo de estreptavidina-biotina con Diaminobencidina (DAB) como cromógeno.

Posterior a la inmunotinción, se montaron los tejidos en portaobjetos gelatinizados, seguido de un proceso de deshidratación utilizando una serie de alcoholes (70%, 80 %, 96 % y 100 %) y xilol (5 min por cada solución). Finalmente, se fijaron los tejidos con resina y cubreobjetos y se dejaron secar durante 24 horas. Se tomaron fotografías 10X, 20X y 40X para el análisis del área inmunorreactiva a MUC2 en el colon distal con ayuda de un microscopio Axiolab-5 y el análisis de densitometría se realizó con el software IMAGEJ® usando las imágenes en aumento 20X, de manera similar al punto 6.1.1. Para todos los análisis se obtuvieron de 2 a 4 cortes representativos por cada uno de los animales.

## 6.12 Determinación de la proteína C- reactiva mediante el método de ELISA

Se determinó esta proteína en el plasma recolectado de acuerdo con el punto 6.9. Se utilizó el kit ELISA (RAT-CRP/C-Reactive Protein ELISA kit-RAB0097; Sigma Aldrich). De acuerdo con las instrucciones del fabricante se prepararon todos los reactivos, muestras y estándares. A partir de la solución stock (200 ng/mL), se obtuvieron los siguientes estándares para formar la curva de calibración, como se muestra en la figura 20.



**Figura 20.** Preparación de estándares para la determinación de proteína C- reactiva a partir de una solución stock de (200 ng/mL), se realizaron diluciones seriadas añadiendo diluyente de ensayo; 350 µL al Std 1 y 300 µL al resto de los estándares, posteriormente las flechas de 150 µL y 200 µL indican la cantidad que se trasladó al tubo siguiente. El estándar 0 (0 Std) es el diluyente de ensayo 1X.

Las muestras fueron diluidas 1:50,000 con diluyente de ensayo 1X. Los pasos por seguir fueron los siguientes:

1. 100 µL de estándar o muestra a cada pocillo (por duplicado) – incubación de 2.5 horas.
2. 100 µL de anticuerpo biotinilado a cada pocillo – incubación de 1 hora.
3. 100 µL de solución de estreptavidina a cada pocillo – incubación de 45 minutos.
4. 100 µL de Reactivo de Sustrato TMB a cada pocillo – incubación de 30 minutos.

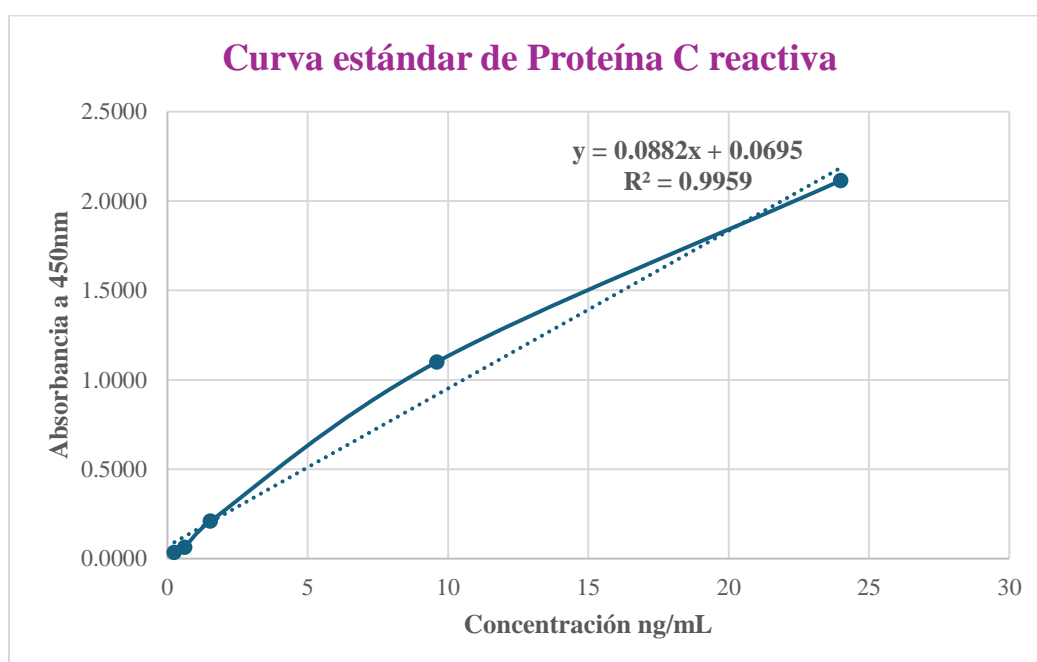
**Nota:** todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente.

5. 50 µL de Solución de paro a cada pocillo.

Se realizó la lectura inmediatamente a 450 nm en un lector de microplacas Accuris SmartReader 96 (modelo MR9600). De acuerdo con los datos obtenidos y el método de

regresión lineal, se construyó la curva de calibración y se obtuvo la ecuación de la recta para calcular las concentraciones de las muestras. Se obtuvo una  $R^2 = 0.9959$  (figura 21).

CONCENTRACION ng/mL	ABSORBANCIA 450 nm
0.246	0.0350
0.614	0.0630
1.536	0.2100
9.6	1.1000
24	2.1150



**Figura 21. Curva estándar para la determinación de Proteína C reactiva mediante el método de ELISA.** Curva construida a partir de la concentración conocida de 6 estándares con absorbancias leídas a 450 nm.

### 6.13 Determinación de la Inmunoglobulina A (IgA) mediante el método de ELISA

Se determinó la Inmunoglobulina A en el plasma recolectado de acuerdo con el punto 6.9. Se utilizó el kit ELISA (RAT-IgA Uncoated, kit-88-50480; Invitrogen). De acuerdo con las instrucciones del fabricante se prepararon todos los reactivos, muestras y estándares. A partir de la solución estándar, se obtuvieron los siguientes estándares para formar la curva de calibración, como se muestra a continuación en la figura 22:

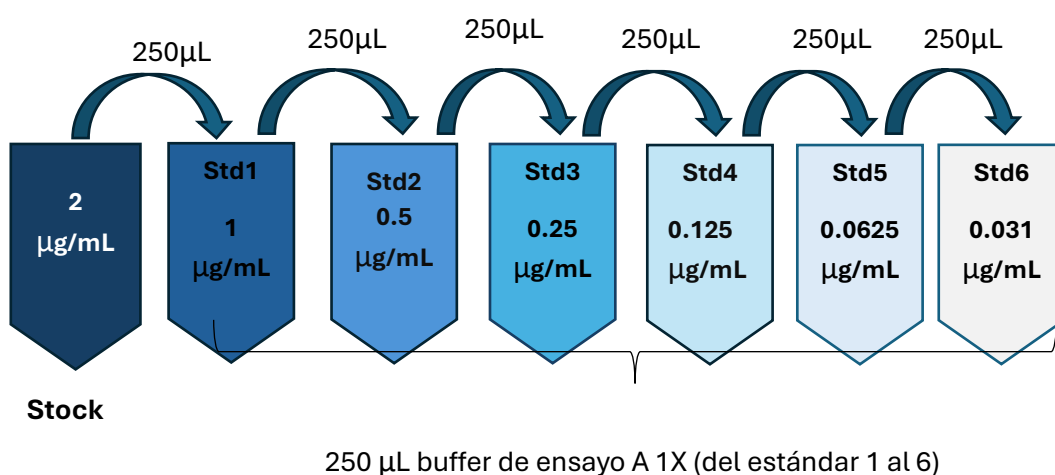


Figura 22. Preparación de estándares para la determinación de IgA a partir de una solución stock (2 µg/mL).

Las muestras fueron diluidas 1:500 con buffer de ensayo A 1X. Los pasos por seguir fueron los siguientes:

**Primer día:** En una placa ELISA de 96 pocillos se colocaron 100 µL en cada pozo de anticuerpo de captura diluido en buffer de recubrimiento, dil. 1:250. Sellamos la placa y se incubó toda la noche a 4°C.

#### Segundo día:

1. Bloqueo de los pozos con 250 µL de buffer de bloqueo 2X – incubación de 2 horas.
2. 100 µL de blanco, estándares y muestras a los pocillos correspondientes (por duplicado) – incubación de 2 horas.

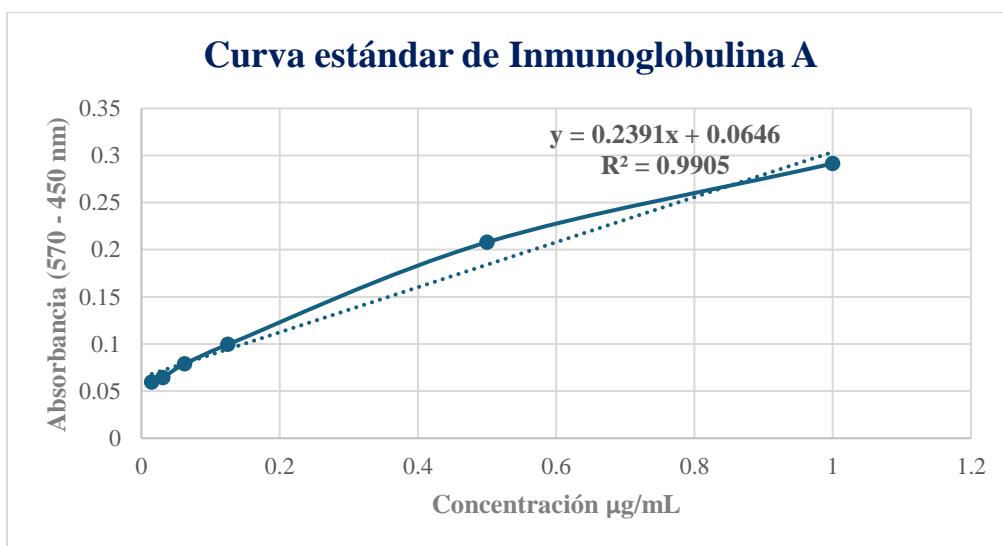
3. 100µL de anticuerpo de detección diluido 1:250 a todos los pozos – incubación de 1 hora.
4. 100 µL/pozo de solución de sustrato – incubación de 30 minutos en la oscuridad.
5. 100 µL de solución de paro a cada pozo.

**Nota:** todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente.

Se realizó la lectura inmediatamente a 570 y 450 nm en un lector de microplacas Accuris SmartReader 96 (modelo MR9600). Se realizó la sustracción de longitud de onda, restando los valores de 570 nm a los de 450 nm y se analizaron los datos.

De acuerdo con los datos obtenidos y el método de regresión lineal, se construyó la curva de calibración y se obtuvo la ecuación de la recta para calcular las concentraciones de las muestras. Se obtuvo una  $R^2 = 0.9905$  (figura 23).

CONCENTRACION µg/mL	ABSORBANCIA (570 - 450 nm)
0.015	0.0595
0.031	0.0645
0.0625	0.0745
0.125	0.0995
0.5	0.2080
1	0.2915



**Figura 23.** Curva estándar para la determinación de Inmunoglobulina mediante el método de ELISA. Curva construida a partir de la concentración conocida de 7 estándares con absorbancias leídas a 450 nm y 570 nm.

### ***6.14 Pruebas metabólicas en plasma***

Para conocer el estado metabólico de los sujetos de estudio se evaluaron los niveles de: Glucosa, colesterol total, triglicéridos, aspartato aminotransferasa (AST), albúmina, creatinina, proteína sérica, globulinas, ácido úrico, urea y nitrógeno ureico en el plasma sanguíneo recolectado de acuerdo con el punto **6.9**. Estas pruebas se realizaron en un equipo de química húmeda el cual comprende metodologías de colorimetría y turbidimetría.

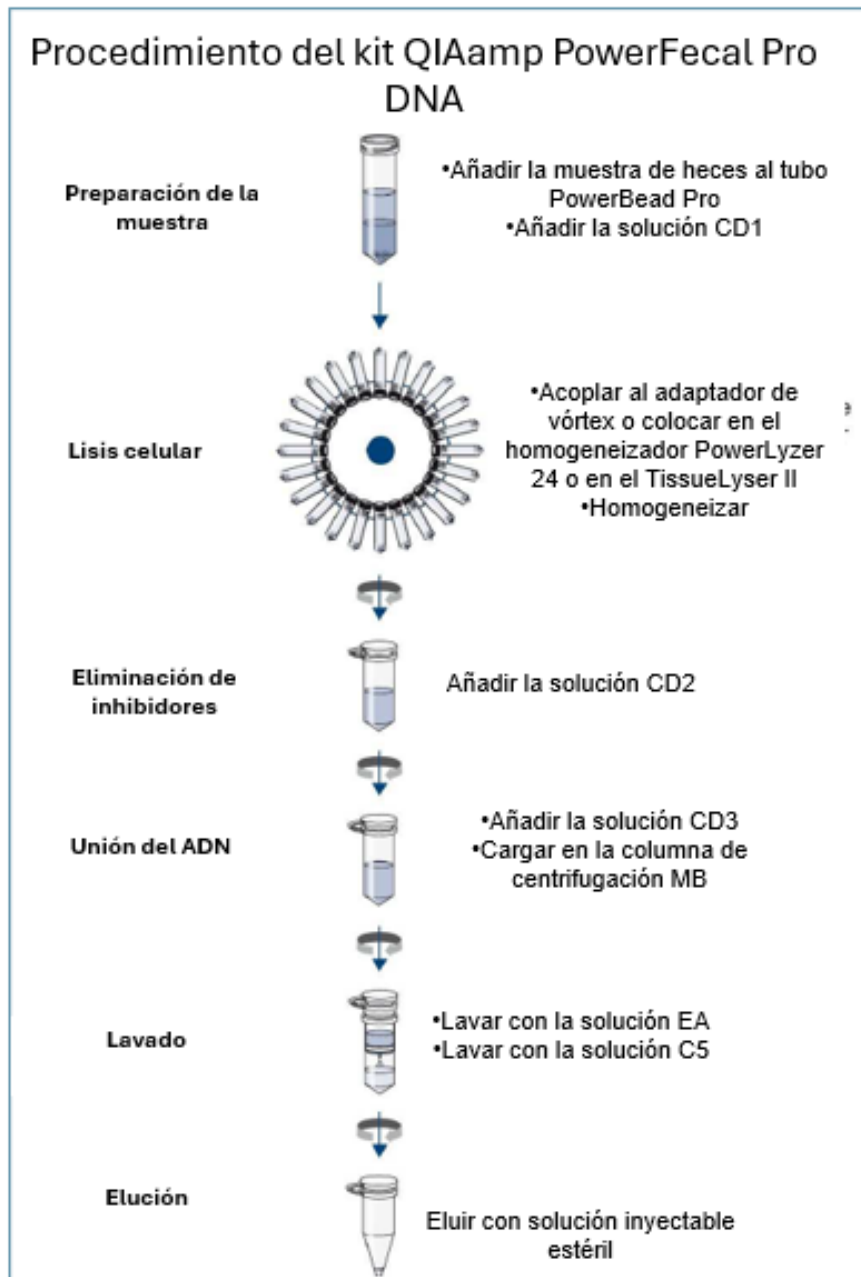
### ***6.15 Extracción de ADN, análisis de calidad - concentración e integridad para el análisis del microbioma fecal***

#### **Extracción de ADN**

Para la obtención de ADN fecal se empleó el kit QIAamp PowerFecal Pro-DNA. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se emplearon entre 200 y 250 mg de muestra fecal por cada animal, que se colocaron en un tubo PowerBead Pro (tubo con cuentas para el lisado de la muestra), posterior a ellos se realizaron una serie de pasos de centrifugación y lavado, así como la elución en solución inyectable estéril para la obtención final de ADN purificado como se muestra en la figura 24.

#### **Análisis de calidad - concentración**

Para estas determinaciones se usó el equipo NanoDrop One; Termo Fisher, en el cual se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de ADN purificado en el pedestal del equipo. Con el fin de garantizar la calidad del ADN obtenido en el paso anterior, se verificó la relación A260/A280 considerando un ADN de pureza óptima con un valor entre 1.8 y 2.0 y la relación A260/A230 considerando un ADN de pureza óptima con un valor entre 2.0 y 2.2. Las concentraciones de ADN obtenido oscilaron entre 250 y 700  $\text{ng}/\mu\text{L}$  por cada muestra.

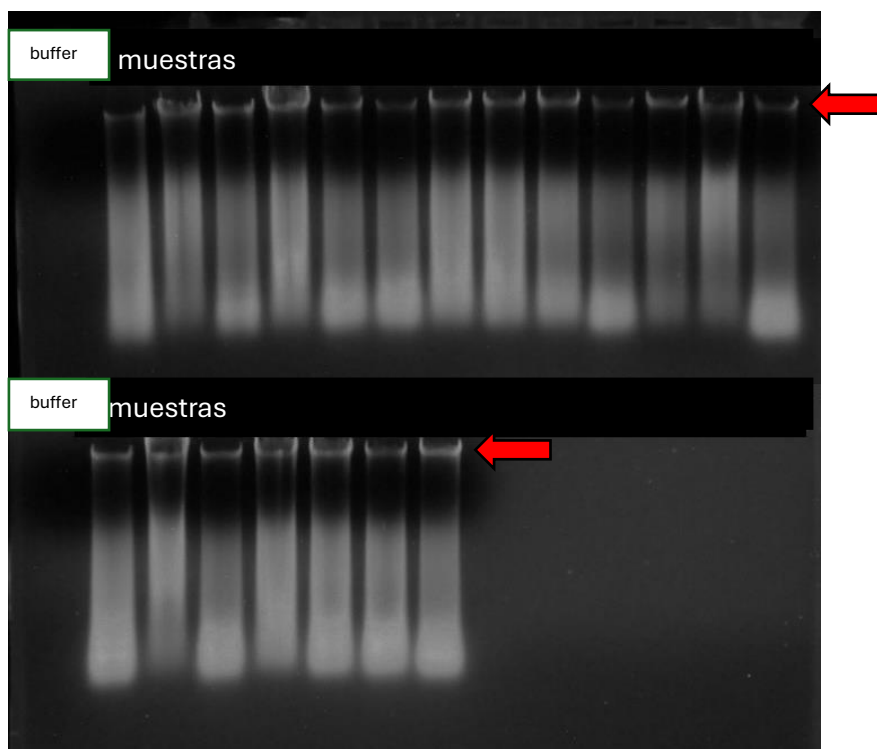



**Figura 24.** Esquema de trabajo para la obtención de ADN fecal de acuerdo con el kit QIAamp PowerFecal Pro-DNA.

### **Integridad del ADN**

Para verificar la integridad del ADN obtenido, se sometieron 400 ng de muestra a electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Las condiciones de corrida fueron: corriente de 80 voltios, 400 miliamperios (mA), tiempo: 1 hora y como buffer de corrida se empleó TAE 1X. En el primer carril de carga se añadió buffer de carga 6X y

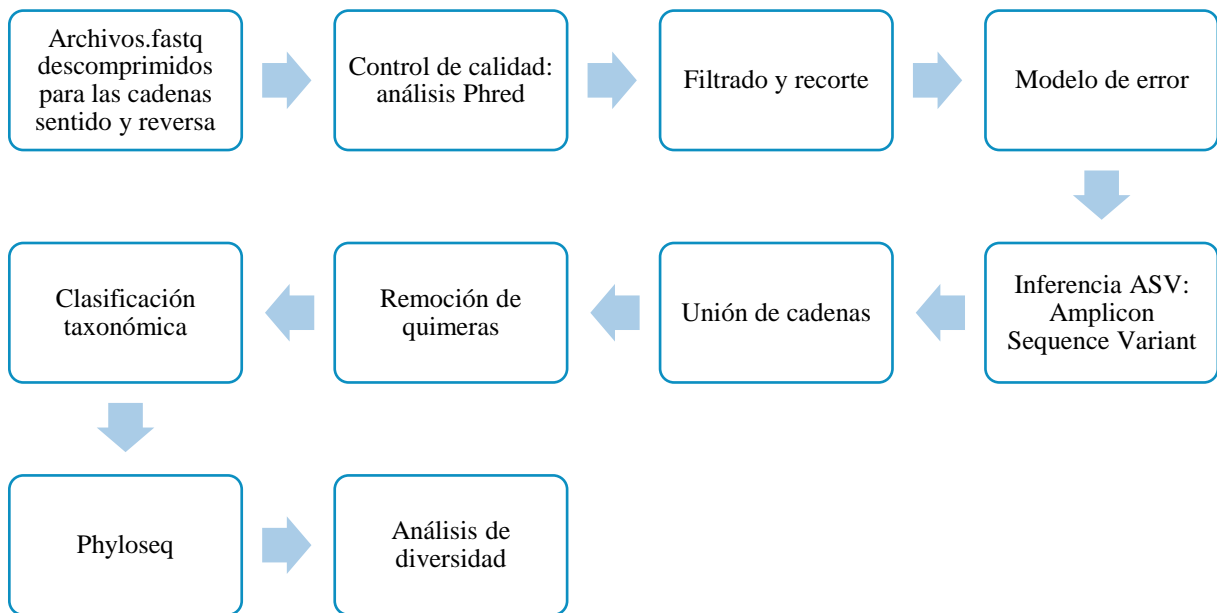
posteriormente se añadieron las muestras con buffer de carga en proporción 1:1, cargando un volumen total de 10 $\mu$ L por pocillo. Por último, se tomaron fotos en un transiluminador, como se muestra a continuación en la figura 25:



**Figura 25. Gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del ADN.** En el primer carril se muestra el buffer de carga 6x y en el resto de los carriles las muestras de ADN fecal obtenidas. La flecha  señala las bandas de ADN

### ***6.16 Análisis del microbioma fecal***

Una vez concluido el paso anterior **6.15**, las muestras de ADN fueron enviadas a un proceso de secuenciación en LabSerGen (Laboratorio de Servicios Genómicos UGA-LANGEBIO), en el cual se realizó la amplificación de la Región 16S y sus respectivas bibliotecas etiquetadas a partir de 20 muestras de ADN y la secuenciación 2x300 en el equipo MiSeq de Illumina para generar 100,000 Reads PE por muestra. De acuerdo con el proceso Metagenomics 16S de Illumina se obtuvieron los archivos.fastq comprimidos para los análisis posteriores con DADA2 y RSTUDIO, como se esquematiza a continuación:



**Figura 26. Secuencia de pasos a seguir para obtener el análisis de diversidad filogenética.**

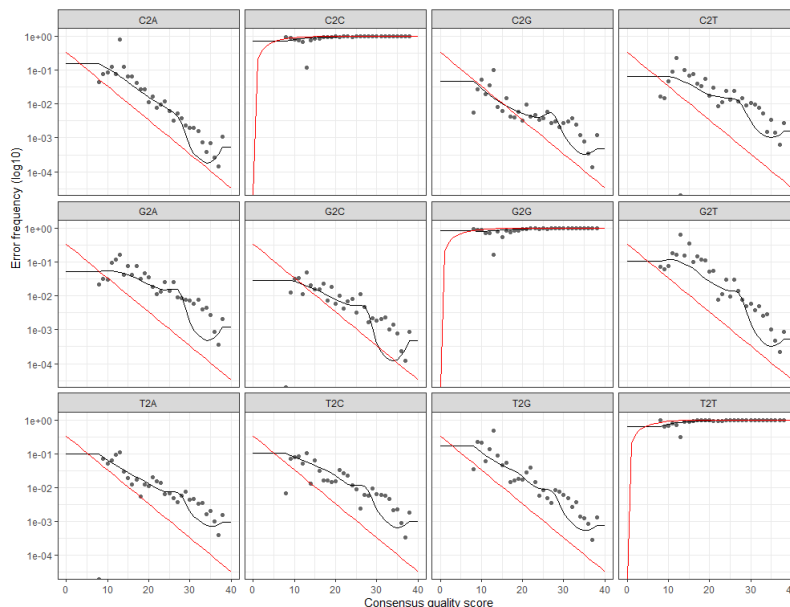
**Control de calidad (análisis Phred):** El puntaje de calidad de Phred, o puntaje  $q$ , es una medida de calidad de la secuenciación que estima la probabilidad de que una base haya sido llamada incorrectamente, dada en una escala logarítmica negativa ( $Q = -\log_{10}P(\text{incorrecto})$ ) de modo que un puntaje  $q$  más alto indica una llamada de base más segura. Un score de **30** significa que la probabilidad de error es **1 en 1000** ( $P=0.001$ ). En la figura 27 se muestra como Quality Score y los valores van de 0 a 40 (Hawkins & Yu, 2018).

**Filtrado y recorte:** Con base en la calidad Phred, se determina en que número de ciclos se corta la lectura (Cycle que va de 0 a 300). En este caso consideramos un valor de Phred idóneo a partir de 30 y realizamos el filtrado y recorte en el ciclo 200, dado que en los siguientes ciclos la calidad disminuye.



**Figura 27. Ejemplos de valores Phred de algunas muestras.** Se muestra que en el ciclo 200 la calidad Phred empieza a disminuir.

**Modelo de error:** Se refiere a la forma en que se representan y estudian los errores en las secuencias de ADN obtenidas mediante secuenciación de alto rendimiento. Las gráficas representan la tasa de error, lo ideal es que las tasas disminuyan conforme hay un desplazamiento a la derecha, aunque también un comportamiento como C2C y T2T es válido, como se muestra en los datos que hemos obtenido en la figura 28.



**Figura 28. Los puntos negros son las tasas de error observadas para cada puntuación de calidad consenso.**

**Inferencia ASV:** Proceso donde se identifican y cuantifican variantes exactas de secuencia en lugar de agruparlas en unidades operacionales taxonómicas (OTUs). Esto permite una mayor precisión en la clasificación de especies microbianas a partir de datos de secuenciación de ADN.

**Unión de cadenas:** En este paso se une la información obtenida tanto de la cadena sentido, como la cadena reversa.

**Remoción de quimeras:** Durante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (Pcr), pueden surgir fragmentos de ADN que se combinen erróneamente entre sí, por ello mediante DADA2 podemos eliminar estas secuencias.

**Clasificación taxonómica:** El paquete DADA2 proporciona una implementación nativa del método clasificador bayesiano ingenuo para este propósito. La función `assignTaxonomy` toma como entrada un conjunto de secuencias a clasificar y un conjunto de secuencias de referencia entrenadas con taxonomía conocida, y genera asignaciones taxonómicas con al menos la confianza de arranque de una opción llamada `minBoot`. Para este paso usamos la base de datos Silva para hacer la asignación taxonómica de nuestras muestras en los órdenes de reino, filo, clase, orden, familia y género, cuando en la lista .csv aparece NA significa que no se pudo asignar.

**Phyloseq:** Es una herramienta para importar, almacenar, analizar y mostrar gráficamente datos de secuenciación filogenética complejos que ya se han agrupado en Unidades operacionales taxonómicas (OTUs), especialmente cuando hay datos de muestra asociados, un árbol filogenético y/o una asignación taxonómica de las OTUs. Este paquete aprovecha muchas de las herramientas disponibles en R para el análisis filogenético y ecológico (`vegan`, `ade4`, `ape`, `picante`), al mismo tiempo que utiliza sistemas gráficos avanzados y flexibles (`ggplot2`) para producir fácilmente gráficos con calidad de publicación de datos filogenéticos complejos. Phyloseq utiliza un sistema especializado de clases S4 para almacenar todos los datos de secuenciación filogenética relacionados como un único objeto a nivel de experimento, lo que facilita compartir datos y reproducir análisis. En general, phyloseq busca facilitar el uso de R para un análisis interactivo y reproducible eficiente de datos de secuenciación filogenética de alto rendimiento agrupados en OTU.

**Análisis de diversidad:** Una vez que hemos obtenido las tablas generadas con Phyloseq, podemos generar gráficos mediante la función: `plot_bar` para los órdenes de reino, filo, clase, orden, familia y género, de esta manera podemos observar la abundancia de cada filo, etc. En cada una de las muestras. Además, obtenemos las medidas de alfa-diversidad de cada una de las muestras.

### *6.16.1 Análisis de alfa diversidad*

Los índices de diversidad son considerados como medidas de la varianza de la distribución de la abundancia de especies.

#### *Índice de Shannon*

Uno de los índices más utilizados para cuantificar la biodiversidad específica es el de Shannon, también conocido como Shannon-Wiener. El índice refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa. Conceptualmente es una medida del grado de incertidumbre asociada a la selección aleatoria de un individuo en la comunidad. Esto es, si una comunidad de  $S$  especies es muy homogénea, por ejemplo, porque existe una especie claramente dominante y las restantes  $S-1$  especies apenas presentes, el grado de incertidumbre será más bajo que si todas las  $S$  especies fueran igualmente abundantes. O sea, al tomar al azar un individuo, en el primer caso tendremos un grado de certeza mayor (menos incertidumbre, producto de una menor entropía) que en el segundo; porque mientras en el primer caso la probabilidad de que pertenezca a la especie dominante será cercana a 1, mayor que para cualquier otra especie, en el segundo la probabilidad será la misma para cualquier especie (Reyes et al., 2022)

El índice de Shannon se define como:

$$H' = - \sum_{i=1}^s P_i \ln (P_i)$$

Donde:  $S$ = Número de especies,  $P_i$ = Proporción de individuos de la especie  $i$  y  $H'$  mayor valor de  $H'$  mayor diversidad de especies.

### ***Índice alfa de Fisher ( $\alpha$ )***

Es un modelo de abundancia que se desprende de una serie logarítmica y emplea sólo el número de especies ( $S$ ) y el número total de individuos (Fisher et al., 1943; J. Li & Tseng, 2011)

Su cálculo se realiza mediante iteraciones con la ecuación:

$$S = \alpha \ln [1 + (N / \alpha)]$$

Donde:  $S$  = número de especies en la muestra y  $N$  = número de individuos en la muestra

#### **¿Qué representa $\alpha$ ?**

- **$\alpha$  (Fisher's alpha)** representa una medida de diversidad independiente del tamaño de la muestra (cuando el modelo logarítmico se ajusta bien).
- Cuanto mayor es  $\alpha$ , mayor es la diversidad.
- Es especialmente útil en comunidades con muchas especies raras, donde otros índices podrían subestimar la diversidad.

### ***6.17 Análisis estadístico***

Cada grupo experimental está conformado con una  $n$  experimental de ( $n= 5 - 8$ ). Para el análisis de resultados se realizaron pruebas estadísticas de los datos obtenidos en cada grupo, de acuerdo con el comportamiento de los datos se realizaron pruebas paramétricas (distribución normal) o pruebas no paramétricas (que no tienen una distribución particular). Los resultados obtenidos se analizaron con el programa de análisis estadístico GraphPad Prism 8.0. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Se seleccionó la prueba más eficiente para la comparación entre grupos, aplicándose ANOVA de una vía y ANOVA de dos vías de medidas repetidas, además se llevó a cabo una prueba post-hoc (post-Dunn o post-Tukey) según corresponda.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 El tratamiento agudo con probióticos no modifica la asimetría motora en un modelo de doble golpe en rata

Para evaluar la asimetría motora causada por la administración intraestriatal del LPS se empleó la prueba del cilindro. En la Figura 29A se muestra los resultados de la evaluación pre-lesión y se observó que los animales usan entre el 80 % al 100 % de ambas extremidades y entre 4 % al 11 % de las extremidades ipsilateral y contralateral, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales.

Los resultados de la evaluación a los 7 días post-lesión se muestran en la Figura 29B, en la gráfica se observa que el grupo Sham mostró un 87 % de uso de ambas extremidades, 5 % en la extremidad ipsilateral y 8 % en la extremidad contralateral. Mientras que el grupo Antibióticos-LPS presentó una disminución significativa en el uso de ambas extremidades de hasta un 28 % ( $p \leq 0.001$ ) y además un incremento significativo en el uso de la extremidad ipsilateral 35% ( $p \leq 0.001$ ) con respecto al grupo Sham. Por otra parte, los grupos Antibióticos-LPS-vehículo (22% de disminución uso de ambas extremidades) y Antibióticos-LPS-Probióticos (22% de disminución de uso de ambas extremidades), no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo Antibióticos-LPS en el porcentaje de uso de ambas extremidades.

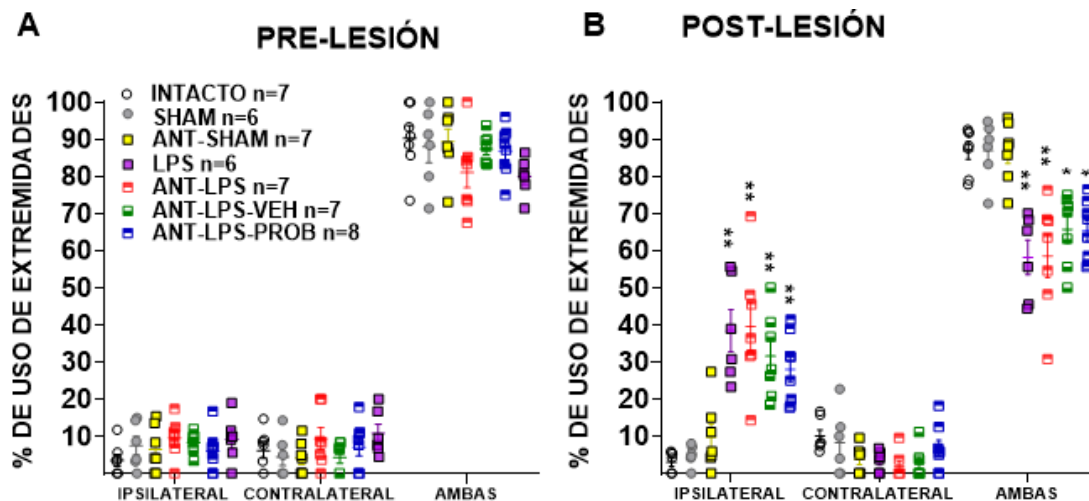


Figura 29. El tratamiento agudo con probióticos no reduce la asimetría motora en un modelo de doble golpe en rata. A) Se cuantificó el porcentaje de uso de las extremidades ipsilateral, contralateral y ambas en los sujetos de estudio 14 días pre-lesión. Los resultados indican que los animales son simétricos en la exploración. B) Se cuantificó el porcentaje de uso de las extremidades ipsilateral, contralateral y ambas en los

sujetos de estudio a los 7 días post-lesión. Los resultados indican que los animales se vuelven asimétricos posterior a la lesión con LPS y Ant-LPS. El tratamiento con probióticos no modificó la asimetría motora. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas y una post-Tukey ( $*p \leq 0.001$ ,  $**p \leq 0.0001$  vs Sham).

## 7.2 El modelo de doble golpe no afecta la coordinación motora

La coordinación motora se evaluó utilizando la prueba del rotarod, para ello los animales fueron sometidos a un entrenamiento durante dos días (13 y 12 días pre-lesión).

En la Figura 30A se muestran los resultados de la evaluación pre-lesión, se registró el tiempo (s) de latencia a la primera caída; se observó que los animales permanecen sobre el rodillo giratorio entre 127 y 266 segundos antes de que cayeran, lo que indica que los animales fueron capaces de ejecutar la prueba sin mostrar diferencia significativa entre los grupos. En la Figura 30B se muestran los resultados a los 8 días post-lesión, el grupo Sham mostró un tiempo de latencia de ( $\bar{x} = 134 \text{ s} \pm 14 \text{ s}$ ), el grupo LPS ( $\bar{x} = 147 \text{ s} \pm 17 \text{ s}$ ) y el grupo Antibióticos-LPS ( $\bar{x} = 142 \text{ s} \pm 17 \text{ s}$ ) por lo tanto, los grupos con lesión no muestran pérdida de la coordinación motora. Por otra parte, los grupos Antibióticos-LPS-vehículo ( $\bar{x} = 133 \text{ s} \pm 18 \text{ s}$ ) y Antibióticos-LPS-Probióticos ( $\bar{x} = 138 \text{ s} \pm 12 \text{ s}$ ) tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativamente con el modelo de doble golpe.

Los resultados indican que los animales a pesar de tener una lesión intraestriatal de forma unilateral, estos no presentan afectaciones en la coordinación motora al ejecutar esta prueba.

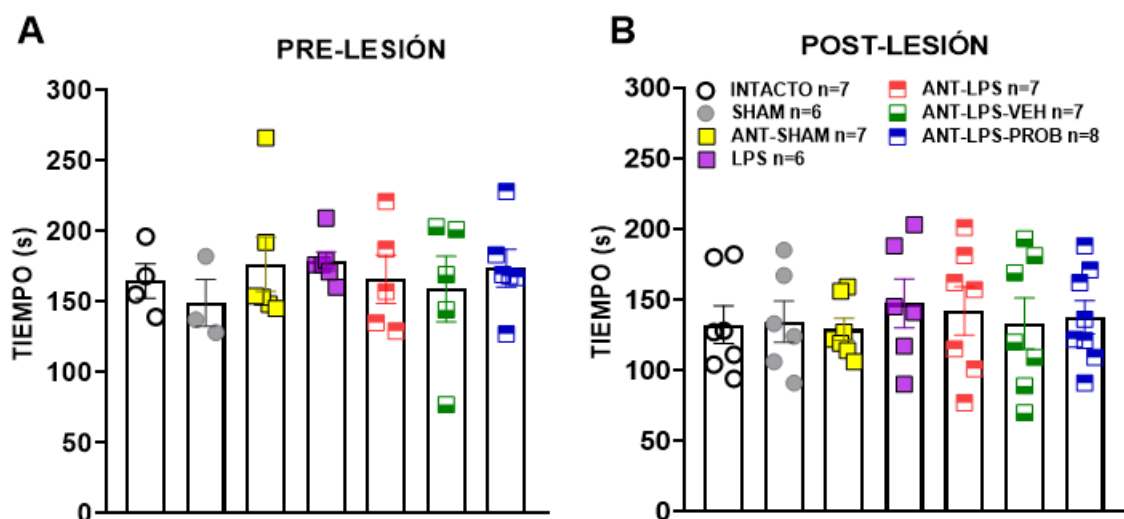


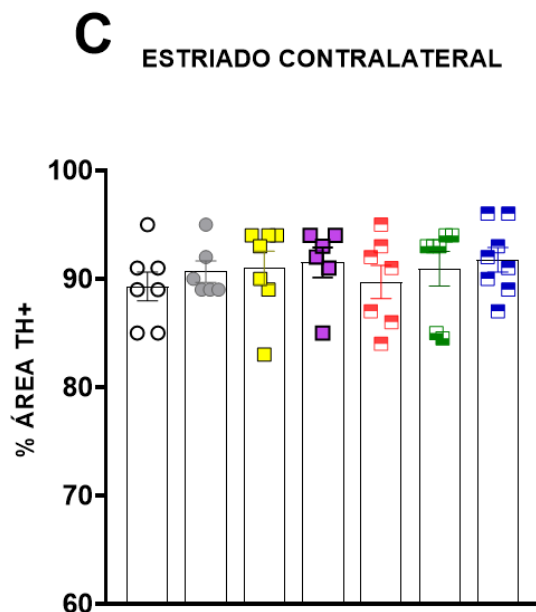
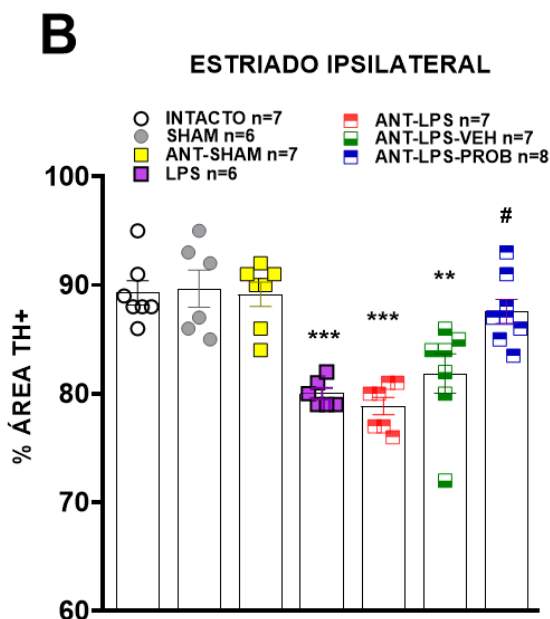
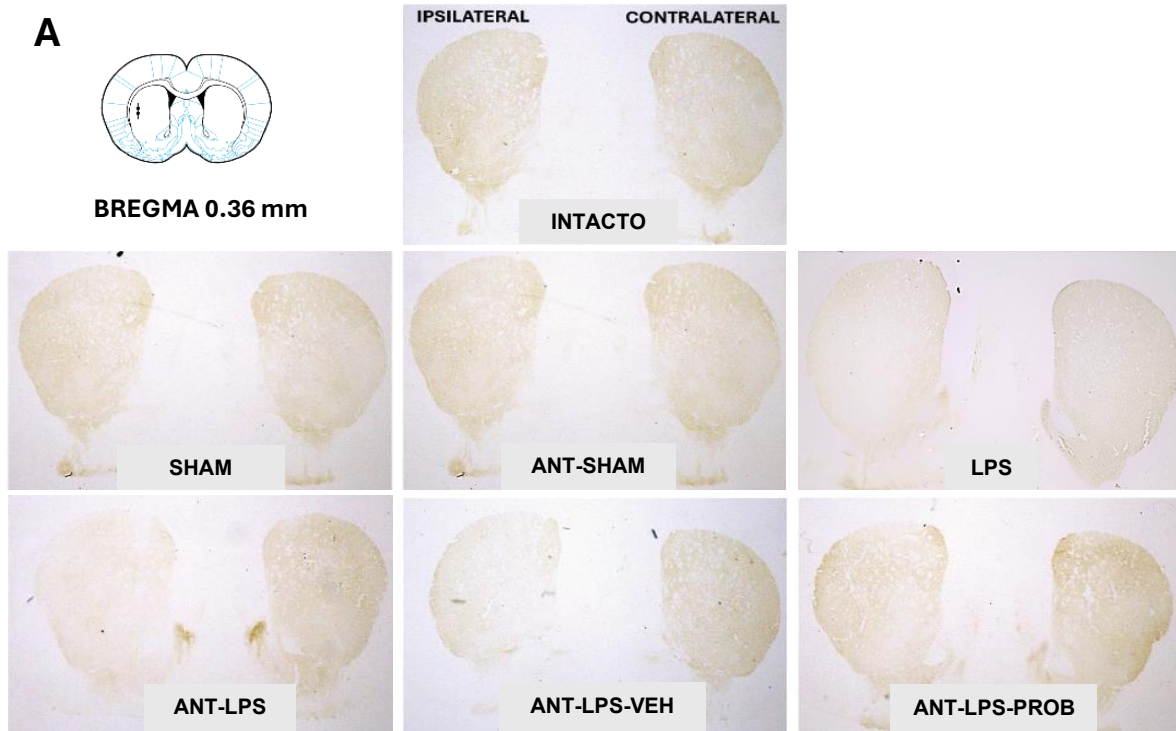
Figura 30. El modelo de doble golpe no afecta la coordinación motora. A) Se muestra la cuantificación del tiempo (s) de latencia a la caída del rodillo en la prueba pre-lesión del rotarod. B) Se muestra la cuantificación

del tiempo (s) de latencia a la caída del rodillo en la prueba del rotarod a los 8 días post-lesión. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey.

### ***7.3 El tratamiento agudo con probióticos previene la pérdida de la TH en el estriado en el modelo de doble golpe en ratas***

En la Figura 31A se muestra el panel de fotografías representativas de la inmunotinción para TH (IR-TH) en cortes coronales en la región del estriado. La cuantificación de la inmunorreactividad se muestra en la Figura 31B, se encontró que en el grupo Antibióticos-LPS ( $\bar{x}= 79 \% \pm 1 \%$ ) hay una disminución significativa del 11 % del área teñida para TH+ en el estriado ipsilateral respecto al grupo Sham ( $\bar{x}= 90 \% \pm 2 \%$ ) ( $p \leq 0.0001$ ). Por otra parte, el grupo Antibióticos-LPS-Probióticos ( $\bar{x}= 88 \% \pm 1 \%$ ) mostró un aumento del 8% en el porcentaje de área teñida para TH+ respecto al grupo Antibióticos-LPS, cambio que estadísticamente fue significativo ( $p \leq 0.001$ ).

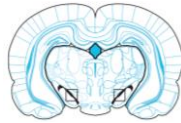
En la Figura 31C se muestra la cuantificación del área teñida para TH+ en el estriado contralateral, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos; Intacto ( $\bar{x}= 89 \% \pm 1 \%$ ), Sham ( $\bar{x}= 91 \% \pm 1 \%$ ), Antibióticos-Sham ( $\bar{x}= 91 \% \pm 1.5 \%$ ), Antibióticos- LPS ( $\bar{x}= 90\% \pm 1.5 \%$ ), Antibióticos-LPS-Vehículo ( $\bar{x}= 91 \% \pm 2 \%$ ) y Antibióticos-LPS-Probióticos ( $\bar{x}= 92 \% \pm 1 \%$ ).



**Figura 31. El tratamiento agudo con probióticos previene la pérdida de IR-TH en el estradiado ipsilateral en el modelo de doble golpe en ratas. A) Panel de fotografías representativas del estradiado con IR-TH. B) Se muestra la cuantificación del % área TH+ en el estradiado ipsilateral a 8 días post-lesión. C) Se muestra la cuantificación del % área TH+ en el estradiado contralateral a 8 días post-lesión. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey (\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\* $p \leq 0.0001$ , vs Sham, # $p \leq 0.001$  vs Ant-LPS).**

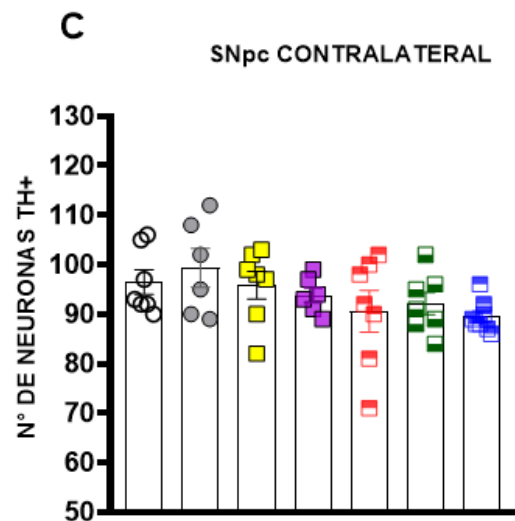
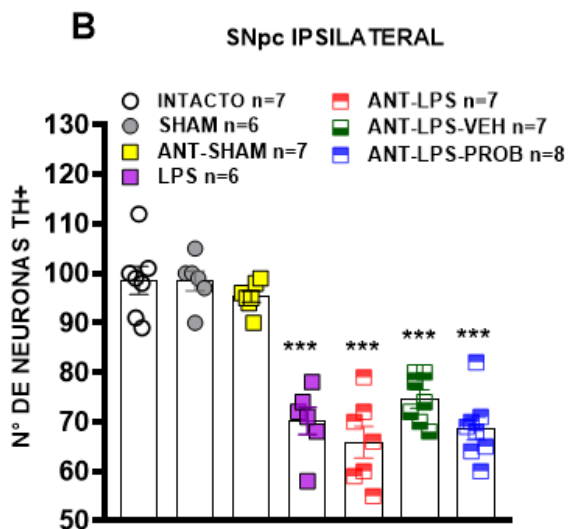
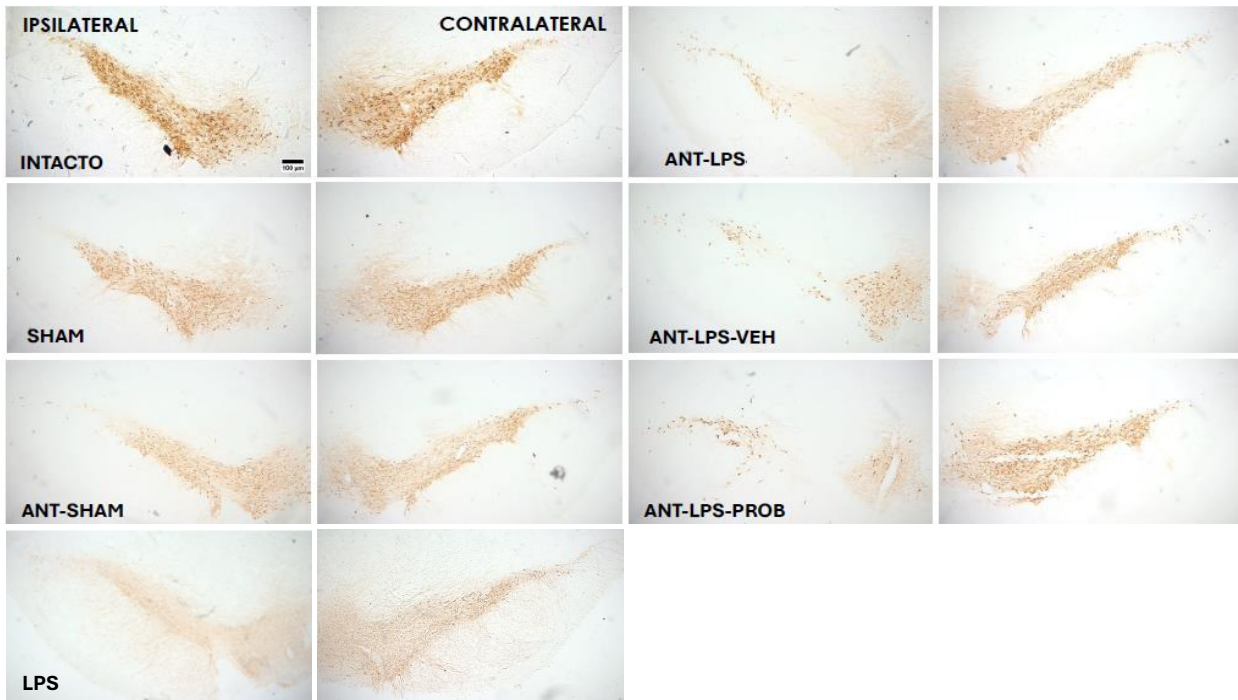
#### ***7.4 El tratamiento agudo con probióticos no previene la pérdida de neuronas TH+ en la SNpc ipsilateral en el modelo de doble golpe***

En la Figura 32A se muestra el panel de fotomicrografías de la inmunotinción para TH en la SNpc. En la Figura 32B se muestra la cuantificación de neuronas TH+ en la SNpc ipsilateral. Al respecto se encontró una disminución significativa de neuronas TH+ en el grupo Antibióticos-LPS ( $\bar{x}= 66 \pm 3$ ) y el grupo LPS ( $\bar{x}= 70 \pm 3$ ) respecto al grupo Sham ( $\bar{x}= 98.5 \pm 2$ ) ( $p \leq 0.001$ ). Por otra parte, los grupos Antibióticos-LPS-Vehículo ( $\bar{x}= 75 \pm 2$ ) y Antibióticos-LPS-Probióticos ( $\bar{x}= 69 \pm 2$ ) no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al modelo de doble golpe en el número de neuronas TH+. En la figura 32C se muestra la cuantificación de neuronas TH+ en la SNpc contralateral, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos; Intacto ( $\bar{x}= 96 \pm 2.5$ ), Sham ( $\bar{x}= 99 \pm 4$ ), Antibióticos-Sham ( $\bar{x}= 96 \pm 3$ ), LPS ( $\bar{x}= 94 \pm 1.5$ ), Antibióticos- LPS ( $\bar{x}= 91 \pm 4$ ), Antibióticos-LPS-Vehículo ( $\bar{x}= 92 \pm 2$ ) y Antibióticos-LPS-Probióticos ( $\bar{x}= 89.5 \pm 1$ ).



**A**

**BREGMA -5.04 mm**

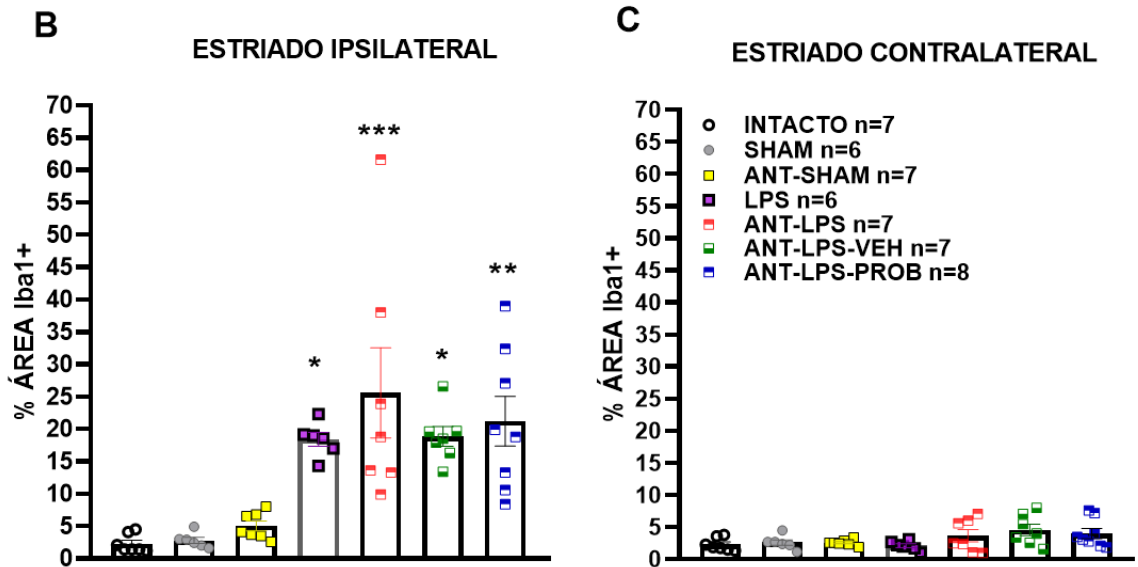
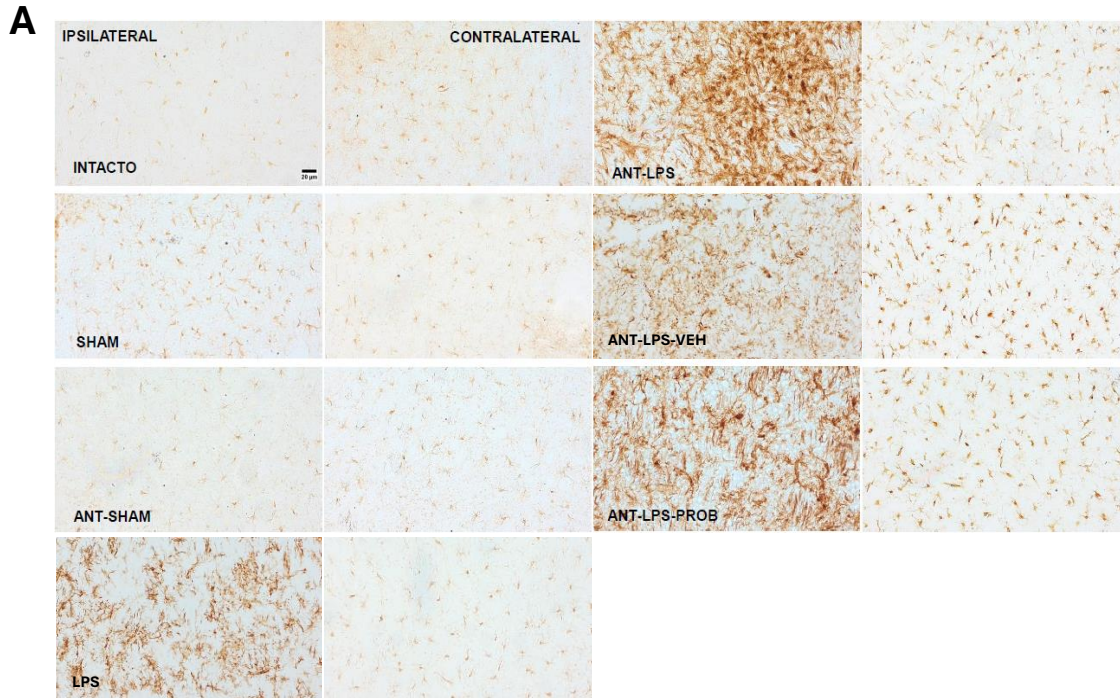


**Figura 32. El tratamiento agudo con probióticos no previene la pérdida de neuronas TH+ en la SNpc en el modelo de doble golpe. A)** Panel de fotomicrografías de la SNpc con IR-TH. La barra indica 100 µm. **B)** Se cuantificó el número de neuronas TH+ en la SNpc ipsilateral a los 8 días post-lesión. **C)** Se cuantificó el número de neuronas TH+ en la SNpc contralateral a los 8 días post-lesión. Cortes de cerebro por rata (n=2 a 4). Los valores se expresan como la media ± el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey (\*\*\*)  $p \leq 0.0001$  vs Sham).

## ***7.5 Los probióticos no disminuyen la activación de la microglía en el estriado dorsal en el modelo de doble golpe***

Para evaluar la microglía se empleó de microglía (Iba-1) para determinar el grado de activación de la microglía a los 8 días post-lesión a través de la inmunotinción en cortes coronales de cerebro en la región del estriado y se midió el porcentaje de área con inmunorreactividad a Iba1+. En la Figura 33A se muestra el panel de fotomicrografías representativas de la inmunotinción para Iba1+ en el estriado ipsilateral y contralateral. En la Figura 33B se muestra la cuantificación del estriado ipsilateral y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Antibióticos-LPS ( $\bar{x}= 26 \pm 7$ ) y su grupo control Sham ( $\bar{x}= 3 \pm 0.5$ ) ( $p \leq 0.001$ ), además el grupo LPS ( $\bar{x}= 18 \pm 1$ ) también mostró un aumento del área inmunorreactiva a Iba1+ ( $p \leq 0.05$ ). Por otra parte, en el grupo Antibióticos-LPS - Probióticos ( $\bar{x}= 21 \pm 4$ ) no se observa una disminución del % de área teñida para Iba1+ con respecto al grupo Antibióticos-LPS (Figura 33A y B).

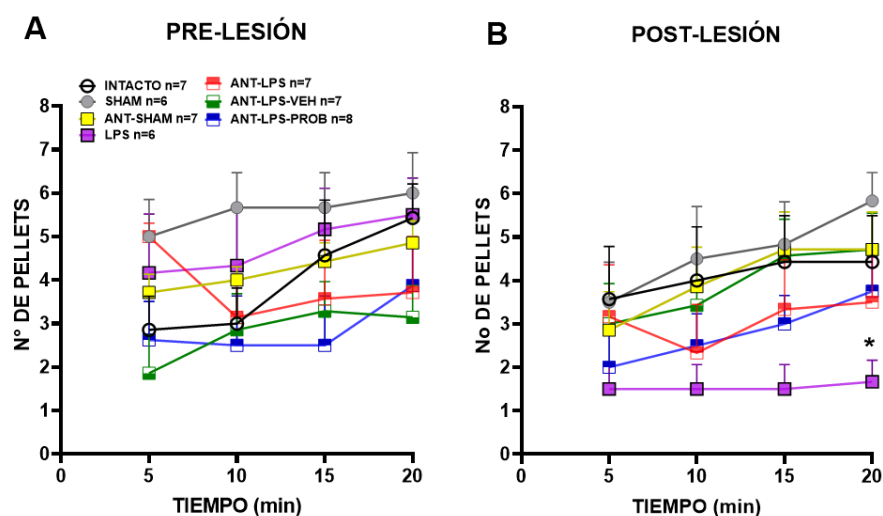
En la Figura 33C se muestra la cuantificación del % de área teñida para Iba-1+ en el estriado contralateral, en esta región no se observa una alta activación de células de la microglía y no existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales; Intacto ( $\bar{x}= 2 \pm 0.5$ ), Sham ( $\bar{x}= 3 \pm 0.5$ ), Antibióticos-Sham ( $\bar{x}= 3 \pm 0.5$ ), LPS ( $\bar{x}= 2 \pm 0.5$ ), Antibióticos- LPS ( $\bar{x}= 4 \pm 1$ ), Antibióticos-LPS-Vehículo ( $\bar{x}= 4 \pm 1$ ) y Antibióticos-LPS-Probióticos ( $\bar{x}= 5 \pm 1$ ).



**Figura 33. Los probióticos no disminuyen la activación de la microglía en el estriado dorsal en el modelo de doble golpe. A)** Panel de fotomicrografías representativas con IR-Iba1+ del estriado ipsilateral y contralateral a 8 días post-lesión. **B)** Se muestra la cuantificación del % de área Iba1+ en el estriado ipsilateral. **C)** Se muestra la cuantificación del % de área Iba1+ en el estriado contralateral a 8 días post-lesión. Cortes de cerebro por rata (n=2-4). Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$  vs Sham).

## 7.6 La administración de LPS intraestriatal altera la actividad intestinal a 7 días post-lesión

En esta prueba se cuantificó el número de pellets fecales acumulados en intervalos de 5 min en un tiempo total de 20 minutos. En la Figura 34A se muestra la evaluación pre-lesión, se registró que en el primer intervalo de 5 min el grupo Sham defecó ( $\bar{x}=5 \pm 1$ ) pellets y al finalizar la prueba un acumulado de ( $\bar{x}=6 \pm 1$ ) pellets. Mientras que el grupo Antibióticos-LPS defecó ( $\bar{x}=5 \pm 0.3$ ) pellets en el primer intervalo de 5 min y al finalizar la prueba un acumulado de ( $\bar{x}=4 \pm 1$ ). En la Figura 34B se muestra la segunda evaluación a los 7 días post-lesión. Encontramos a los 20 minutos que el grupo Antibióticos-LPS defecó ( $\bar{x}=3 \pm 1$ ) pellets y el grupo Sham defecó ( $\bar{x}=6 \pm 1$ ) pellets, sin ser estadísticamente significativos al ser comparados con su mismo grupo en la evaluación pre-lesión. El grupo Antibióticos-LPS-Probióticos defecó ( $\bar{x}=4 \pm 1$ ) pellets a los 20 min, mostrando un comportamiento similar al grupo Antibióticos-LPS. Por otra parte, el grupo Antibióticos-LPS-Vehículo mostró un acumulado de ( $\bar{x}=5 \pm 1$ ) pellets fecales a los 20 min de evaluación. Sorprendentemente el grupo de animales que solo recibió LPS, si modificó la actividad intestinal, puesto que defecaron un acumulado de ( $\bar{x}=2 \pm 0.5$ ) pellets con un valor de significancia de ( $p \leq 0.05$ ) respecto al grupo Sham.



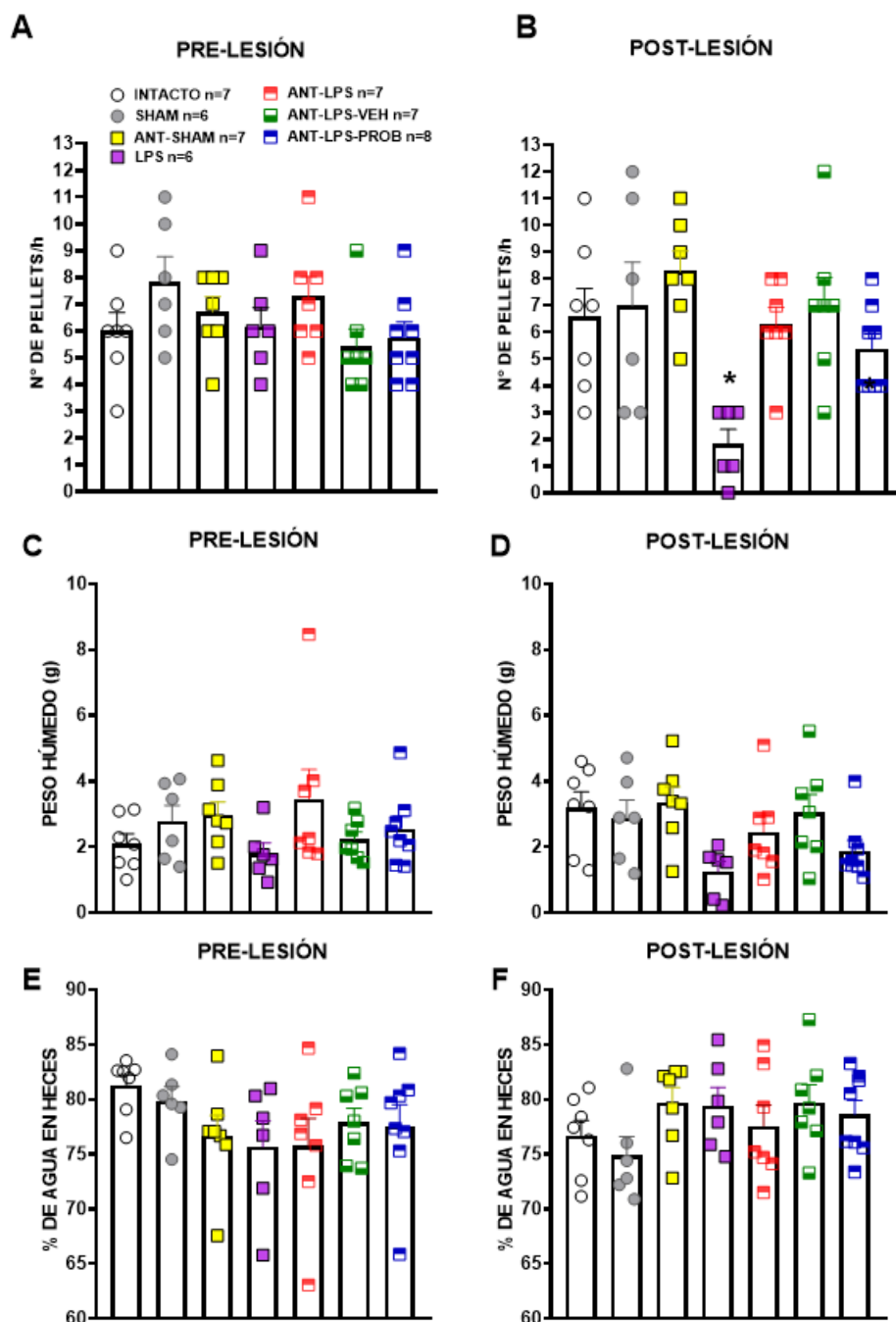
**Figura 34. El modelo de doble golpe no modifica la actividad intestinal.** A) Se cuantificó el número de pellets fecales acumulados en un tiempo total de 20 minutos, divididos en lapsos de 5 minutos a los 11 días pre-lesión. B) Se muestra los resultados de la prueba 7 días post-lesión, se cuantificó el número de pellets fecales acumulados en un tiempo total de 20 minutos divididos en lapsos de 5 minutos. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de dos vías y una post-Tukey ( $*p \leq 0.05$  vs Sham).

### ***7.7 El modelo de doble golpe no modifica la tasa de defecación, el peso húmedo y el porcentaje de agua en heces a 7 días post-lesión***

En esta prueba se cuantificó el número de pellets fecales acumulados en 1h durante la prueba de actividad intestinal. En la Figura 35A se muestra la evaluación pre-lesión, se observó que los animales defecaban entre 5 - 8 pellets/h ( $\bar{x}= 6 \pm 0.7$ ) y no se observaron diferencias significativas entre los grupos. En la Figura 35B se muestra la evaluación a los 7 días post-lesión, encontramos que la tasa de defecación en el grupo Antibióticos-LPS fue de (6 pellets/h) y en el grupo Sham fue de (7 pellets/h), al analizar estos datos no fueron significativamente diferentes. Sin embargo, el grupo LPS defecó (2 pellets/h) mostró una disminución respecto al grupo control Sham ( $p \leq 0.01$ ). Los grupos Antibióticos-LPS-Vehículo y Antibióticos-LPS-Probióticos tuvieron un comportamiento similar al grupo Antibióticos-LPS.

Dado que los pellets pueden variar de tamaño, se determinó su peso húmedo, en la Figura 35C se muestra el peso correspondiente a la evaluación pre-lesión y se encontró que pesaron entre (2 – 3.5 g), sin mostrar diferencias significativas entre los grupos. En la Figura 35D se muestran los resultados de la evaluación a los 7 días post-lesión, en donde encontramos que el peso húmedo de las heces en el grupo Antibióticos-LPS fue de ( $\bar{x}= 3.5 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$ ) y en el grupo Sham fue ( $\bar{x}= 3 \text{ g} \pm 0.5 \text{ g}$ ), sin ser estadísticamente diferentes. Por otra parte, el grupo de animales que solo recibió LPS tuvo un peso húmedo de sus heces de ( $\bar{x}= 1 \text{ g} \pm 0.2 \text{ g}$ ) con una diferencia significativa de ( $p \leq 0.05$ ) respecto al grupo Sham. Los grupos Antibióticos-LPS-Vehículo y Antibióticos-LPS-Probióticos tuvieron un comportamiento similar al grupo Antibióticos-LPS.

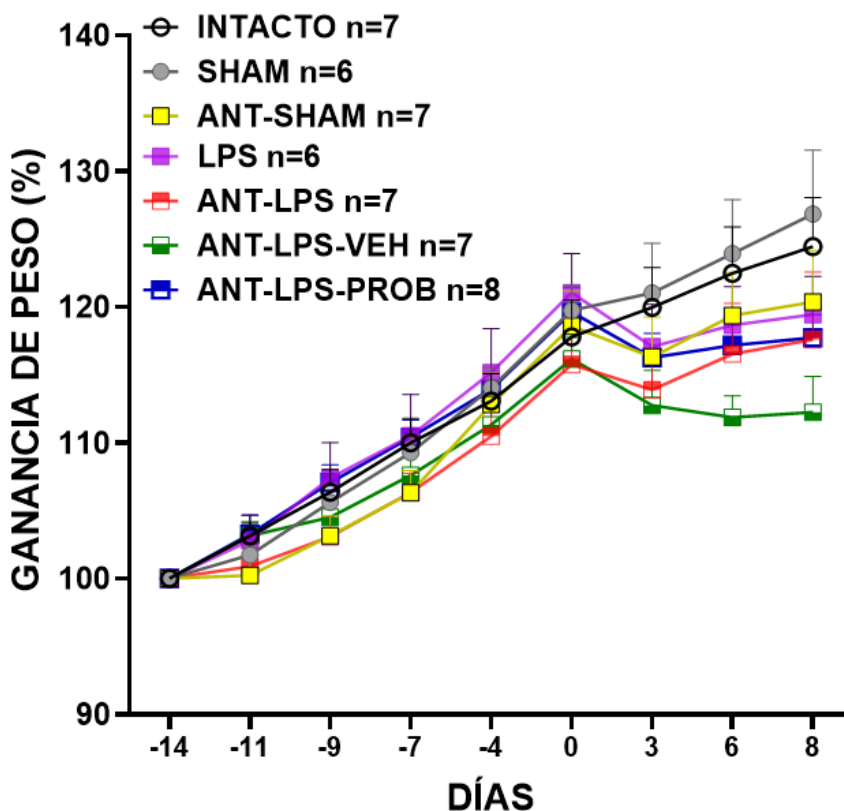
En la Figura 35E se muestra los resultados de la evaluación pre-lesión, se observó que los animales tenían un porcentaje de agua en heces entre el 75 % y 82 % sin observarse diferencias significativas entre los grupos. En la Figura 35F se muestra la evaluación a los 7 días post-lesión, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Antibióticos-LPS 78 % y el grupo Sham 75 %, ni en el resto de los grupos experimentales.



**Figura 35. El modelo de doble golpe no modifica la tasa de defecación, el peso húmedo y el porcentaje de agua en heces posterior a 7 días.** **A)** Se registró el número total de pellets fecales en 1 h en los sujetos de estudio pre-lesión. **B)** Cuantificación de pellets fecales en 1 h a los 7 días post-lesión. **C)** Se registró el peso húmedo (g) de los pellets fecales recolectados en 1 h pre-lesión. **D)** Se registró el peso húmedo (g) de los pellets fecales recolectados en 1 h a los 7 días post-lesión. **E)** Se muestra el porcentaje de agua en heces recolectadas en 1 h pre-lesión. **F)** Se muestra el porcentaje de agua en heces recolectadas en 1 h a los 7 días post-lesión. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey. (\* $p \leq 0.01$  vs Sham).

## 7.8 El modelo de doble golpe no disminuyó la ganancia de peso en ratas

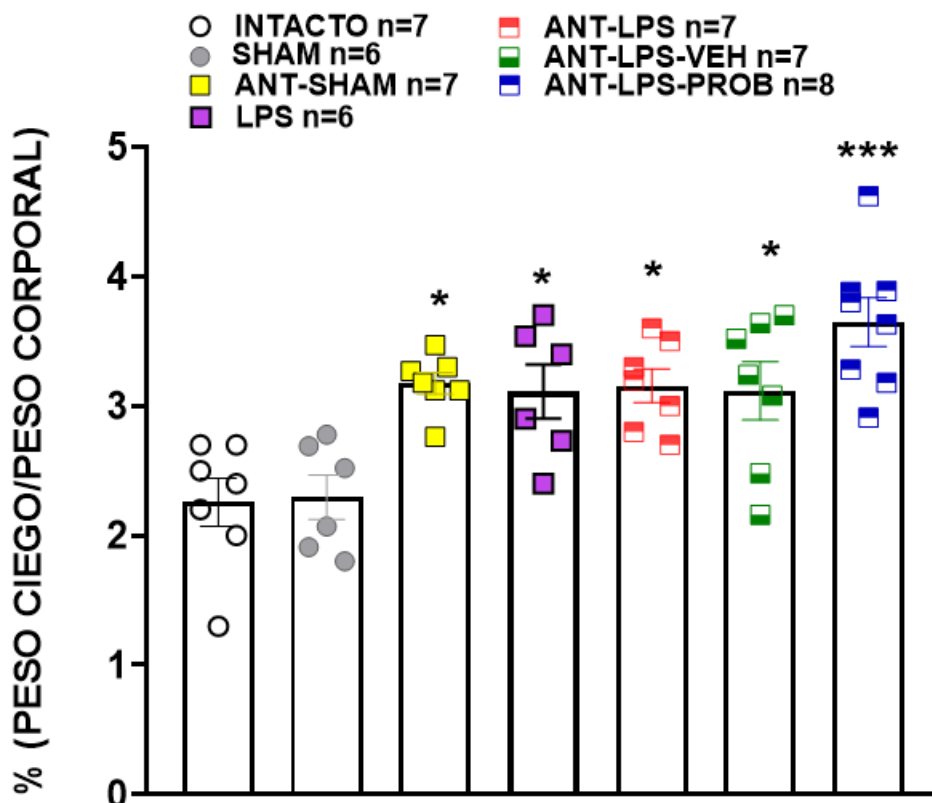
En la Figura 36 se muestra la ganancia de peso de los animales expresado en porcentaje, considerando su peso inicial en la evaluación como el 100%. Se evaluaron los días 14 pre-lesión (evaluación pre-lesión de pruebas motoras), días 9 y 4 pre-lesión (administración de antibióticos), día 7 pre-lesión, día 0 (cirugía-lesión intraestriatal con LPS), día 6 (post-lesión) y día 8 (eutanasia). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las ganancias de peso de los diferentes grupos en el transcurso del tiempo. Alcanzando una ganancia de peso (%) para el día de la eutanasia en el grupo Sham de ( $\bar{x}= 27 \% \pm 5 \%$ ) y el grupo Antibióticos-LPS de ( $\bar{x}= 18 \% \pm 5 \%$ ). De la misma manera no se observaron diferencias significativas entre el grupo Antibióticos-LPS y los grupos Antibióticos-LPS-Vehículo con ( $12 \% \pm 3 \% g$ ) y Antibióticos-LPS-Probióticos con ( $\bar{x}= 18 \% \pm 2 \%$ ).



**Figura 36.** El modelo de doble golpe no disminuyó la ganancia de peso en ratas. Registro de peso durante la fase experimental. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM), (n=48). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas y una post-Tukey.

## 7.9 El tratamiento agudo con probióticos no previene el aumento del peso del ciego en un modelo de doble golpe en ratas

A los 8 días post-lesión se realizó la eutanasia y se obtuvo el ciego de cada sujeto experimental y se pesó con su contenido fecal. En la Figura 37 se muestra el índice del peso del ciego (relación entre el peso del ciego/peso corporal x 100). En el grupo LPS el índice es de ( $\bar{x} = 3 \pm 0.2$ ), en el grupo Antibióticos-LPS corresponde a ( $\bar{x} = 3 \pm 0.2$ ) y en el grupo Antibióticos-Sham se encuentra en ( $\bar{x} = 3 \pm 0.1$ ), cuyos valores son significativamente diferentes al grupo Sham que tuvo un porcentaje de ( $\bar{x} = 2.3 \pm 0.2$ ) ( $p \leq 0.05$ ). Por otro lado, los grupos Antibióticos-LPS-Vehículo ( $\bar{x} = 3 \pm 0.2$ ) y Antibióticos-LPS-Probióticos ( $\bar{x} = 3.6 \pm 0.2$ ), ambos grupos no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los grupos LPS y Antibióticos-LPS, lo que indica que la administración de probióticos no disminuye el porcentaje de peso en el ciego.



**Figura 37.** El tratamiento agudo con probióticos no previene el aumento del peso del ciego en un modelo de doble golpe en ratas. Se muestra la relación del peso del ciego respecto al peso corporal expresado en porcentaje, a los 8 días post-lesión. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey (\* $p \leq 0.05$ , \*\*\* $p \leq 0.0001$  vs Sham).

### *7.10 El tratamiento agudo con probióticos disminuye el daño en la citoarquitectura del colon distal en un modelo de doble golpe en rata*

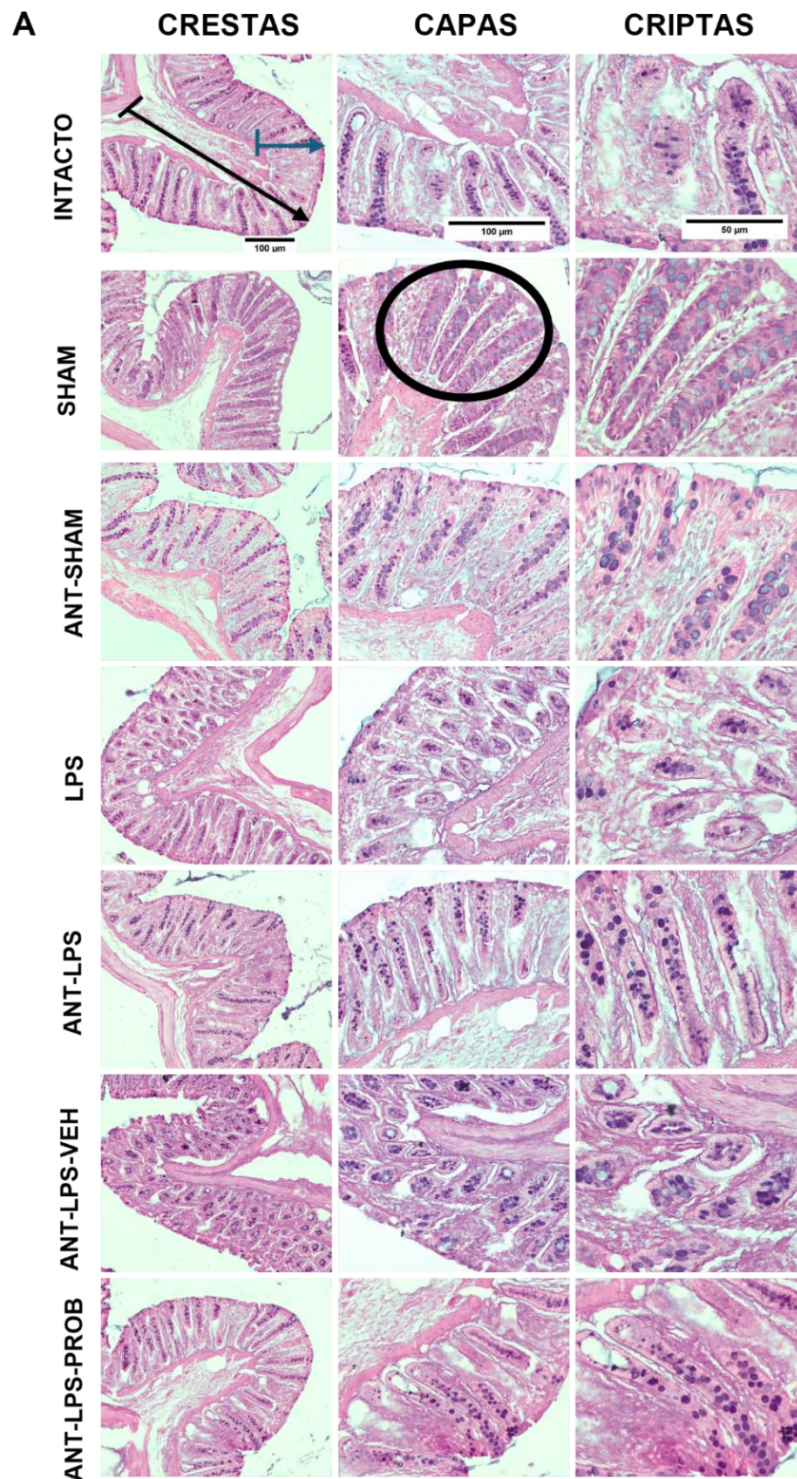
En la figura 38A se muestra el panel de fotomicrografías del colon distal con tinción de H&E, las imágenes fueron tomadas a distintos aumentos, como se indica en el pie de figura.

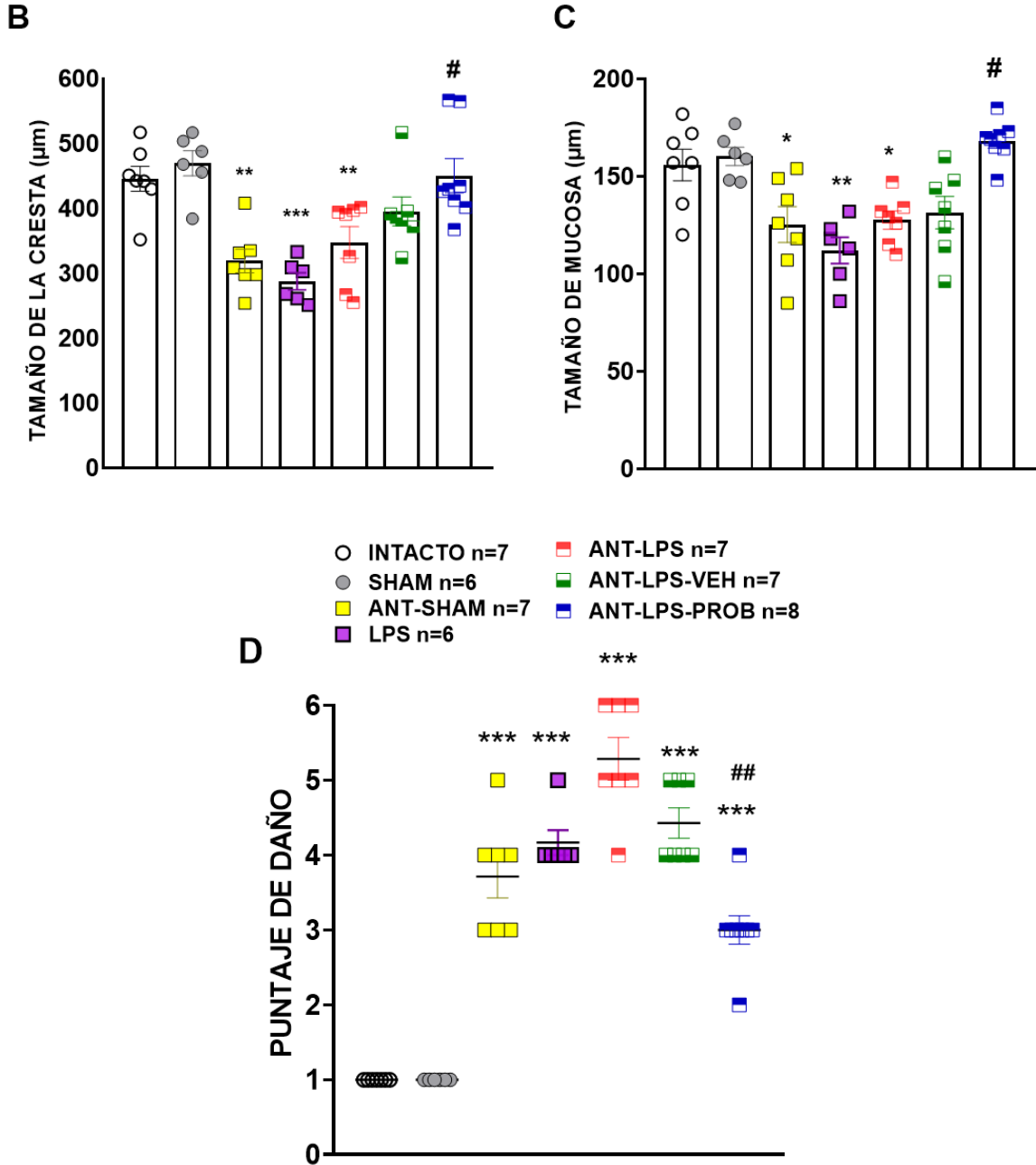
Para evaluar el daño en el colon distal se tomaron medidas de la capa mucosa y crestas, esto con el fin de tener un dato cuantitativo respecto al porcentaje de pérdida de estas estructuras. Medimos el tamaño en ( $\mu\text{m}$ ) de las crestas, en la figura 38B se observa que el grupo Sham tuvo una medida de ( $\bar{x}= 470 \pm 19$ ) y el grupo Antibióticos-LPS ( $\bar{x}= 347 \pm 24$ ), aunque se observó más reducción en el grupo LPS con una cuantificación de ( $287 \pm 13$ ). En esta evaluación, el grupo que recibió probióticos también mostró una disminución en el tamaño de la cresta, con valores de ( $\bar{x}= 450 \pm 26$ ) aunque con un impacto menor. Estos valores en efecto nos muestran que se perdió una porción de las crestas en el modelo de doble golpe.

Siguiendo con la cuantificación del daño tisular, evaluamos el tamaño de la capa mucosa ( $\mu\text{m}$ ) como se observa en la figura 38C, para el grupo Sham se obtuvo un valor de ( $\bar{x}= 160 \pm 5$ ) y para el grupo Antibióticos-LPS ( $\bar{x}= 127 \pm 5$ ), estos datos indican que se perdió al menos el 25% de la capa mucosa en el modelo de doble golpe; esta pérdida también se observó en los grupos LPS ( $\bar{x}= 112 \pm 7$ ), Antibióticos-Sham ( $\bar{x}= 125 \pm 9$ ) y Antibióticos-LPS-Vehículo ( $\bar{x}= 131 \pm 8$ ). Por otro lado, los animales que recibieron probióticos mostraron un tamaño de ( $\bar{x}= 168 \pm 4$ )  $\mu\text{m}$ , demostrando que los probióticos evitaron la pérdida de esta capa.

De acuerdo con los datos anteriores y con el resto de los criterios de daño; evaluación de la inflamación y extensión de daño en las criptas de Lieberkühn, se otorgaron diferentes puntajes de daño a los tejidos de colon distal en cada grupo experimental. Como podemos visualizar en la figura 38D, el grupo Antibióticos-LPS muestra el mayor puntaje de daño con un valor de ( $\bar{x}= 5.3 \pm 0.3$ ), mientras que el grupo control Sham muestra un valor de ( $\bar{x}= 1 \pm 0$ ). Además, podemos ver que los grupos LPS ( $\bar{x}= 4.2 \pm 0.2$ ), Antibióticos-Sham ( $\bar{x}= 3.7 \pm 0.3$ ) y Antibióticos-LPS-Vehículo ( $\bar{x}= 4.4 \pm 0.2$ ) también mostraron un daño significativo respecto al grupo control. Si bien notamos que el grupo Antibióticos-LPS-Probióticos ( $\bar{x}= 3 \pm 0.2$ ) también muestra un mayor puntaje de daño respecto al grupo Sham, también exhibe

una disminución respecto al modelo de doble golpe, por lo cual podemos atribuir que el tratamiento agudo con los probióticos disminuye el daño en la citoarquitectura del colon distal.





**Figura 38. El tratamiento agudo con probióticos disminuye el daño en la citoarquitectura del colon distal en un modelo de doble golpe en rata.** A) Panel de fotomicrografías representativas de cortes transversales del colon distal. De izquierda a derecha se muestran los cortes en los aumentos 10X, 20X y 40X respectivamente. Dentro del círculo negro se observan las criptas de Lieberkühn. La flecha  $\rightarrow$  señala la cresta y la flecha  $\rightarrow$  la capa mucosa. De izquierda a derecha, la barra indica 100  $\mu$ m, 100  $\mu$ m y 50  $\mu$ m respectivamente. B) Se muestra el tamaño de la cresta en  $\mu$ m. C) Se muestra el tamaño de la mucosa en  $\mu$ m. D) Se muestra el puntaje de daño de cada grupo experimental a los 8 días post-lesión. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey (\* $p \leq 0.01$ , \*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\* $p \leq 0.001$  vs Sham, # $p \leq 0.05$  ### $p \leq 0.001$  vs Ant-LPS).

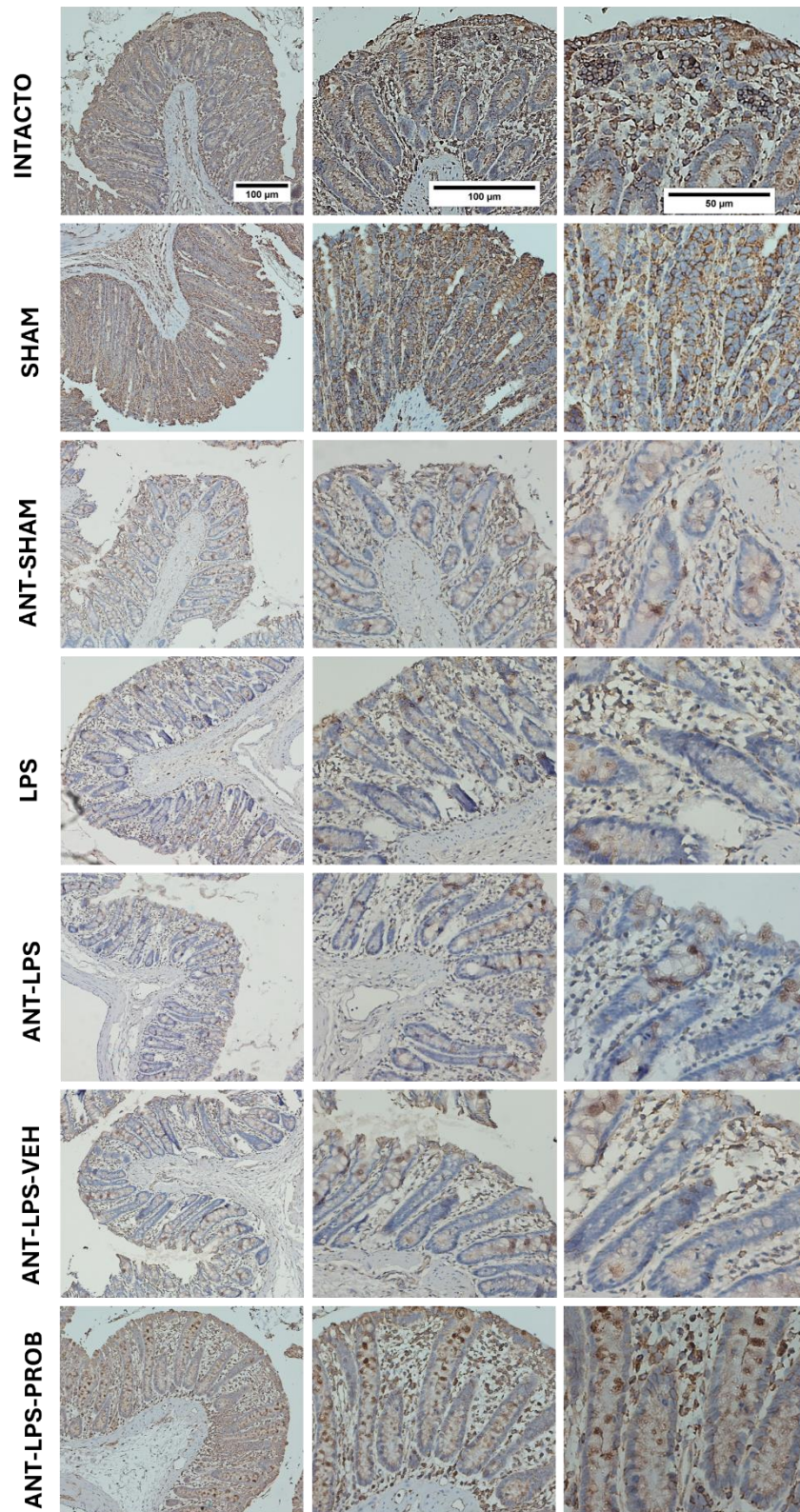
### ***7.10.1 El tratamiento agudo con probióticos disminuye la pérdida de la expresión de mucina-2 en el colon distal en un modelo de doble golpe en rata***

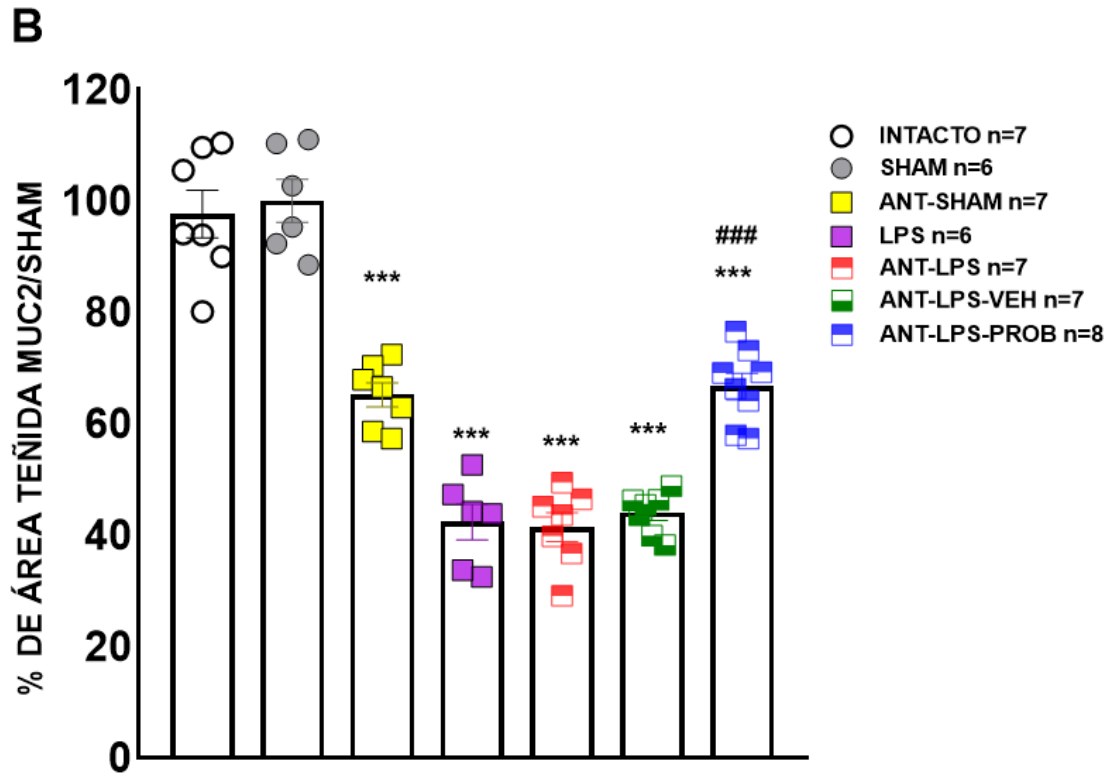
En la figura 39A se muestra el panel de fotomicrografías del colon distal con inmunohistoquímica para mucina-2 (MUC2) en color café y contra teñidas con tinción de hematoxilina y eosina, las imágenes fueron tomadas en tres aumentos, como se indica en el pie de figura. Para evaluar la expresión de MUC2, se realizó un análisis por densitometría y la presencia de esta glicoproteína se expresó en porcentaje de área teñida de MUC2 respecto al grupo Sham.

En la figura 39B se observa que el grupo Sham tuvo un porcentaje de área teñida de ( $\bar{x}$ = 100 %  $\pm$  4 %), mientras que el grupo Antibióticos-LPS obtuvo un porcentaje de ( $\bar{x}$ = 41 %  $\pm$  4 %). Por otra parte, también observamos una disminución en el grupo LPS ( $\bar{x}$ = 42 %  $\pm$  3 %), el cual es un valor similar al obtenido en el modelo de doble golpe.

El grupo que recibió probióticos mostró una recuperación en la expresión de MUC2, con valores de ( $\bar{x}$ = 67 %  $\pm$  2 %) en comparación al grupo Antibióticos-LPS ( $p \leq 0.0001$ ) Finalmente podemos concluir que los probióticos previenen la pérdida de MUC2 en colon distal.

**A**

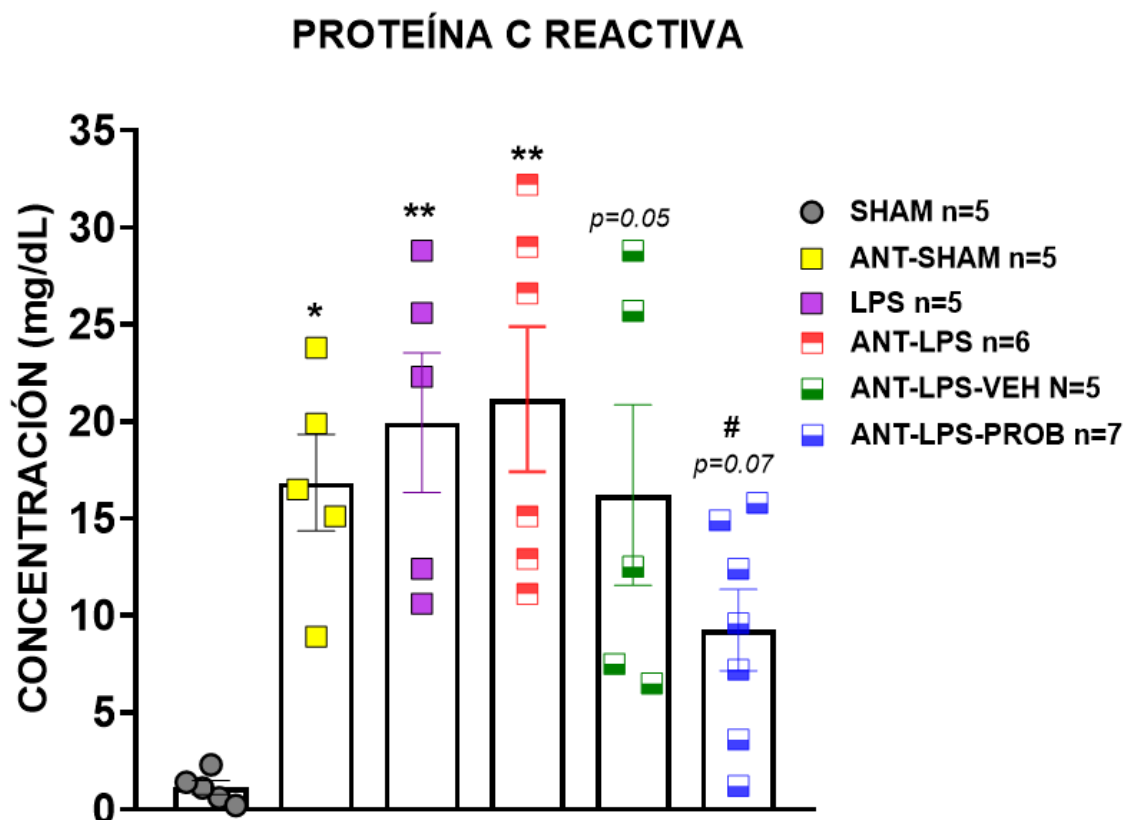




**Figura 39.** El tratamiento agudo con probióticos disminuye la pérdida de la expresión de mucina-2 en el colon distal en un modelo de doble golpe en rata. **A)** Panel de fotomicrografías representativas de cortes transversales del colon distal. De izquierda a derecha se muestran los cortes en los aumentos 10X, 20X y 40X, respectivamente. De izquierda a derecha, la barra indica 100  $\mu$ m, 100  $\mu$ m y 50  $\mu$ m, respectivamente. **B)** Se muestra el porcentaje de área teñida de MUC2 respecto a Sham. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey (\*\*\*)  $p \leq 0.0001$  vs Sham, ###  $p \leq 0.0001$  vs Ant-LPS).

### 7.11 El modelo de doble golpe incrementa la concentración de la proteína C reactiva en plasma

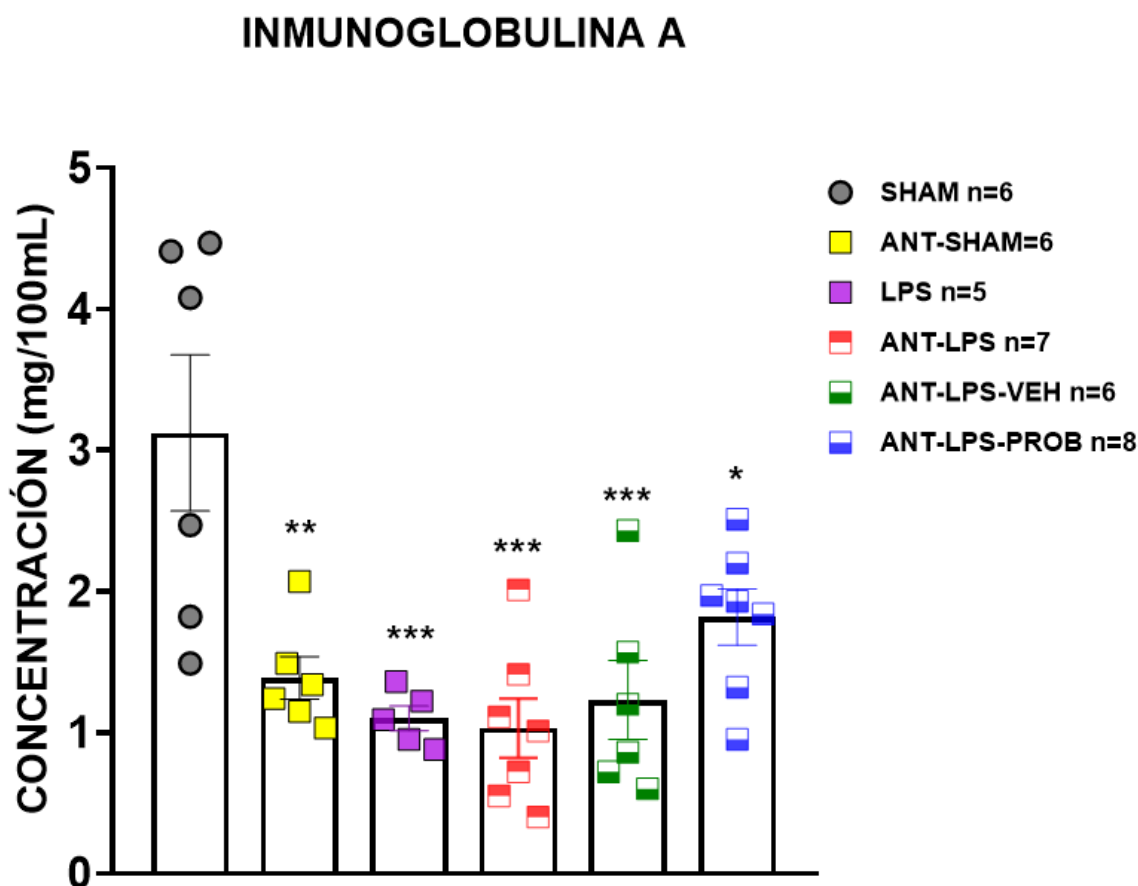
En la figura 40 se muestran los niveles de PCR en plasma a los 8 días post-lesión. Se calcularon los valores en mg/dL, el grupo Sham tuvo un valor de ( $\bar{x}= 1 \pm 0.5$ ), observando el mayor aumento en el grupo Antibióticos-LPS ( $\bar{x}= 21 \pm 4$ ). Aunque también el grupo LPS ( $\bar{x}= 20 \pm 4$ ) mostró un aumento significativo respecto al grupo control, esto nos muestra que el proceso inflamatorio sistémico sigue activo a los 8 días post-lesión. Por otra parte, los animales del grupo Antibióticos-LPS-Probióticos mostraron valores menores de ( $\bar{x}= 9 \pm 2$ ) respecto al modelo de doble golpe, con un valor de significancia de ( $p= 0.07$ ), lo cual nos indica que hay una tendencia a disminuir los niveles plasmáticos de PCR, además este grupo no presentó un aumento significativo respecto al grupo Sham.



**Figura 40. La administración de LPS incrementa la concentración de la proteína C reactiva en plasma.** En la gráfica se muestran los valores en mg/dL para los grupos mostrados a los 8 días post-lesión. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey ( $*p < 0.05$ ,  $**p \leq 0.001$ ,  $p=0.05$  vs Sham,  $\#p=0.07$  vs Ant-LPS).

## 7.12 El tratamiento agudo con probióticos no previene la disminución de la Inmunoglobulina A (IgA) en plasma

En la figura 41 se muestran los niveles de IgA en plasma a los 8 días post-lesión. Se calcularon los valores en mg/100 mL, el grupo Sham tuvo un valor de  $(3 \pm 0.5)$ , observando una disminución en el grupo Antibióticos-LPS ( $\bar{x} = 1 \pm 0.2$ ) y en el grupo LPS ( $\bar{x} = 1.1 \pm 0.1$ ) respecto al grupo Sham. Por otra parte, los animales del grupo Antibióticos-LPS-vehículo ( $\bar{x} = 1.2 \pm 0.3$ ) y Antibióticos-LPS-Probióticos ( $\bar{x} = 1.8 \pm 0.2$ ) no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo Antibióticos-LPS, lo cual nos indica que los probióticos no previenen la disminución en los valores plasmáticos de IgA.

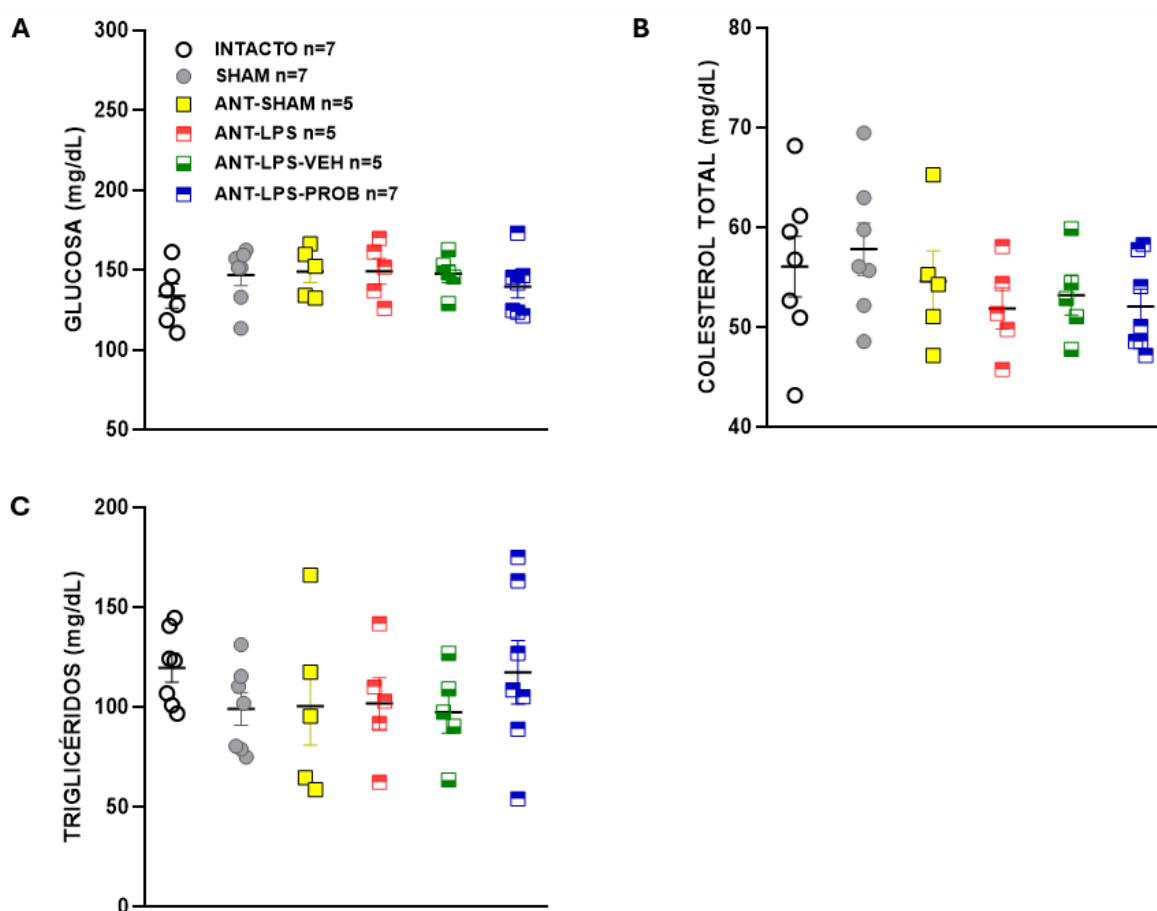


**Figura 41. El tratamiento agudo con probióticos no previene la disminución de la IgA en plasma.** En la gráfica se muestran los valores en mg/100mL para los grupos mostrados a los 8 días post-lesión. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\* $p = 0.0001$  vs Sham).

### 7.13 El modelo de doble golpe y el tratamiento agudo con probióticos no modifica marcadores metabólicos en plasma

En este estudio se recolectaron muestras de plasma sanguíneo y se analizó el nivel de glucosa (Figura 42A), colesterol total (Figura 42B) y triglicéridos (Figura 42C) a los 8 días post-lesión, con el fin de medir si los diferentes tratamientos modifican el estado metabólico.

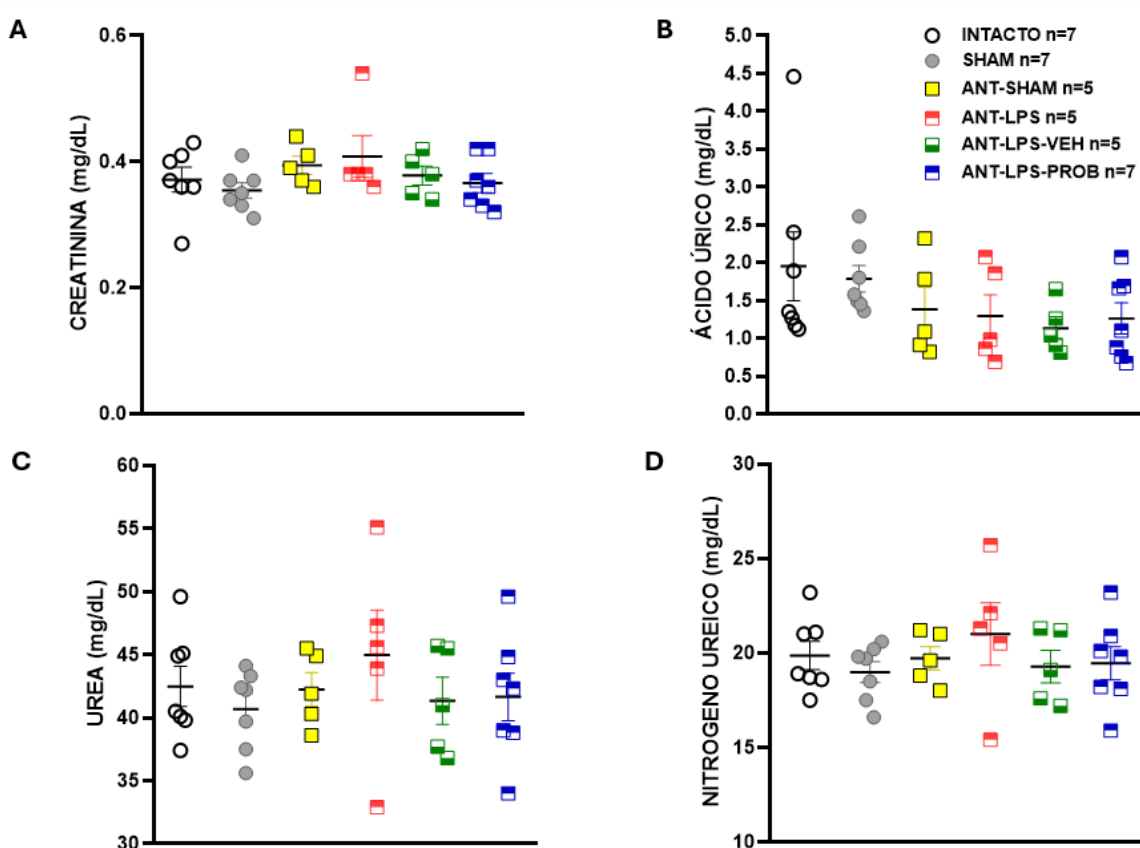
Respecto a estas evaluaciones y al realizar el análisis de datos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos.



**Figura 42. El modelo de doble golpe y el tratamiento agudo con probióticos no modifica marcadores metabólicos en plasma.** Se muestran los resultados de las siguientes pruebas metabólicas a los 8 días post-lesión. **A)** glucosa, **B)** colesterol total y **C)** triglicéridos. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey.

### 7.14 El modelo de doble golpe y el tratamiento agudo con probióticos no modifica marcadores de actividad renal en plasma

Con la finalidad de medir si los diferentes tratamientos modifican la actividad renal se analizó el nivel de creatinina (Figura 43A), ácido úrico (Figura 43B), urea (Figura 43C) y nitrógeno ureico (Figura 43D) a los 8 días post-lesión en los sujetos de estudio. Respecto a estas evaluaciones y al realizar el análisis de datos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

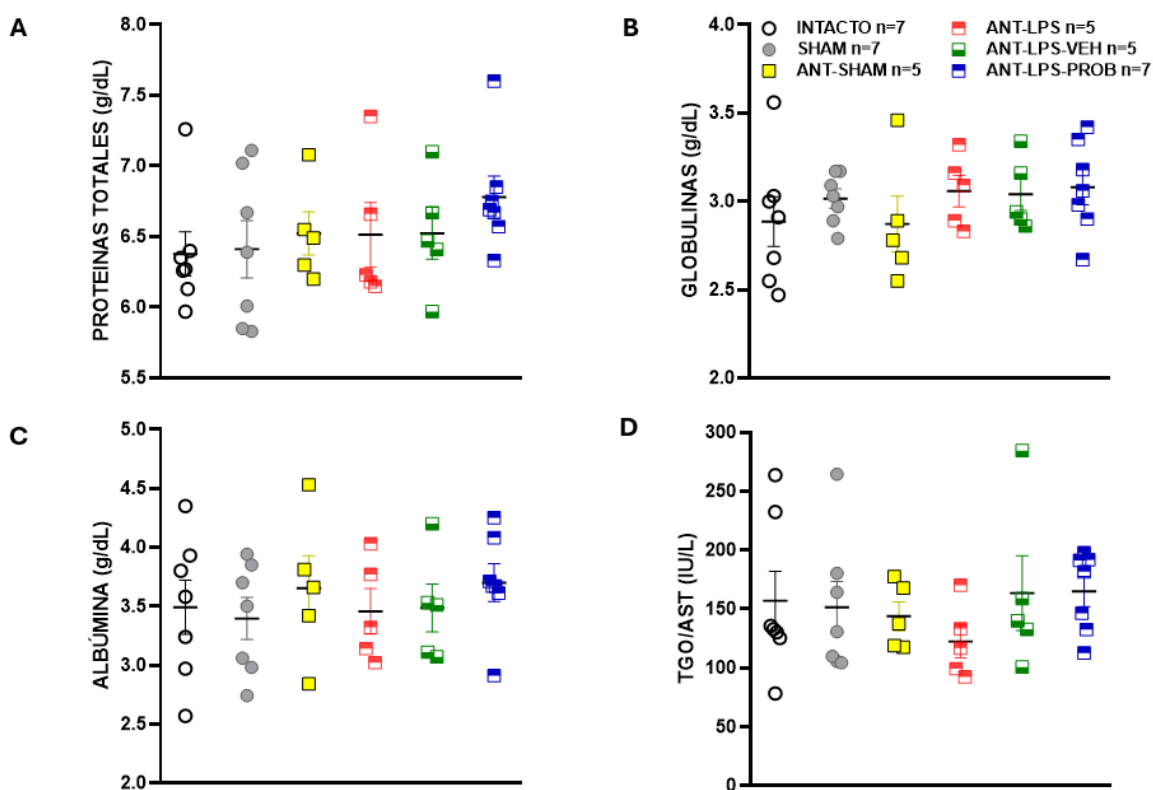


**Figura 43. El modelo de doble golpe y el tratamiento agudo con probióticos no modifica marcadores de actividad renal en plasma.** Se muestran los resultados de los marcadores de actividad renal a los 8 días post-lesión. A) creatinina B) ácido úrico C) urea y D) nitrógeno ureico. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una prueba post-Tukey.

### 7.15 El modelo de doble golpe y el tratamiento agudo con probióticos no modifica el nivel de proteínas en plasma

Con el fin de medir si los diferentes tratamientos modifican los niveles de proteínas en sangre se analizó el nivel de proteínas totales (Figura 44A), globulinas (Figura 44B), albúmina (Figura 44C) y TGO/AST (Figura 44D) a los 8 días post-lesión en los sujetos de estudio. .

Respecto a estas evaluaciones al realizar el análisis de datos de cada parámetro no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.



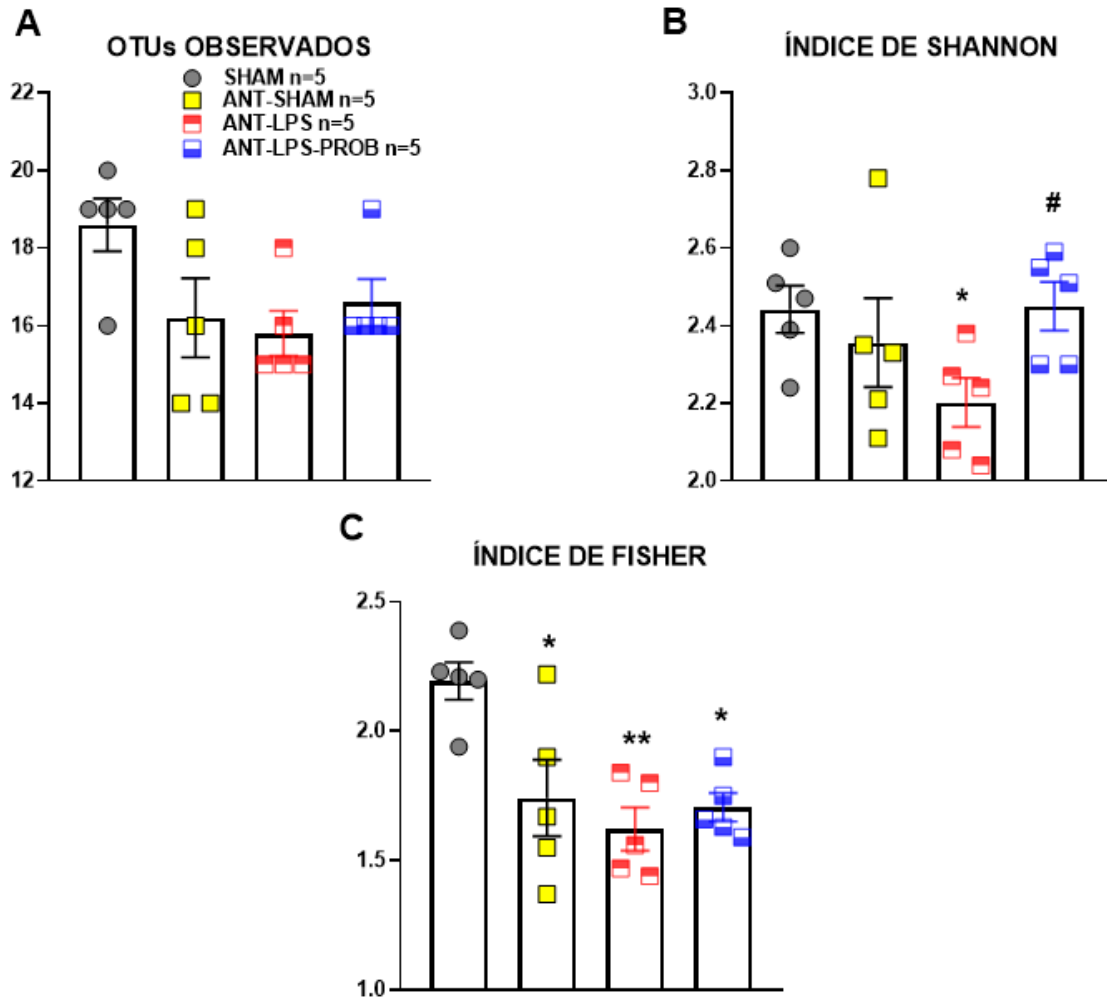
**Figura 44. El modelo de doble golpe y el tratamiento agudo con probióticos no modifica el nivel de proteínas en plasma.** Se muestran las gráficas del nivel de proteínas en plasma en los sujetos de estudio a los 8 días post-lesión **A)** proteínas totales, **B)** globulinas, **C)** albúmina y **D)** TGO/AST. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey.

### ***7.16 El modelo de doble golpe disminuye la riqueza y diversidad de especies en heces de acuerdo con los índices de Shannon y Fisher y los probióticos mejoran la riqueza y abundancia***

Para determinar los efectos del modelo de doble golpe y el tratamiento agudo con probióticos se analizó el número de Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs) observados en cada grupo experimental (Figura 45A), y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el número de estas.

También, se determinó el índice de Shannon (Figura 45B), este índice nos indica el número de especies presentes (riqueza) y la abundancia relativa de estas especies, en este caso encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados, el grupo Sham obtuvo un valor de ( $\bar{x} = 2.44 \pm 0.06$ ), mientras que el grupo Antibióticos-LPS obtuvo un valor de ( $\bar{x} = 2.2 \pm 0.06$ ) con un valor de significancia de ( $p \leq 0.05$ ) respecto a Sham. Sin embargo, los animales que recibieron probióticos obtuvieron un valor mayor en el índice de Shannon ( $\bar{x} = 2.45 \pm 0.06$ ) respecto a los animales del modelo de doble golpe, lo cual nos indica que en el modelo de doble golpe hay una menor riqueza y abundancia de especies y que los probióticos recuperan la riqueza y abundancia de especies.

En cuanto a la determinación del índice de Fisher, encontramos la mayor diferencia entre el grupo Antibióticos-LPS ( $\bar{x} = 1.6 \pm 0.08$ ) y el grupo Sham ( $\bar{x} = 2.2 \pm 0.07$ ) y en menor medida en los grupos Antibióticos-LPS-Probióticos ( $\bar{x} = 1.7 \pm 0.055$ ) y Antibióticos-Sham ( $\bar{x} = 1.7 \pm 0.14$ ). Los resultados del índice de Fisher nos indican que la diversidad de especies es menor entre los animales que recibieron antibióticos, tanto con falsa lesión como en el modelo de doble golpe.



**Figura 45. El modelo de doble golpe disminuye la riqueza y diversidad de especies en heces de acuerdo con los índices de Shannon y Fisher.** Se muestran los resultados del análisis de alfa-diversidad de especies en heces a los 8 días post-lesión. **A)** OTUs observados, **B)** índice de Shannon, **C)** índice de Fisher. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  vs Sham, # $p \leq 0.05$  vs Ant-LPS).

### 7.17 El tratamiento con probióticos aumenta la abundancia del filo *Firmicutes* en heces

Se analizó la abundancia de especies a nivel de filo, como se muestra en la Figura 46, en donde observamos que los animales que recibieron Antibióticos o Antibióticos y LPS tuvieron un aumento de especies en el filo *Bacteroidota*. En cuanto a los animales del grupo Antibióticos-LPS-Probióticos, podemos notar que en el no hubo un aumento notable en el filo *Bacteroidota*, mientras que las especies del filo *Firmicutes* aumentaron después de un tratamiento de 8 días.

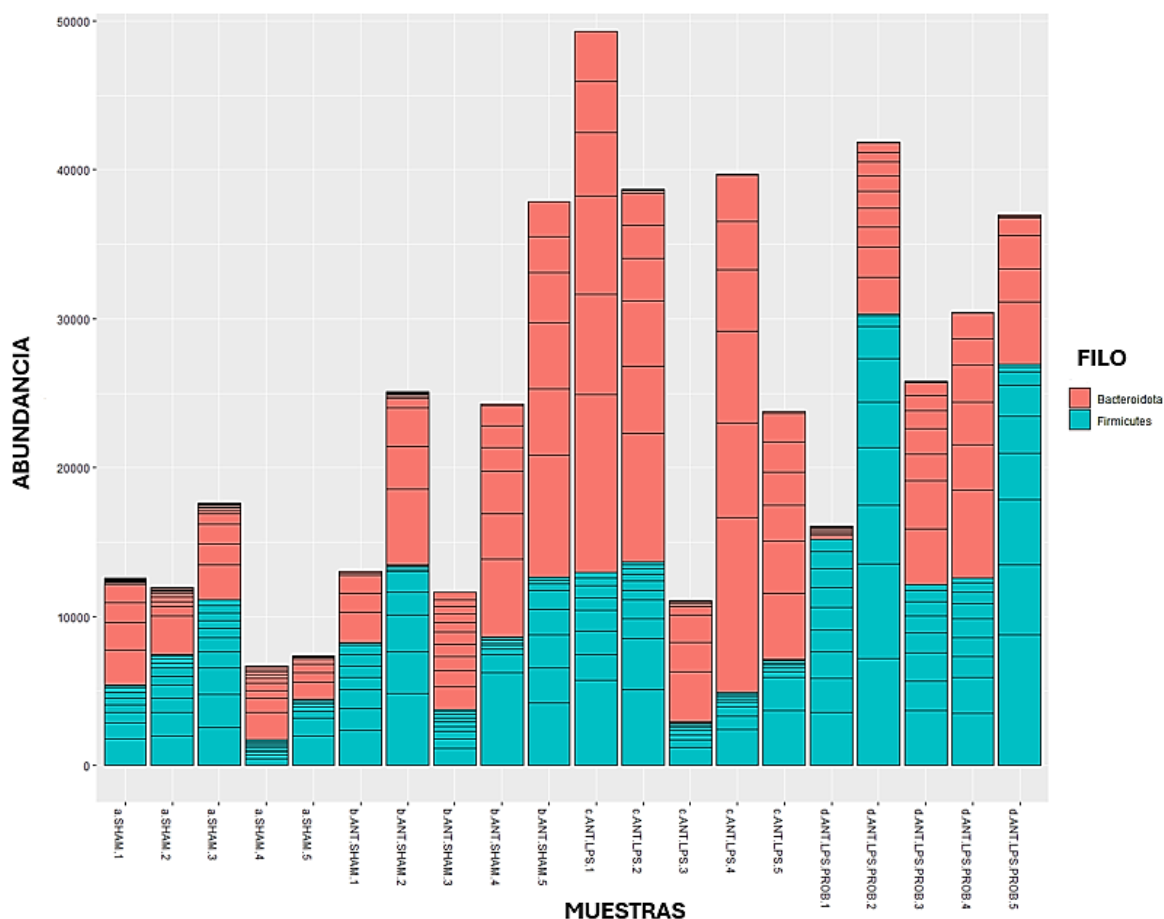


Figura 46. El modelo de doble golpe aumenta la abundancia del filo *Bacteroidota* en heces. Se muestran los resultados del análisis de abundancia de especies a nivel de filo en heces a los 8 días post-lesión.

### 7.17.1 El tratamiento agudo con probióticos aumenta la abundancia de la clase *Bacilli* en heces

Posterior a los tratamientos con probióticos se analizó la abundancia de especies a nivel de clase, como se muestra en la Figura 47, en donde observamos que los animales que recibieron Antibióticos o Antibióticos y LPS tuvieron un aumento de especies en la clases *Bacteroidia*; perteneciente al filo *Bacteroidota*, respecto al grupo Sham. También podemos notar que hay una mayor presencia de la clase *Bacilli* en el grupo Antibióticos-LPS-Probióticos; perteneciente al filo *Firmicutes* en comparación a los otros grupos.

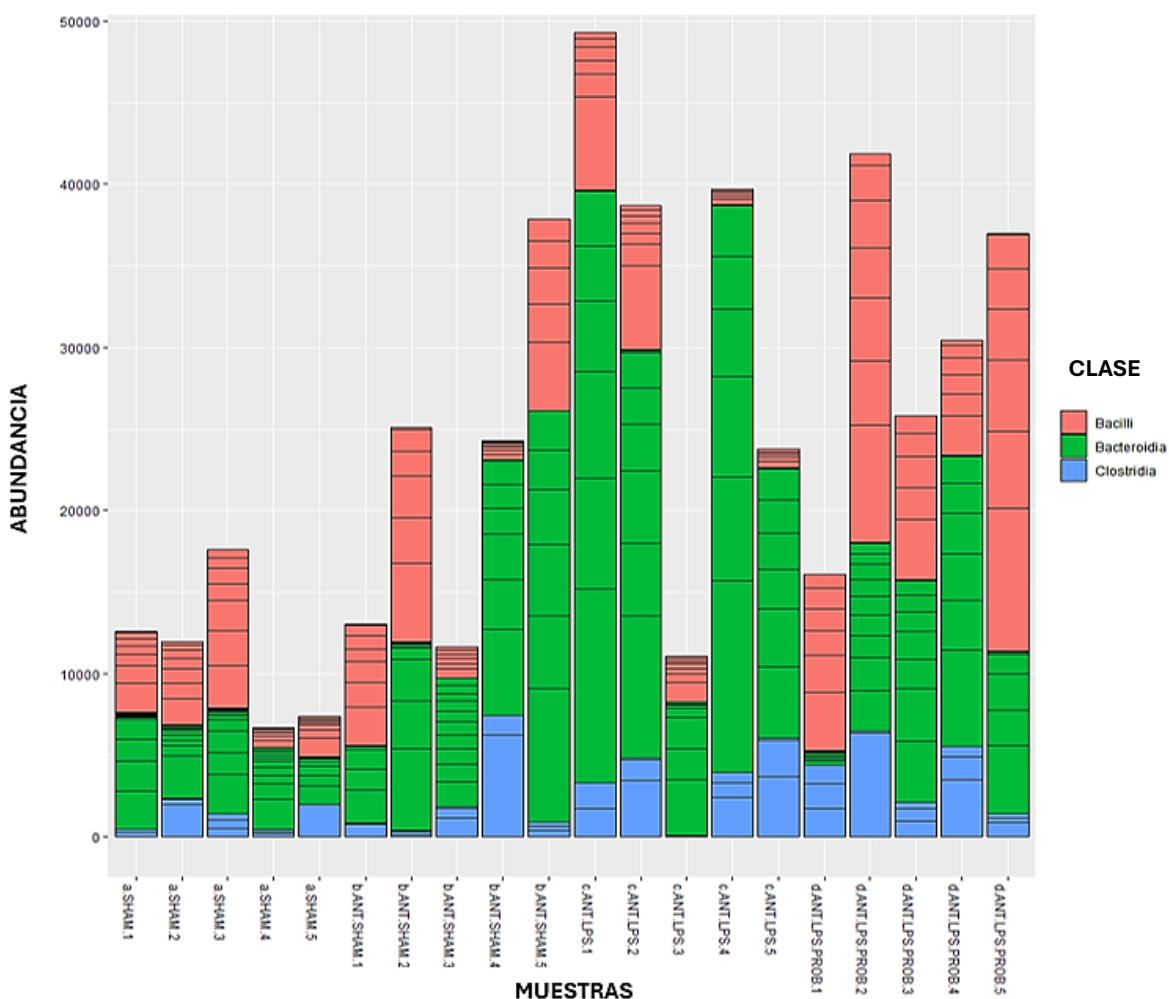


Figura 47. El tratamiento con probióticos aumenta la abundancia de la clase *Bacilli* en heces. Se muestran los resultados del análisis de abundancia de especies a nivel de clase en heces a los 8 días post-lesión.

### 7.17.2 El tratamiento agudo con probióticos aumenta la abundancia del orden *Lactobacillales* en heces

Se analizó la abundancia de especies a nivel de orden, como se muestra en la Figura 48, en donde observamos que los animales que recibieron Antibióticos o Antibióticos y LPS tuvieron un aumento de especies en el orden *Bacteroidales*; perteneciente al filo *Bacteroidota*. En cuanto a los animales del grupo Antibióticos-LPS-Probióticos, podemos observar una reducción de especies en el orden *Bacteroidales* y un notable aumento de especies en el orden *Lactobacillales*; perteneciente al filo *Firmicutes*.

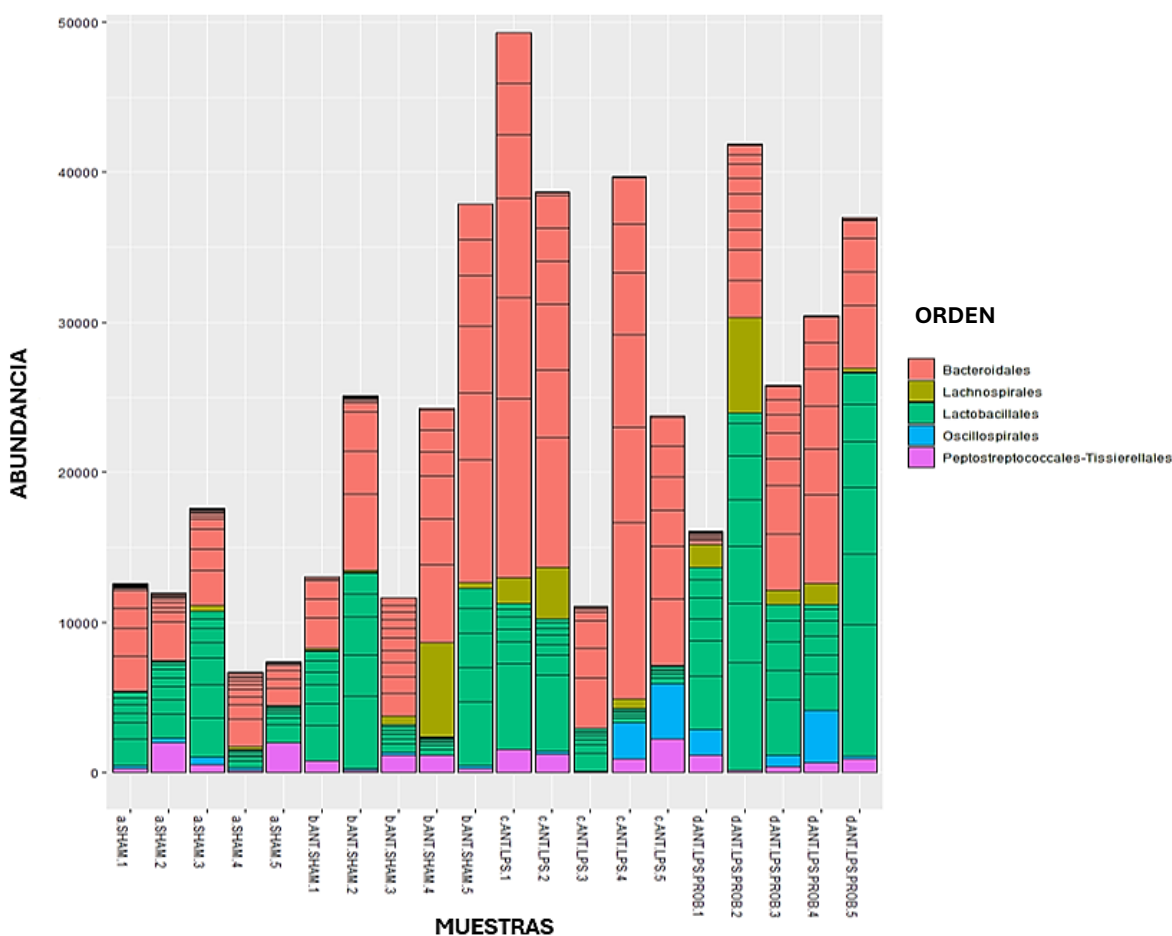
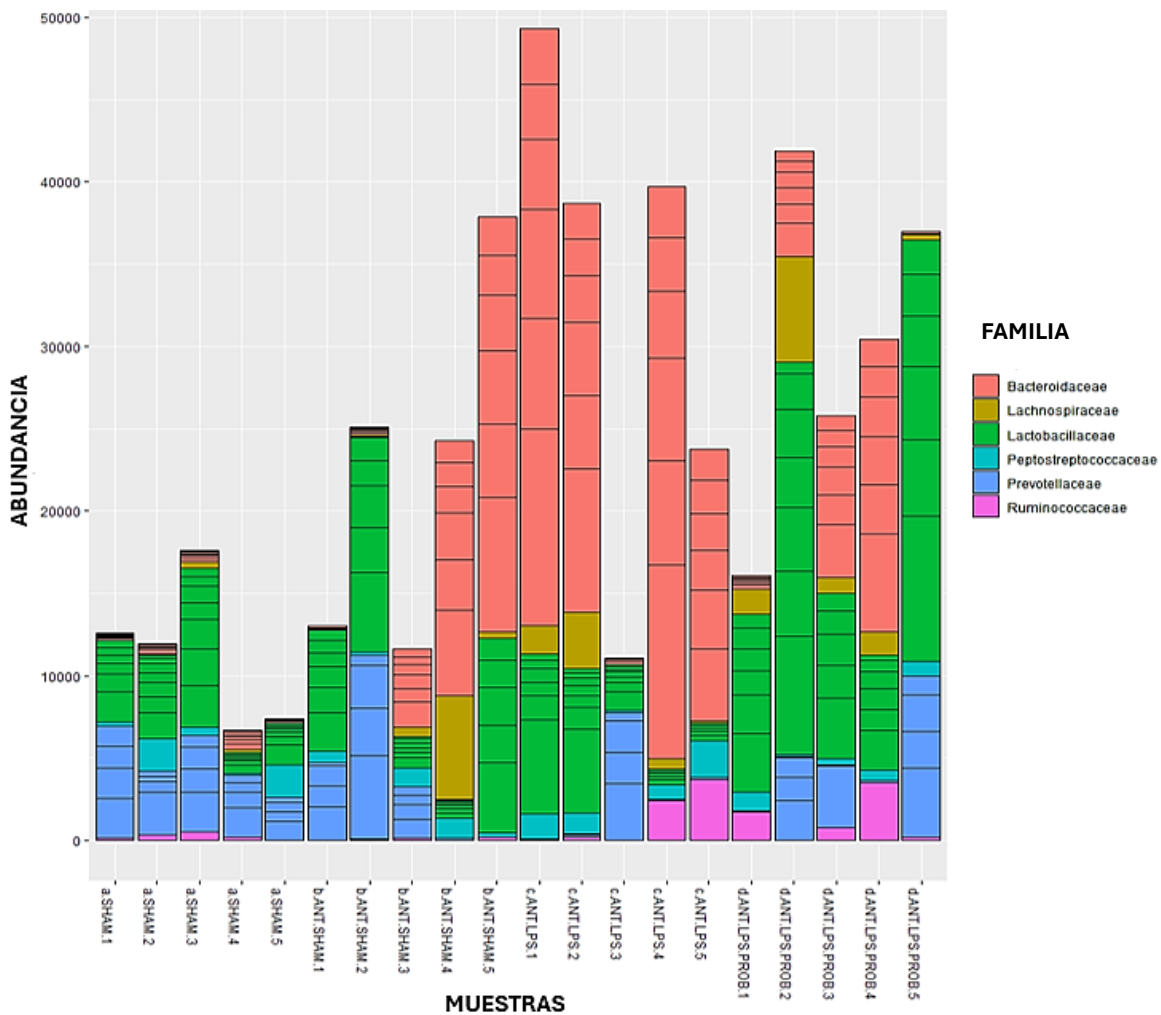


Figura 48. El tratamiento con probióticos aumenta la abundancia del orden *Lactobacillales* en heces. Se muestran los resultados del análisis de abundancia de especies a nivel de orden en heces a los 8 días post-lesión.

### 7.17.3 El tratamiento agudo con probióticos aumenta la abundancia de la familia *Lactobacillaceae* en heces

Al analizar la microbiota de los diferentes grupos experimentales se determinó la abundancia de especies a nivel de familia, como se muestra en la Figura 49, en donde observamos que los animales que recibieron Antibióticos o Antibióticos y LPS tuvieron un aumento de especies en la familia *Bacteroidaceae*; perteneciente al filo *Bacteroidota*, mientras que en el grupo Antibióticos-LPS-Probióticos se observa una disminución. En la misma línea de observaciones, se encontró que en el grupo Antibióticos-LPS-Probióticos hay aumento de especies en la familia *Lactobacillaceae*, perteneciente al filo *Firmicutes*.



**Figura 49.** El tratamiento con probióticos aumenta la abundancia de la familia *Lactobacillaceae* en heces. Se muestran los resultados del análisis de abundancia de especies a nivel de orden en heces a los 8 días post-lesión.

### 7.17.4 El tratamiento agudo con probióticos aumenta la abundancia del género *Lactobacillus* en heces

Se analizó la abundancia de especies a nivel de género, como se muestra en la Figura 50, en donde observamos que los animales que recibieron Antibióticos o Antibióticos y LPS tuvieron un aumento de especies en el género *Bacteroides*; perteneciente al filo *Bacteroidota*, sin observarse este efecto en el grupo Antibióticos-LPS-Probióticos. Sin embargo, sí podemos notar el aumento de especies en el género *Lactobacillus*; perteneciente al filo *Firmicutes* en el grupo Antibióticos-LPS-Probióticos.

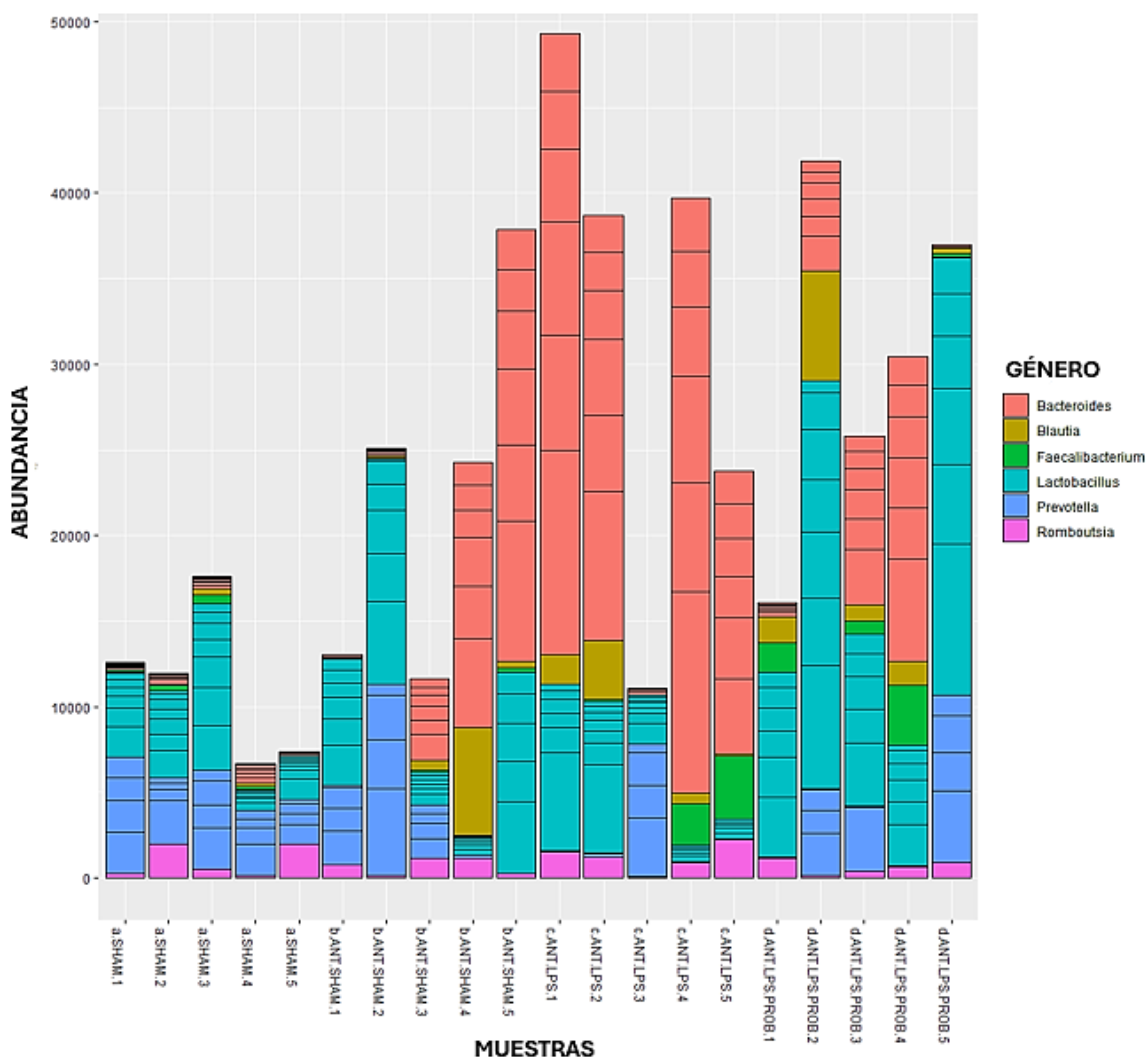


Figura 50. El tratamiento con probióticos aumenta la abundancia del género *Lactobacillus* en heces. Se muestran los resultados del análisis de abundancia de especies a nivel de orden en heces a los 8 días post-lesión.

## 8. DISCUSIÓN

El modelo de la EP evaluado en este estudio se le conoce como “modelo de doble golpe”, ya que combina una lesión estriatal con LPS y disbiosis intestinal; la primera desencadena un proceso de neuroinflamación, la cual genera la degeneración de terminales y cuerpos neuronales dopaminérgicos y la disbiosis intestinal es inducida mediante la administración oral de antibióticos. Este modelo se generó con el fin de integrar y comprender la relación del proceso inflamatorio en el eje microbiota-intestino-cerebro. Tomamos como antecedente otro modelo similar, como el de (Avagliano et al., 2022) quien también buscó evaluar el impacto de la disbiosis sobre un modelo de experimental de EP inducido con 6-OHDA. No obstante, el modelo de doble golpe que mostramos resulta innovador para el estudio de la fisiopatología de la EP. Previo al presente trabajo, en el laboratorio de neuroquímica (FCQ-BUAP) se desarrolló este modelo de “doble golpe” durante 28 días, y se encontró que es un modelo de inflamación a nivel del SNC y periférico que causa diferentes afectaciones motoras y no motoras, acompañado de pérdida de neuronas dopaminérgicas en la vía nigroestriatal (Tesis Gutiérrez-Hernández, 2024).

A los 8 días post-lesión, evaluamos la asimetría motora con el modelo del cilindro, en donde encontramos una disminución en el uso de ambas extremidades de hasta un 28% en el modelo de doble golpe en comparación con el grupo control (Figura 29B). Por otro lado, evaluamos la coordinación motora en la prueba del rotarod (Figura 30). No se encontró que los animales con el modelo de doble golpe disminuyeran el tiempo de latencia hasta la primera caída. Esto puede deberse a que el modelo generado se evaluó tempranamente (8 días) y aunque se ha descrito previamente el daño dopaminérgico, el daño generado aún no es suficiente para causar pérdidas significativas en la coordinación. En otros modelos de hemiparkinsonismo, como la administración de 6-OHDA en el estriado de ratas, donde se ha observado una pérdida casi total de terminales en todo el estriado y la pérdida de ~80% de neuronas en la SNpc y el área ventral tegmental (VTA), se ha observado que sí disminuye significativamente el tiempo de latencia hasta la primera caída (Monville et al., 2006; Zhang et al., 2023).

En el modelo de doble golpe con LPS encontramos la activación de la microglía en el estriado a los 8 días post-lesión (Figura 33B). Este dato nos indica que está ocurriendo un

proceso neuroinflamatorio, el cual se ha asociado fuertemente a la muerte de neuronas dopaminérgicas en la SNpc, como lo evidenciamos en nuestros resultados al encontrar una pérdida del 30% de neuronas TH+ (Figura 32B) y una disminución ~10% en la IR-TH+ en las terminales nerviosas del estriado ipsilateral (Figura 31B). La microglía activada adopta una morfología ameboide característica de un estado proinflamatorio, lo cual sugiere que está participando activamente en el daño neuronal. También se ha evaluado el efecto independiente del LPS sobre el estriado dorsolateral, el cual de acuerdo con (Parra et al., 2020, 2023) produce daño dopaminérgico a través de la activación de la microglía; en dicho proceso se observó morfología ameboide correspondiente a una microglía activada particularmente alta a los 7 días post-lesión. Además, en ese estudio se observaron cambios conductuales al producirse asimetría motora en ratas. Estos hallazgos en conjunto refuerzan la hipótesis de que la activación microglial desempeña un papel central en la neurodegeneración inducida por inflamación, particularmente en regiones dopaminérgicas como la SNpc y el estriado.

La activación de la microglía por parte de LPS a través de su interacción con los receptores TOLL (TLR4) desencadena la activación de genes inflamatorios, para la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6 de acuerdo con el mecanismo propuesto por (Gu et al., 2018), las cuales podrían generar un estado inflamatorio sistémico, que podría exacerbarse en presencia de disbiosis intestinal, como proponemos en este modelo. Para evaluar este proceso inflamatorio sistémico, medimos la PCR, que es uno de los biomarcadores inflamatorios de fase aguda más estudiado, dicha proteína participa en la primera fase de la inflamación, aumentando rápidamente en sangre (6-8 horas) tras un estímulo inflamatorio, en este caso el “doble golpe “. Al respecto, encontramos que a los 8 días post-lesión los niveles de PCR se mantuvieron elevados (Figura 40). Un efecto muy similar se encontró en un reporte acerca de un modelo de lesión dopaminérgica en la SNpc con LPS, acompañado de daño intestinal, asociando los altos niveles de PCR a una alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y que la inflamación periférica podría representar un factor de riesgo en el desarrollo de la EP (Villarán et al., 2010).

Con la inducción de la disbiosis intestinal se podrían establecer una serie de alteraciones por lo que evaluamos algunos parámetros fisiológicos e histológicos que nos ayudaran a demostrar el alcance del modelo de doble golpe.

Evaluamos la actividad intestinal y la tasa de defecación en dos momentos (Figuras 34 y 35); previo a la administración de antibióticos y después de la lesión intraestriatal, esto con el fin de explorar si dichos tratamientos provocan alteraciones en la función intestinal. No se encontraron diferencias en diversos parámetros como la actividad intestinal, la tasa de defecación, el peso húmedo y el porcentaje de agua en heces entre el grupo Antibióticos-LPS y el grupo control, ni con el resto de los grupos experimentales que recibieron el doble golpe en una fase aguda. Sin embargo, los animales que recibieron únicamente LPS mostraron una disminución significativa en la actividad intestinal y en la tasa de defecación. Esto podría deberse a que el LPS, al activar el receptor TLR4 a nivel intestinal, reduce la motilidad gastrointestinal. En contraste, los antibióticos podrían atenuar la inflamación inducida por el LPS, lo que explicaría por qué los animales tratados con antibióticos y LPS no presentaron dicha disminución (Zheng et al., 2022). Por otro lado, en el modelo de doble golpe a los 28 días sí se observó un tránsito intestinal más lento y una menor cantidad de pellets defecados, la tasa de defecación fue la de menor número de pellets en 1 hora y dichos pellets contenían más agua respecto al control y LPS, lo que sugiere que el tiempo después de los tratamientos influyó en estas conductas no motoras.

Contrastantemente, encontramos que los grupos tratados con Antibióticos; Antibióticos-Sham y Antibióticos-LPS, o solo LPS, presentaron un incremento en el peso del ciego y su contenido; este hallazgo podría explicarse por alteraciones en la microbiota intestinal inducidas por los antibióticos, que generan inflamación y disbiosis, afectando la producción de mucosidad y la motilidad intestinal, lo que ralentiza el tránsito y favorece la retención fecal (Ge et al., 2017; Hwang et al., 2020; Poteres et al., 2020).

En el análisis histológico del colon distal ubicamos principalmente las siguientes estructuras: las crestas, la capa mucosa y criptas de Lieberkühn. En el grupo Antibióticos-Sham y aquellos que recibieron LPS o Antibióticos-LPS (incluyendo los que recibieron vehículo) encontramos una disminución de ~25% en el tamaño de las crestas respecto al grupo Sham. Respecto a la capa mucosa, observamos que en los grupos Antibióticos-Sham, LPS y Antibióticos-LPS hubo una reducción en el tamaño de este epitelio, además de

infiltración leucocitaria; la cual se aprecia como un aumento de la celularidad entre la parte inferior de la capa mucosa, la muscularis de la mucosa y la submucosa (Figura 38A). Otras estructuras evaluadas fueron las criptas de Lieberkühn, las cuales contienen las células Paneth de gran relevancia pues producen enzimas antibacterianas como las lisozimas y las células caliciformes que se encargan de la producción de MUC2, un gel viscoelástico que impide el paso de bacterias patógenas, atrapándolas en la barrera intestinal (Álvarez et al., 2021). En el grupo Antibióticos-Sham, y aquellos que recibieron LPS o Antibióticos y LPS (incluyendo los que recibieron vehículo) fue notoria una disminución en el tamaño e integridad de estas criptas, principalmente en la parte superior y media de la capa mucosa, asimismo observamos una disminución de MUC2 en los mismos grupos. Esta pérdida de criptas de Lieberkühn coincide con un reporte en un modelo de disbiosis intestinal y colitis, donde se observó también una disminución en la expresión de MUC2 y de *Akkermansia muciniphila*, tanto en heces como en la mucosa del colon (López-Cauce et al., 2023).

Dado el papel de la microbiota en la modulación inmunitaria, se evaluó si los antibióticos alteran los niveles séricos de IgA. Se observó una disminución de esta inmunoglobulina en los animales tratados con antibióticos y/o LPS, posiblemente debido a cambios en la microbiota que afectan a las células plasmáticas productoras de IgA, tal como lo reportan (Kawamoto et al., 2014).

Para conocer si el modelo de doble golpe era capaz de generar daños sobre otros sistemas, se evaluaron diferentes parámetros en plasma con el fin de medir si la disbiosis intestinal generada por antibióticos es capaz de generar alteraciones metabólicas (Figura 42), cambios en la actividad renal (Figura 43) y en el nivel de proteínas sanguíneas (Figura 44). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre el modelo del doble golpe y el grupo control.

Los cambios observados en la conducta no motora nos llevaron a evaluar la composición de bacterias presentes en heces (Figura 45), en donde observamos que en el modelo de doble golpe hay una menor riqueza y diversidad de especies bacterianas en sus heces, esto de acuerdo con los índices de Shannon y Fisher, lo cual concuerda con los daños observados a nivel histológico.

Los resultados obtenidos en este modelo agudo de doble golpe evidencian inflamación aguda sistémica, asociada a neuroinflamación, alteraciones motoras reflejadas en la asimetría motora, así como cambios histológicos en el colon distal vinculados a disbiosis intestinal y modificaciones en la composición de la microbiota fecal, como se esquematiza en la figura 51.

\*\*\*

En este trabajo se evaluó si los probióticos *L. rhamnosus* y *B. lactis* tienen efectos neuroprotectores e inmunomoduladores en el modelo de doble golpe. Como sabemos, los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades adecuadas, proporcionan beneficios para la salud del huésped (Gallo et al., 2016). Además, pueden producir efectos beneficiosos sin alterar el microbioma permanente, mediante la colonización transitoria del intestino. Por tanto, la administración de probióticos puede proteger la homeostasis intestinal durante el uso de antibióticos (Barko et al., 2018; Hempel et al., 2012; Selinger et al., 2013).

En cuanto a los efectos neuroprotectores de estas cepas en el presente proyecto, se encontró que los probióticos no disminuyeron la asimetría motora en el modelo de doble golpe (Figura 29), a pesar de presentar mayor inmunorreactividad a TH<sup>+</sup> en el estriado respecto a los animales que no recibieron probióticos, esto debido a que el tratamiento agudo con estos probióticos no pudo prevenir la pérdida de neuronas TH<sup>+</sup> en la SNpc. Se han reportado propiedades neuroprotectoras de los probióticos, como la reducción de la pérdida de área TH<sup>+</sup> y de neuronas TH<sup>+</sup> en la SNpc, así como una disminución del área Iba-1<sup>+</sup> (microglía) en el estriado, sin modificar la proporción de los fenotipos microgliales. Estos efectos se correlacionaron con las mejorías conductuales motoras y la disminución de la pérdida dopaminérgica en la SNpc y el estriado, cabe destacar que en dicho estudio el tratamiento con probióticos fue crónico, antes y después de la lesión intraestriatal con 6-OHDA (Cuevas-Carbonell et al., 2022), a diferencia del presente trabajo, donde se aplicó un tratamiento agudo de solo ocho días posterior a la lesión estriatal con LPS.

Respecto a los efectos antiinflamatorios, en enfermedades neurodegenerativas ligadas a disbiosis intestinal, se ha encontrado en diversos estudios que los probióticos son capaces de disminuir los niveles de PCR cuando se administran en periodos de 8 a 16 semanas, esto debido a la disminución de citoquinas proinflamatorias como IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que son

estímulos directos para la producción hepática de proteína C reactiva, además de corregir la disbiosis intestinal y por lo tanto, disminuir la activación de TLR4 (Borzabadi et al., 2018; Martami et al., 2019; Tamtaji et al., 2020). Sin embargo, en el presente estudio la administración de *L. rhamnosus* y *B. lactis* a los animales en el modelo de doble golpe solo produjo una tendencia a disminución de la proteína C reactiva, que no alcanzó el criterio de significancia ( $p=0.07$ ), posiblemente por el corto tiempo de tratamiento con esa combinación de probióticos. Aun así, es posible que esta respuesta de empezar a bajar los niveles de inflamación sistémica haya tenido repercusiones benéficas en los animales.

También evaluamos los efectos del tratamiento agudo con probióticos sobre los síntomas no motores. Específicamente aquellos que nos permiten evaluar la actividad intestinal y que están presentes desde la fase prodrómica de la EP.

Respecto al comportamiento de la actividad intestinal, en el laboratorio de neuroquímica BUAP se ha reportado que los animales que recibieron los probióticos *L. rhamnosus* y *B. lactis* durante 28 días mejoraron el tránsito intestinal al presentar mayor número de deposiciones respecto al modelo de doble golpe (Tesis Gutiérrez-Hernández, 2024), lo cual concuerda con evidencias de que los tratamientos crónicos con probióticos del género *Lactobacillus* han sido asociados con efectos benéficos sobre padecimientos gastrointestinales en modelos animales (Chung et al., 2020; Hu et al., 2021).

Con respecto a nuestras evaluaciones, al administrar los probióticos *L. rhamnosus* y *B. lactis* no se mostraron diferencias significativas en el modelo de doble golpe a los 8 días post-lesión. Es importante mencionar que por sí mismo en el modelo de doble golpe no encontramos cambios en la actividad intestinal ni en la tasa de defecación en ese lapso. Por otro lado, se encontró que el peso del ciego incrementó al igual que en el grupo Antibióticos-LPS (Figura 37). Además, otros parámetros como el peso húmedo y el contenido de agua en heces no se vieron alterados por el tratamiento de probióticos (Figura 35).

Por otra parte, el tratamiento con los probióticos tuvo efectos benéficos en el intestino, a pesar de no restablecer el tamaño de la cresta, mantuvo el tamaño de la capa mucosa y evidenció una menor infiltración leucocitaria, menor daño en las criptas de Lieberkühn, ya que un mayor número de estas preservaron su tamaño y forma. Esta preservación de las criptas de Lieberkühn conlleva a mantener un mayor número de células caliciformes, las

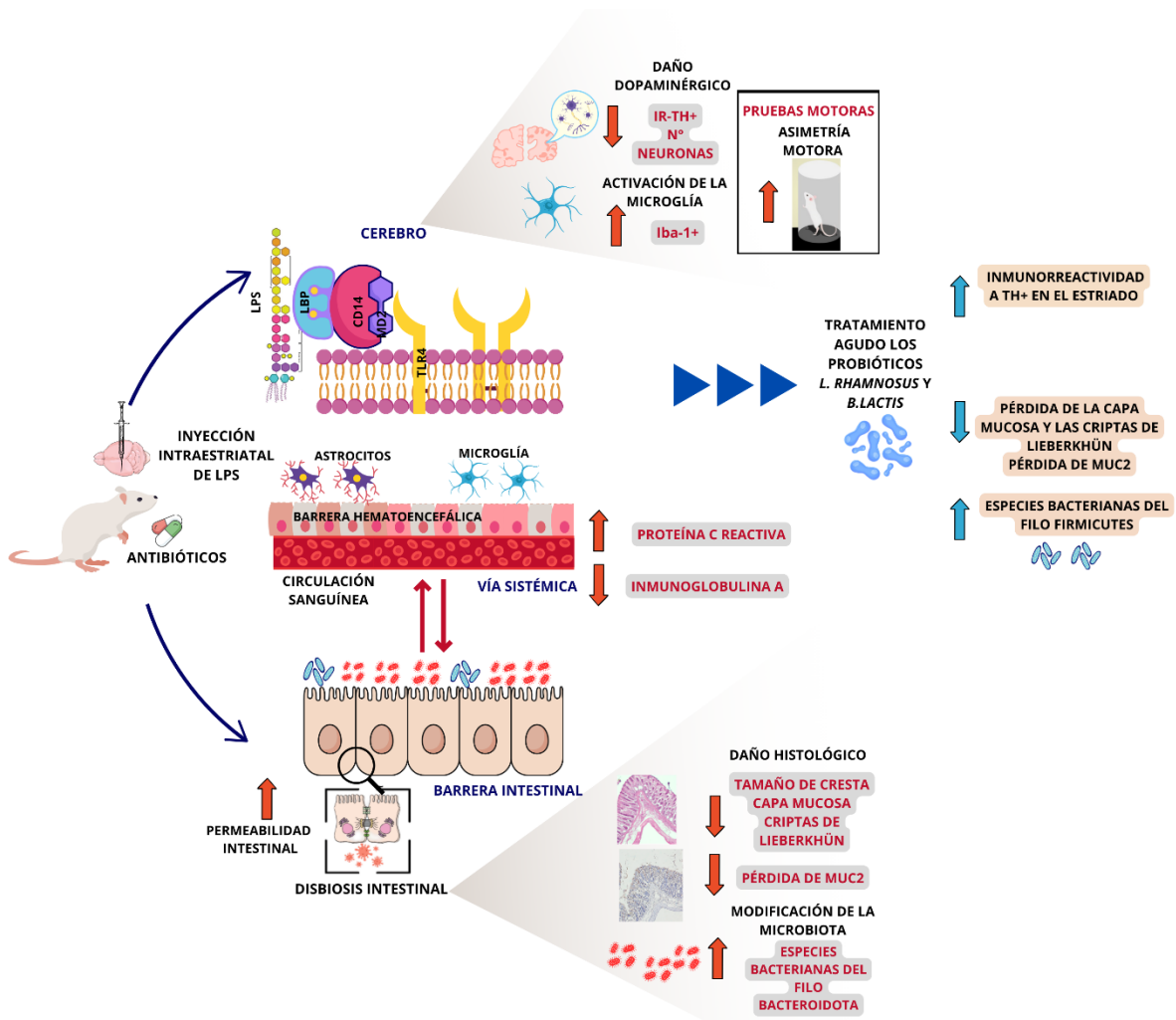
cuales se encargan de la producción de MUC2, una glicoproteína encargada de atrapar patógenos (Álvarez et al., 2021), por tal motivo buscamos evaluar su presencia en colon distal, observando que los probióticos indujeron una mayor expresión de MUC2 en el colon distal con respecto al modelo de doble golpe.

En un estudio en el cual se administró *L. rhamnosus*, se observó que este probiótico promovió la migración de células madre mesenquimales a un área adyacente a las células epiteliales de las criptas, generando un efecto de protección sobre estas (Riehl et al., 2019). Existe evidencia en la cual una suplementación con 7 días de los probióticos del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* promovieron la expresión de MUC2 a nivel de proteína y gen, tanto en animales como en células cultivadas, siendo *Lactobacillus* el principal promotor de esta expresión, como lo reporta (Caballero-Franco et al., 2007). Los hallazgos encontrados en el presente estudio nos orientan a que los probióticos empleados disminuyen el daño en la citoarquitectura del colon distal en un modelo de doble golpe en rata.

Por último, asociamos los cambios presentes en el colon distal con la composición del microbiana fecal. En general los animales que recibieron el tratamiento con probióticos tuvieron una menor pérdida de riqueza y diversidad de especies, de acuerdo con el índice de Shannon, con respecto al modelo de doble golpe (Figura 45). Esto se vio reflejado en la abundancia de especies a diversos niveles taxonómicos, comenzando a nivel de filo; encontramos que en las heces de los animales tratados con probióticos hubo una mayor presencia del filo *Firmicutes* y una menor abundancia del filo *Bacteroidota* (Figura 46), caso contrario a los animales que recibieron Antibióticos-LPS sin probióticos, los cuales mostraron una mayor proporción de *Bacteroidota* frente a *Firmicutes*. Por último, una mayor presencia del género *Lactobacillus*, que fue evidente con tan solo 8 días de administración del tratamiento con probióticos (Figura 50). Estos cambios son importantes pues nos indica que en el modelo de doble golpe existe disbiosis intestinal al haber un desbalance en las poblaciones bacterianas, siendo principalmente afectadas aquellas que tienen efectos benéficos en la producción de sustancias para la homeostasis intestinal, por otro lado, aun cuando los probióticos son administrados en un corto periodo de tiempo, estos demostraron la capacidad de colonizar la microbiota fecal con poblaciones bacterianas importantes como los *Lactobacillus*.

En un estudio en donde se emplearon probióticos con las especies *Lactobacillus*, se halló que los animales que recibieron probióticos presentaron una mayor presencia del género *Lactobacillus* y aquellos que recibieron un tratamiento proinflamatorio intestinal para alterar la composición de su microbiota, presentaron una mayor proporción de *Bacteroides* (Jang et al., 2019).

Un hallazgo importante asociado a las mejoras en la microbiota en el tratamiento agudo con los probióticos *L. rhamnosus* y *B. lactis* fue que este tratamiento disminuyó la pérdida de inmunorreactividad a TH en el estriado, preservó estructuras histológicas en colon distal y disminuyó la disbiosis intestinal en un modelo de doble golpe en ratas. Estos resultados resultan alentadores en los beneficios a corto plazo de los probióticos y nos alientan a continuar estudiando si un tratamiento a largo plazo con estos mismos probióticos puede causar mejoras a nivel conductual y celular en el proceso inflamatorio que se genera en el modelo de doble golpe en rata.



**Figura 51. Esquema representativo del modelo de doble golpe generado por la administración oral de antibióticos y una inyección intraestriatal de LPS.** El modelo de doble golpe generó asimetría motora en el modelo del cilindro como consecuencia de la pérdida de neuronas TH+ en la SNpc y la IR-TH+ en el estriado. Proponemos que esta neurodegeneración se produce mediante la neuroinflamación que se observa en un aumento en la activación de la microglía (mediante el marcador Iba-1+). A los 8 días post-lesión, la proteína C reactiva se encontró aumentada y la Inmunoglobulina A disminuida. El daño intestinal se vio reflejado en los cambios histológicos a nivel de colon distal; disminución del tamaño de la cresta, pérdida de la capa mucosa y de la expresión de MUC2, además de la modificación de la microbiota (disbiosis). El tratamiento agudo con los probióticos disminuyó a nivel cerebral la pérdida de IR-TH en el estriado. Por otra parte, los probióticos generaron efectos beneficiosos en el intestino al disminuir la pérdida de la capa mucosa, las criptas de Lieberkühn y de MUC2. La disbiosis intestinal disminuyó al aumentar las especies del filo *Firmicutes*. Abreviaturas; LPS: lipopolisacárido, LBP: Proteína de unión al lipopolisacárido, CD14: glucoproteína de membrana anclada a glucolípidos, MD2: factor de diferenciación mielóide 2, TLR4: receptor tipo Toll 4, MUC2: Mucina-2.

## 9. CONCLUSIONES

1. El modelo agudo de doble golpe genera asimetría motora a los siete días post-lesión, sin afectar la coordinación motora. A nivel cerebral, este modelo disminuye la inmunorreactividad a TH+ y activa la microglía (Iba-1+) en el estriado, lo que conlleva a la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc. No se produjeron alteraciones en los parámetros de actividad intestinal, aunque sí se evidenció daño histológico en el colon distal, manifestado como disminución de la capa de mucina y pérdida de la expresión de MUC2. A nivel sistémico, se evidenció un aumento de PCR y una disminución de los niveles plasmáticos de IgA. No se produjo deterioro de varios parámetros bioquímicos sanguíneos y renales. Finalmente, en las heces de los animales sometidos a este modelo se encontró una reducción en la riqueza y diversidad de la microbiota intestinal, lo que sugiere un estado de disbiosis intestinal asociada a la neuroinflamación sistémica e intestinal inducida a los 7 días post-lesión.

2. El tratamiento agudo durante ocho días con los probióticos *L. rhamnosus* y *B. lactis* no logró reducir la asimetría motora ni prevenir la muerte neuronal en la SNpc, aunque sí atenuó el daño dopaminérgico en el estriado dorsal. A pesar de esta protección parcial, no se observó una disminución en la activación de la microglía en el estriado. A nivel intestinal, los probióticos no evitaron el aumento del peso del ciego, pero sí protegieron contra el daño histológico y la pérdida de expresión de MUC2 en el colon distal. Acompañado de una tendencia a reducir los niveles de PCR, sin mostrar disminución IgA en plasma. De manera notable, el tratamiento agudo con los probióticos preservó la riqueza y diversidad microbiana y favoreció un aumento en la abundancia de especies del filo *Firmicutes*, especialmente del género *Lactobacillus*, sugiriendo un efecto beneficioso sobre la composición de la microbiota intestinal y disminuyendo así la disbiosis intestinal generada en el modelo de doble golpe.

## 10. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la IgA intestinal en el modelo de doble golpe y analizar su asociación con los niveles plasmáticos de IgA.
2. Evaluar otros marcadores de inflamación sistémica en el modelo de doble golpe.
3. Caracterizar los filos bacterianos en la microbiota fecal después de una administración crónica con los probióticos *L. rhamnosus* y *B. lactis*.

## 11. REFERENCIAS

### A

Abbott, R. D., Petrovitch, H., White, L. R., Masaki, K. H., Tanner, C. M., Curb, J. D., Grandinetti, A., Blanchette, P. L., Popper, J. S., & Ross, G. W. (2001). Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology*, *57*(3), 456–462. <https://doi.org/10.1212/wnl.57.3.456>

Al Bander, Z., Nitert, M. D., Mousa, A., & Naderpoor, N. (2020). The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview. *International journal of environmental research and public health*, *17*(20), 7618. <https://doi.org/10.3390/ijerph17207618>

Alipour Nosrani, E., Tamtaji, O. R., Alibolandi, Z., Sarkar, P., Ghazanfari, M., Azami Tameh, A., Taghizadeh, M., Banikazemi, Z., Hadavi, R., & Naderi Taheri, M. (2021). Neuroprotective effects of probiotics bacteria on animal model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine: A behavioral, biochemical, and histological study. *Journal of immunoassay & immunochemistry*, *42*(2), 106–120. <https://doi.org/10.1080/15321819.2020.1833917>

Álvarez, J., Fernández Real, J. M., Guarner, F., Gueimonde, M., Rodríguez, J. M., Saenz de Pipaon, M., & Sanz, Y. (2021). Gut microbes and health. Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterología y hepatología*, *44*(7), 519–535. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2021.01.009>

Alves-Bezerra, M., & Cohen, D. E. (2018). Triglyceride Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*, *8*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>

Ambort, D., Johansson, M. E., Gustafsson, J. K., Nilsson, H. E., Ermund, A., Johansson, B. R., Koeck, P. J., Hebert, H., & Hansson, G. C. (2012). Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming MUC2 mucin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(15), 5645–5650. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120269109>

Archer, S. Y., Meng, S., Shei, A., & Hodin, R. A. (1998). p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(12), 6791–6796. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6791>

Avagliano, C., Coretti, L., Lama, A., Pirozzi, C., De Caro, C., De Biase, D., Turco, L., Mollica, M. P., Paciello, O., Calignano, A., Meli, R., Lembo, F., & Mattace Raso, G. (2022). Dual-Hit Model of Parkinson's Disease: Impact of Dysbiosis on 6-Hydroxydopamine-Insulted Mice-Neuroprotective and Anti-Inflammatory Effects of Butyrate. *International journal of molecular sciences*, *23*(12), 6367. <https://doi.org/10.3390/ijms23126367>

### B

- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science (New York, N.Y.)*, *307*(5717), 1915–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>
- Barichella, M., Severgnini, M., Cilia, R., Cassani, E., Bolliri, C., Caronni, S., Ferri, V., Canello, R., Ceccarani, C., Faierman, S., Pinelli, G., De Bellis, G., Zecca, L., Cereda, E., Consolandi, C., & Pezzoli, G. (2019). Unraveling gut microbiota in Parkinson's disease and atypical parkinsonism. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, *34*(3), 396–405. <https://doi.org/10.1002/mds.27581>
- Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S., & Williams, D. A. (2018). The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *Journal of veterinary internal medicine*, *32*(1), 9–25. <https://doi.org/10.1111/jvim.14875>
- Barlow, J. T., Leite, G., Romano, A. E., Sedighi, R., Chang, C., Celly, S., Rezaie, A., Mathur, R., Pimentel, M., & Ismagilov, R. F. (2021). Quantitative sequencing clarifies the role of disruptor taxa, oral microbiota, and strict anaerobes in the human small-intestine microbiome. *Microbiome*, *9*(1), 214. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01162-2>
- Barrero M., & Masgrau, J. (2001). El proteinograma en medicina clínica. *Medicina integral*, *38*(9), 404–409. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-el-proteinograma-medicina-clinica-13022954>
- Bedarf, J. R., Hildebrand, F., Coelho, L. P., Sunagawa, S., Bahram, M., Goeser, F., Bork, P., & Wüllner, U. (2017). Functional implications of microbial and viral gut metagenome changes in early stage L-DOPA-naïve Parkinson's disease patients. *Genome medicine*, *9*(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0428-y>
- Bjornsson T. D. (1979). Use of serum creatinine concentrations to determine renal function. *Clinical pharmacokinetics*, *4*(3), 200–222. <https://doi.org/10.2165/00003088-197904030-00003>
- Booijink, C. C., El-Aidy, S., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H. G., Troost, F. J., Smidt, H., Kleerebezem, M., De Vos, W. M., & Zoetendal, E. G. (2010). High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota. *Environmental microbiology*, *12*(12), 3213–3227. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02294.x>
- Borzabadi, S., Oryan, S., Eidi, A., Aghadavod, E., Daneshvar Kakhaki, R., Tamtaji, O. R., Taghizadeh, M., & Asemi, Z. (2018). The Effects of Probiotic Supplementation on Gene Expression Related to Inflammation, Insulin and Lipid in Patients with Parkinson's Disease: A Randomized, Double-blind, Placebo Controlled Trial. *Archives of Iranian medicine*, *21*(7), 289–295.
- Bose, A., & Beal, M. F. (2016). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, *139* Suppl 1, 216–231. <https://doi.org/10.1111/jnc.13731>
- Braak, H., & Del Tredici, K. (2017). Neuropathological Staging of Brain Pathology in Sporadic Parkinson's disease: Separating the Wheat from the Chaff. *Journal of Parkinson's disease*, *7*(s1), S71–S85. <https://doi.org/10.3233/JPD-179001>
- Braak, H., de Vos, R. A., Bohl, J., & Del Tredici, K. (2006). Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neuroscience letters*, *396*(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.11.012>
- Braak, H., Rüb, U., Gai, W. P., & Del Tredici, K. (2003). Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*, *110*(5), 517–536. <https://doi.org/10.1007/s00702-002-0808-2>
- Brochard, V., Combadière, B., Prigent, A., Laouar, Y., Perrin, A., Beray-Berthat, V., Bonduelle, O., Alvarez-Fischer, D., Callebert, J., Launay, J. M., Duyckaerts, C., Flavell, R. A., Hirsch, E. C., & Hunot, S. (2009). Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *The Journal of clinical investigation*, *119*(1), 182–192. <https://doi.org/10.1172/JCI36470>

Brundin, P., Ma, J., & Kordower, J. H. (2016). How strong is the evidence that Parkinson's disease is a prion disorder?. *Current opinion in neurology*, 29(4), 459–466. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000349>

## C

Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., & Chadee, K. (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 292(1), 315–322. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00265.2006>

Cebrián, C., Zucca, F. A., Mauri, P., Steinbeck, J. A., Studer, L., Scherzer, C. R., Kanter, E., Budhu, S., Mandelbaum, J., Vonsattel, J. P., Zecca, L., Loike, J. D., & Sulzer, D. (2014). MHC-I expression renders catecholaminergic neurons susceptible to T-cell-mediated degeneration. *Nature communications*, 5, 3633. <https://doi.org/10.1038/ncomms4633>

Cersosimo, M. G., Raina, G. B., Pecci, C., Pellene, A., Calandra, C. R., Gutiérrez, C., Micheli, F. E., & Benarroch, E. E. (2013). Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms. *Journal of neurology*, 260(5), 1332–1338. <https://doi.org/10.1007/s00415-012-6801-2>

Chung, H. G., Min, Y. W., Lee, C., Hong, S. N., Won, J. Y., Jang, J. A., Kim, C. H., & Chang, D. K. (2020). Effects of Novel Probiotics in a Murine Model of Irritable Bowel Syndrome. *The Korean journal of gastroenterology = Taehan Sohwagi Hakhoe chi*, 75(3), 141–146. <https://doi.org/10.4166/kjg.2020.75.3.141>

Citronberg, J. S., Curtis, K. R., White, E., Newcomb, P. A., Newton, K., Atkinson, C., Song, X., Lampe, J. W., & Hullar, M. A. (2018). Association of gut microbial communities with plasma lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in premenopausal women. *The ISME journal*, 12(7), 1631–1641. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0064-6>

Cuevas-Carbonell, S. G., Vásquez-Celaya, L., García-López, D., Granados-Patrón, D., García-Miss, M. D. R., Álvarez-Cervera, F. J., Mut-Martín, M., Parra, I., Mendieta, L., Salgado, H., Alamilla, J., Cruz-Bojórquez, R., Ávila-Escalante, M. L., Aranda-González, I. I., & Góngora-Alfaro, J. L. (2022). Chronic Treatment with the Probiotics *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium lactis* BB12 Attenuates Motor Impairment, Striatal Microglial Activation, and Dopaminergic Loss in Rats with 6-Hydroxydopamine-induced Hemiparkinsonism. *Neuroscience*, 507, 79–98. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.11.004>

## D

David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>

Dehay, B., Bové, J., Rodríguez-Muela, N., Perier, C., Recasens, A., Boya, P., & Vila, M. (2010). Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(37), 12535–12544. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1920-10.2010>

Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M., & de Vos, W. M. (2004). *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(Pt 5), 1469–1476. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02873-0>

Di Nottia, M., Masciullo, M., Verrigni, D., Petrillo, S., Modoni, A., Rizzo, V., Di Giuda, D., Rizza, T., Niceta, M., Torraco, A., Bianchi, M., Santoro, M., Bentivoglio, A. R., Bertini, E., Piemonte, F., Carrozzo, R., & Silvestri, G. (2017). DJ-1 modulates mitochondrial response to oxidative stress: clues from a novel diagnosis of PARK7. *Clinical genetics*, 92(1), 18–25. <https://doi.org/10.1111/cge.12841>

Dias, V., Junn, E., & Mouradian, M. M. (2013). The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease*, 3(4), 461–491. <https://doi.org/10.3233/JPD-130230>

Dlugosz, A., Winckler, B., Lundin, E., Zakikhany, K., Sandström, G., Ye, W., Engstrand, L., & Lindberg, G. (2015). No difference in small bowel microbiota between patients with irritable bowel syndrome and healthy controls. *Scientific reports*, 5, 8508. <https://doi.org/10.1038/srep08508>

Du Clos T. W. (2003). C-reactive protein as a regulator of autoimmunity and inflammation. *Arthritis and rheumatism*, 48(6), 1475–1477. <https://doi.org/10.1002/art.11025>

## E

Edwards, L. L., Quigley, E. M., & Pfeiffer, R. F. (1992). Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease: frequency and pathophysiology. *Neurology*, 42(4), 726–732. <https://doi.org/10.1212/wnl.42.4.726>

El Kaoutari, A., Armougom, F., Gordon, J. I., Raoult, D., & Henrissat, B. (2013). The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nature reviews. Microbiology*, 11(7), 497–504. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3050>

## F

Fan, H. N., Zhu, P., Lu, Y. M., Guo, J. H., Zhang, J., Qu, G. Q., & Zhu, J. S. (2020). Mild changes in the mucosal microbiome during terminal ileum inflammation. *Microbial pathogenesis*, 142, 104. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104104>

Fisher, R. A., Corbet, A. S., & Williams, C. B. (1943). The Relation Between the Number of Species and the Number of Individuals in a Random Sample of an Animal Population. In *Source: The Journal of Animal Ecology* (Vol. 12, Issue 1)

## G

Gallo, A., Passaro, G., Gasbarrini, A., Landolfi, R., & Montalto, M. (2016). Modulation of microbiota as treatment for intestinal inflammatory disorders: An uptodate. *World journal of gastroenterology*, 22(32), 7186–7202. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i32.7186>

Gazerani P. (2019). Probiotics for Parkinson's Disease. *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4121. <https://doi.org/10.3390/ijms20174121>

Ge, X., Ding, C., Zhao, W., Xu, L., Tian, H., Gong, J., Zhu, M., Li, J., & Li, N. (2017). Antibiotics-induced depletion of mice microbiota induces changes in host serotonin biosynthesis and intestinal motility. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1105-4>

Gelpi, E., Navarro-Otano, J., Tolosa, E., Gaig, C., Compta, Y., Rey, M. J., Martí, M. J., Hernández, I., Valldeoriola, F., Reñé, R., & Ribalta, T. (2014). Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 29(8), 1010–1018. <https://doi.org/10.1002/mds.25776>

Generoso, J. S., Giridharan, V. V., Lee, J., Macedo, D., & Barichello, T. (2021). The role of the microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric disorders. *Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil: 1999)*, 43(3), 293–305. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2020-0987>

Gherghina, M. E., Peride, I., Tiglis, M., Neagu, T. P., Niculae, A., & Checherita, I. A. (2022). Uric Acid and Oxidative Stress-Relationship with Cardiovascular, Metabolic, and Renal Impairment. *International journal of molecular sciences*, 23(6), 3188. <https://doi.org/10.3390/ijms23063188>

Gootenberg, D. B., & Turnbaugh, P. J. (2011). Companion animals symposium: humanized animal models of the microbiome. *Journal of animal science*, 89(5), 1531–1537. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3371>

- Grondin, J. A., Kwon, Y. H., Far, P. M., Haq, S., & Khan, W. I. (2020). Mucins in Intestinal Mucosal Defense and Inflammation: Learning from Clinical and Experimental Studies. *Frontiers in immunology*, *11*, 2054. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02054>
- Gu, C., Hu, Q., Wu, J., Mu, C., Ren, H., Liu, C. F., & Wang, G. (2018). P7C3 Inhibits LPS-Induced Microglial Activation to Protect Dopaminergic Neurons Against Inflammatory Factor-Induced Cell Death *in vitro* and *in vivo*. *Frontiers in cellular neuroscience*, *12*, 400. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00400>
- Gum, J. R., Jr, Hicks, J. W., Toribara, N. W., Siddiki, B., & Kim, Y. S. (1994). Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. *The Journal of biological chemistry*, *269*(4), 2440–2446.
- Gutiérrez Hernández, A. (2024). Efecto del tratamiento con los probióticos *L. rhamnosus* y *B. lactis* en el proceso inflamatorio y cognitivo en el modelo de disbiosis intestinal-neuroinflamación (“doble golpe”) en rata. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla <https://hdl.handle.net/20.500.12371/21437H>
- Haghikia, A., Zimmermann, F., Schumann, P., Jasina, A., Roessler, J., Schmidt, D., Heinze, P., Kaisler, J., Nageswaran, V., Aigner, A., Ceglarek, U., Cineus, R., Hegazy, A. N., van der Vorst, E. P. C., Döring, Y., Strauch, C. M., Nemet, I., Tremaroli, V., Dwibedi, C., Kränkel, N., ... Landmesser, U. (2022). Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism. *European heart journal*, *43*(6), 518–533. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab644>
- Hamburger, A. E., Bjorkman, P. J., & Herr, A. B. (2006). Structural insights into antibody-mediated mucosal immunity. *Current topics in microbiology and immunology*, *308*, 173–204. [https://doi.org/10.1007/3-540-30657-9\\_8](https://doi.org/10.1007/3-540-30657-9_8)
- Han, H. S., Kang, G., Kim, J. S., Choi, B. H., & Koo, S. H. (2016). Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Experimental & molecular medicine*, *48*(3), 218. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.122>
- Hawkins, C., & Yu, L. X. (2018). Recent progress in alfalfa (*Medicago sativa* L.) genomics and genomic selection. In *Crop Journal*, *6*(6), 565–575. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.01.006>
- Hayashi, H., Takahashi, R., Nishi, T., Sakamoto, M., & Benno, Y. (2005). Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of medical microbiology*, *54*(Pt 11), 1093–1101. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45935-0>
- Heintz-Buschart, A., Pandey, U., Wicke, T., Sixel-Döring, F., Janzen, A., Sittig-Wiegand, E., Trenkwalder, C., Oertel, W. H., Mollenhauer, B., & Wilmes, P. (2018). The nasal and gut microbiome in Parkinson's disease and idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, *33*(1), 88–98. <https://doi.org/10.1002/mds.27105>
- Hempel, S., Newberry, S. J., Maher, A. R., Wang, Z., Miles, J. N., Shanman, R., Johnsen, B., & Shekelle, P. G. (2012). Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, *307*(18), 1959–1969. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.3507>
- Hill-Burns, E. M., Debelius, J. W., Morton, J. T., Wissemann, W. T., Lewis, M. R., Wallen, Z. D., Peddada, S. D., Factor, S. A., Molho, E., Zabetian, C. P., Knight, R., & Payami, H. (2017). Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, *32*(5), 739–749. <https://doi.org/10.1002/mds.26942>
- Hirsch, E. C., & Hunot, S. (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?. *The Lancet. Neurology*, *8*(4), 382–397. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70062-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70062-6)

Hu, Y., Zhao, M., Lu, Z., Lv, F., Zhao, H., & Bie, X. (2021). *L. johnsonii*, *L. plantarum*, and *L. rhamnosus* alleviated Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*-induced diarrhoea in mice by regulating gut microbiota. *Microbial pathogenesis*, *154*, 104856. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104856>

Hwang, S., Yi, H. C., Hwang, S., Jo, M., & Rhee, K. J. (2020). Dietary salt administration decreases enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (Etbf)-promoted tumorigenesis via inhibition of colonic inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21218034>

## J

Jang, Y. J., Kim, W. K., Han, D. H., Lee, K., & Ko, G. (2019). *Lactobacillus fermentum* species ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis by regulating the immune response and altering gut microbiota. *Gut microbes*, *10*(6), 696–711. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1589281>

Johansson, M. E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., & Hansson, G. C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(39), 15064–15069. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803124105>

Jones, B. V., Begley, M., Hill, C., Gahan, C. G., & Marchesi, J. R. (2008). Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(36), 13580–13585. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804437105>

## K

Kar, S. K., Jansman, A. J. M., Benis, N., Ramiro-Garcia, J., Schokker, D., Kruijt, L., Stolte, E. H., Tavernier-Thiele, J. J., Smits, M. A., & Wells, J. M. (2017). Dietary protein sources differentially affect microbiota, mTOR activity and transcription of mTOR signaling pathways in the small intestine. *PLoS one*, *12*(11), e0188282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188282>

Kawamoto, S., Maruya, M., Kato, L. M., Suda, W., Atarashi, K., Doi, Y., Tsutsui, Y., Qin, H., Honda, K., Okada, T., Hattori, M., & Fagarasan, S. (2014). Foxp3+ T Cells Regulate Immunoglobulin 103 A Selection and Facilitate Diversification of Bacterial Species Responsible for Immune Homeostasis. *Immunity*, *41*(1), 152–165. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.016>

Kelly, C. J., Zheng, L., Campbell, E. L., Saeedi, B., Scholz, C. C., Bayless, A. J., Wilson, K. E., Glover, L. E., Kominsky, D. J., Magnuson, A., Weir, T. L., Ehrentraut, S. F., Pickel, C., Kuhn, K. A., Lanis, J. M., Nguyen, V., Taylor, C. T., & Colgan, S. P. (2015). Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell host & microbe*, *17*(5), 662–671. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.03.005>

Kim, S. H., Cho, B. H., Kiyono, H., & Jang, Y. S. (2017). Microbiota-derived butyrate suppresses group 3 innate lymphoid cells in terminal ileal Peyer's patches. *Scientific reports*, *7*(1), 3980. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02729-6>

Klingelhoefer, L., & Reichmann, H. (2015). Pathogenesis of Parkinson disease--the gut-brain axis and environmental factors. *Nature reviews. Neurology*, *11*(11), 625–636. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.197>

Kuss, S. K., Best, G. T., Etheredge, C. A., Pruijssers, A. J., Frierson, J. M., Hooper, L. V., Dermody, T. S., & Pfeiffer, J. K. (2011). Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, *334*(6053), 249–252. <https://doi.org/10.1126/science.1211057>

## L

Lebouvier, T., Neunlist, M., Bruley des Varannes, S., Coron, E., Drouard, A., N'Guyen, J. M., Chaumette, T., Tasselli, M., Paillusson, S., Flamand, M., Galmiche, J. P., Damier, P., & Derkinderen, P. (2010). Colonic

biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PloS one*, 5(9), e12728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012728>

Leite, G. G. S., Weitsman, S., Parodi, G., Celly, S., Sedighi, R., Sanchez, M., Morales, W., Villanueva-Millan, M. J., Barlow, G. M., Mathur, R., Lo, S. K., Jamil, L. H., Paski, S., Rezaie, A., & Pimentel, M. (2020). Mapping the Segmental Microbiomes in the Human Small Bowel in Comparison with Stool: A REIMAGINE Study. *Digestive diseases and sciences*, 65(9), 2595–2604. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06173-x>

Lema Tomé, C. M., Tyson, T., Rey, N. L., Grathwohl, S., Britschgi, M., & Brundin, P. (2013). Inflammation and  $\alpha$ -synuclein's prion-like behavior in Parkinson's disease--is there a link?. *Molecular neurobiology*, 47(2), 561–574. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8267-8>

Lewis, B. B., Buffie, C. G., Carter, R. A., Leiner, I., Toussaint, N. C., Miller, L. C., Gouberne, A., Ling, L., & Pamer, E. G. (2015). Loss of Microbiota-Mediated Colonization Resistance to *Clostridium difficile* Infection With Oral Vancomycin Compared With Metronidazole. *The Journal of infectious diseases*, 212(10), 1656–1665. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv256>

Li, G., Yang, M., Zhou, K., Zhang, L., Tian, L., Lv, S., Jin, Y., Qian, W., Xiong, H., Lin, R., Fu, Y., & Hou, X. (2015). Diversity of Duodenal and Rectal Microbiota in Biopsy Tissues and Luminal Contents in Healthy Volunteers. *Journal of microbiology and biotechnology*, 25(7), 1136–1145. <https://doi.org/10.4014/jmb.1412.12047>

Li, J., & Tseng, G. C. (2011). An adaptively weighted statistic for detecting differential gene expression when combining multiple transcriptomic studies. *Annals of Applied Statistics*, 5(2 A), 994–1019. <https://doi.org/10.1214/10-AOAS393>

Liang, F., Chen, C. Y., Li, Y. P., Ke, Y. C., Ho, E. P., Jeng, C. F., Lin, C. H., & Chen, S. K. (2022). Early Dysbiosis and Dampened Gut Microbe Oscillation Precede Motor Dysfunction and Neuropathology in Animal Models of Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's disease*, 12(8), 2423–2440. <https://doi.org/10.3233/JPD-223431>

Lionnet, A., Leclair-Visonneau, L., Neunlist, M., Murayama, S., Takao, M., Adler, C. H., Derkinderen, P., & Beach, T. G. (2018). Does Parkinson's disease start in the gut?. *Acta neuropathologica*, 135(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1777-8>

López-Cauce, B., Puerto, M., García, J. J., Ponce-Alonso, M., Becerra-Aparicio, F., Del Campo, R., Peligros, I., Fernández-Aceñero, M. J., Gómez-Navarro, Y., Lara, J. M., Miranda-Bautista, J., Marín-Jiménez, I., Bañares, R., & Menchén, L. (2023). *Akkermansia* deficiency and mucin depletion are implicated in intestinal barrier dysfunction as earlier event in the development of inflammation in interleukin-10-deficient mice. *Frontiers in microbiology*, 13, 1083884. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1083884>

Lubomski, M., Tan, A. H., Lim, S. Y., Holmes, A. J., Davis, R. L., & Sue, C. M. (2020). Parkinson's disease and the gastrointestinal microbiome. *Journal of neurology*, 267(9), 2507–2523. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09320-1>

Lundblad, M., Vaudano, E., & Cenci, M. A. (2003). Cellular and behavioural effects of the adenosine A2a receptor antagonist KW-6002 in a rat model of l-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of neurochemistry*, 84(6), 1398–1410. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01632.x>

## M

Maldonado, R. F., Sá-Correia, I., & Valvano, M. A. (2016). Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS microbiology reviews*, 40(4), 480–493. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw007>

Martami, F., Togha, M., Seifishahpar, M., Ghorbani, Z., Ansari, H., Karimi, T., & Jahromi, S. R. (2019). The effects of a multispecies probiotic supplement on inflammatory markers and episodic and chronic migraine

characteristics: A randomized double-blind controlled trial. *Cephalgia: an international journal of headache*, 39(7), 841–853. <https://doi.org/10.1177/0333102418820102>

Michels, M., Jesus, G. F. A., Abatti, M. R., Córneo, E., Cucker, L., de Medeiros Borges, H., da Silva Matos, N., Rocha, L. B., Dias, R., Simon, C. S., Voytena, A. P. L., Rossetto, M., Ramlov, F., & Dal-Pizzol, F. (2022). Effects of different probiotic strains *B. lactis*, *L. rhamnosus* and *L. reuteri* on brain-intestinal axis immunomodulation in an endotoxin-induced inflammation. *Molecular neurobiology*, 59(8), 5168–5178. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02906-3>

Miyanishi, K., Choudhury, M. E., Watanabe, M., Kubo, M., Nomoto, M., Yano, H., & Tanaka, J. (2019). Behavioral tests predicting striatal dopamine level in a rat hemi-Parkinson's disease model. *Neurochemistry international*, 122, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.11.005>

Monville, C., Torres, E. M., & Dunnett, S. B. (2006). Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. *Journal of Neuroscience Methods*, 158(2), 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.06.001>

Mosharov, E. V., Larsen, K. E., Kanter, E., Phillips, K. A., Wilson, K., Schmitz, Y., Krantz, D. E., Kobayashi, K., Edwards, R. H., & Sulzer, D. (2009). Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron*, 62(2), 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.033>

## N

Nagasue, T., Hirano, A., Torisu, T., Umeno, J., Shibata, H., Moriyama, T., Kawasaki, K., Fujioka, S., Fuyuno, Y., Matsuno, Y., Esaki, M., & Kitazono, T. (2022). The Compositional Structure of the Small Intestinal Microbial Community via Balloon-Assisted Enteroscopy. *Digestion*, 103(4), 308–318. <https://doi.org/10.1159/000524023>

Nagpal, R., Wang, S., Solberg Woods, L. C., Seshie, O., Chung, S. T., Shively, C. A., Register, T. C., Craft, S., McClain, D. A., & Yadav, H. (2018). Comparative Microbiome Signatures and Short-Chain Fatty Acids in Mouse, Rat, Non-human Primate, and Human Feces. *Frontiers in microbiology*, 9, 2897. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02897>

Nuzum, N. D., Loughman, A., Szymlek-Gay, E. A., Teo, W. P., Hendy, A. M., & Macpherson, H. (2022). To the Gut Microbiome and Beyond: The Brain-First or Body-First Hypothesis in Parkinson's Disease. *Frontiers in microbiology*, 13, 791213. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.791213>

## O

O'Donovan, S. M., Crowley, E. K., Brown, J. R., O'Sullivan, O., O'Leary, O. F., Timmons, S., Nolan, Y. M., Clarke, D. J., Hyland, N. P., Joyce, S. A., Sullivan, A. M., & O'Neill, C. (2020). Nigral overexpression of  $\alpha$ -synuclein in a rat Parkinson's disease model indicates alterations in the enteric nervous system and the gut microbiome. *Neurogastroenterology and motility*, 32(1), e13726. <https://doi.org/10.1111/nmo.13726>

Okun, E., Griffioen, K. J., Lathia, J. D., Tang, S. C., Mattson, M. P., & Arumugam, T. V. (2009). Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain research reviews*, 59(2), 278–292. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.09.001>

Ouchi, Y., Yagi, S., Yokokura, M., & Sakamoto, M. (2009). Neuroinflammation in the living brain of Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 15 Suppl 3, S200–S204. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70814-4](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70814-4)

Oyanagi, K., Wakabayashi, K., Ohama, E., Takeda, S., Horikawa, Y., Morita, T., & Ikuta, F. (1990). Lewy bodies in the lower sacral parasympathetic neurons of a patient with Parkinson's disease. *Acta neuropathologica*, 80(5), 558–559. <https://doi.org/10.1007/BF00294619>

## P

- Pabst, O., & Slack, E. (2020). IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific. *Mucosal immunology*, *13*(1), 12–21. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0227-4>
- Palestrant, D., Holzkecht, Z. E., Collins, B. H., Parker, W., Miller, S. E., & Bollinger, R. R. (2004). Microbial biofilms in the gut: visualization by electron microscopy and by acridine orange staining. *Ultrastructural pathology*, *28*(1), 23–27.
- Panteghini M. (1990). Aspartate aminotransferase isoenzymes. *Clinical biochemistry*, *23*(4), 311–319. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(90\)80062-n](https://doi.org/10.1016/0009-9120(90)80062-n)
- Parra, I., Martínez, I., Ramírez-García, G., Tizabi, Y., & Mendieta, L. (2020). Differential Effects of LPS and 6-OHDA on Microglia's Morphology in Rats: Implications for Inflammatory Model of Parkinson's Disease. *Neurotoxicity research*, *37*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00104-z>
- Parra, I., Martínez, I., Vásquez-Celaya, L., Gongora-Alfaro, J. L., Tizabi, Y., & Mendieta, L. (2023). Neuroprotective and Immunomodulatory Effects of Probiotics in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Neurotoxicity research*, *41*(2), 187–200. <https://doi.org/10.1007/s12640-022-00627-y>
- Pissadaki, E. K., & Bolam, J. P. (2013). The energy cost of action potential propagation in dopamine neurons: clues to susceptibility in Parkinson's disease. *Frontiers in computational neuroscience*, *7*, 13. <https://doi.org/10.3389/fncom.2013.00013>
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A. E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature reviews. Disease primers*, *3*, 17013. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Pomare, E. W., Branch, W. J., & Cummings, J. H. (1985). Carbohydrate fermentation in the human colon and its relation to acetate concentrations in venous blood. *The Journal of clinical investigation*, *75*(5), 1448–1454. <https://doi.org/10.1172/JCI111847>
- Poteres, E., Hubert, N., Poludasu, S., Brigando, G., Moore, J., Keeler, K., Isabelli, A., Ibay, I. C. V., Alt, L., Pytynia, M., Ciancio, M., & Martinez-Guryn, K. (2020). Selective Regional Alteration of the Gut Microbiota by Diet and Antibiotics. *Frontiers in Physiology*, *11*, 797. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00797>
- Pouclet, H., Lebouvier, T., Coron, E., des Varannes, S. B., Rouaud, T., Roy, M., Neunlist, M., & Derkinderen, P. (2012). A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, *45*(1), 305–309. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.08.014>
- Pryde, S. E., Duncan, S. H., Hold, G. L., Stewart, C. S., & Flint, H. J. (2002). The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS microbiology letters*, *217*(2), 133–139. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11467.x>

## Q

- Qian, Y., Yang, X., Xu, S., Wu, C., Song, Y., Qin, N., Chen, S. D., & Xiao, Q. (2018). Alteration of the fecal microbiota in Chinese patients with Parkinson's disease. *Brain, behavior, and immunity*, *70*, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.02.016>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., ... Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, *464*(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Qin, L., Wu, X., Block, M. L., Liu, Y., Breese, G. R., Hong, J. S., Knapp, D. J., & Crews, F. T. (2007). Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*, *55*(5), 453–462. <https://doi.org/10.1002/glia.20467>

Qiu, K., Zhang, X., Jiao, N., Xu, D., Huang, C., Wang, Y., & Yin, J. (2018). Dietary protein level affects nutrient digestibility and ileal microbiota structure in growing pigs. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*, 89(3), 537–546. <https://doi.org/10.1111/asj.12946>

## R

Reyes, J. R., Morales, J. A. R., De Jesus Pimienta de la Torre, D., Perez, M. A. F., Morales, P. M., Garcia, A. M., & Medina, J. F. A. (2022). Diversity and structure of shadow trees associated with *Coffea arabica* L. in Soconusco, Chiapas. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 13(71), 4–27. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v13i71.1191>

Riehl, T. E., Alvarado, D., Ee, X., Zuckerman, A., Foster, L., Kapoor, V., Thotala, D., Ciorba, M. A., & Stenson, W. F. (2019). *Lactobacillus rhamnosus* GG protects the intestinal epithelium from radiation injury through release of lipoteichoic acid, macrophage activation and the migration of mesenchymal stem cells. *Gut*, 68(6), 1003–1013. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316226>

Ritzhaupt, A., Ellis, A., Hosie, K. B., & Shirazi-Beechey, S. P. (1998). The characterization of butyrate transport across pig and human colonic luminal membrane. *The Journal of physiology*, 507 (Pt 3)(Pt 3), 819–830. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.819bs.x>

Ruffmann, C., & Parkkinen, L. (2016). Gut Feelings About  $\alpha$ -Synuclein in Gastrointestinal Biopsies: Biomarker in the Making?. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 31(2), 193–202. <https://doi.org/10.1002/mds.26480>

## S

Sampson, T. R., Debelius, J. W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G. G., Ilhan, Z. E., Challis, C., Schretter, C. E., Rocha, S., Gradinaru, V., Chesselet, M. F., Keshavarzian, A., Shannon, K. M., Krajmalnik-Brown, R., Wittung-Stafshede, P., Knight, R., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*, 167(6), 1469–1480.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018>

Sancandi, M., De Caro, C., Cypaite, N., Marascio, N., Avagliano, C., De Marco, C., Russo, E., Constanti, A., & Mercer, A. (2023). Effects of a probiotic suspension Symprove™ on a rat early-stage Parkinson's disease model. *Frontiers in aging neuroscience*, 14, 986127. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.986127>

Sanz, Y., & De Palma, G. (2009). Gut microbiota and probiotics in modulation of epithelium and gut-associated lymphoid tissue function. *International reviews of immunology*, 28(6), 397–413. <https://doi.org/10.3109/08830180903215613>

Savica, R., Carlin, J. M., Grossardt, B. R., Bower, J. H., Ahlskog, J. E., Maraganore, D. M., Bharucha, A. E., & Rocca, W. A. (2009). Medical records documentation of constipation preceding Parkinson disease: A case-control study. *Neurology*, 73(21), 1752–1758. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c34af5>

Sayin, S. I., Wahlström, A., Felin, J., Jäntti, S., Marschall, H. U., Bamberg, K., Angelin, B., Hyötyläinen, T., Orešič, M., & Bäckhed, F. (2013). Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell metabolism*, 17(2), 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.003>

Schade, D. S., Shey, L., & Eaton, R. P. (2020). Cholesterol Review: A Metabolically Important Molecule. *Endocrine practice: official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*, 26(12), 1514–1523. <https://doi.org/10.4158/EP-2020-0347>

Schallert, T., Tillerson, J.L. (2000). Intervention Strategies for Degeneration of Dopamine Neurons in Parkinsonism. In: Emerich, D.F., Dean, R.L., Sanberg, P.R. (eds). *Central Nervous System Diseases. Contemporary Neuroscience*. 131-151 [https://doi.org/10.1007/978-1-59259-691-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-691-1_8)

Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P. A., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., Haapaniemi, E., Kaakkola, S., Eerola-Rautio, J., Pohja, M., Kinnunen, E., Murros, K., & Auvinen, P. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, *30*(3), 350–358. <https://doi.org/10.1002/mds.26069>

Seekatz, A. M., Schnizlein, M. K., Koenigsnecht, M. J., Baker, J. R., Hasler, W. L., Bleske, B. E., Young, V. B., & Sun, D. (2019). Spatial and Temporal Analysis of the Stomach and Small-Intestinal Microbiota in Fasted Healthy Humans. *mSphere*, *4*(2), e00126-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00126-19>

Segain, J. P., Raingeard de la Blétière, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottière, H. M., & Galmiche, J. P. (2000). Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, *47*(3), 397–403. <https://doi.org/10.1136/gut.47.3.397>

Selinger, C. P., Bell, A., Cairns, A., Lockett, M., Sebastian, S., & Haslam, N. (2013). Probiotic VSL#3 prevents antibiotic-associated diarrhoea in a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *The Journal of hospital infection*, *84*(2), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.02.019>

Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS biology*, *14*(8), e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>

Song, Z., Cai, Y., Lao, X., Wang, X., Lin, X., Cui, Y., Kalavagunta, P. K., Liao, J., Jin, L., Shang, J., & Li, J. (2019). Taxonomic profiling and populational patterns of bacterial bile salt hydrolase (BSH) genes based on worldwide human gut microbiome. *Microbiome*, *7*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0628-3>

Spielman, L. J., Gibson, D. L., & Klegeris, A. (2018). Unhealthy gut, unhealthy brain: The role of the intestinal microbiota in neurodegenerative diseases. *Neurochemistry international*, *120*, 149–163. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.08.005>

Sproston, N. R., & Ashworth, J. J. (2018). Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in immunology*, *9*, 754. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00754>

Su, D., Cui, Y., He, C., Yin, P., Bai, R., Zhu, J., Lam, J. S. T., Zhang, J., Yan, R., Zheng, X., Wu, J., Zhao, D., Wang, A., Zhou, M., & Feng, T. (2025). Projections for prevalence of Parkinson's disease and its driving factors in 195 countries and territories to 2050: modelling study of Global Burden of Disease Study 2021. *BMJ (Clinical research ed.)*, *388*, e080952. <https://doi.org/10.1136/bmj-2024-080952>

Sundin, O. H., Mendoza-Ladd, A., Zeng, M., Diaz-Arévalo, D., Morales, E., Fagan, B. M., Ordoñez, J., Velez, P., Antony, N., & McCallum, R. W. (2017). The human jejunum has an endogenous microbiota that differs from those in the oral cavity and colon. *BMC microbiology*, *17*(1), 160. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1059-6>

Surmeier, D. J., Guzman, J. N., Sanchez-Padilla, J., & Schumacker, P. T. (2011). The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Neuroscience*, *198*, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.045>

Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Bengmark, S., Scholze, J., & Doerffel, Y. (2008). Bacterial biofilm suppression with antibiotics for ulcerative and indeterminate colitis: consequences of aggressive treatment. *Archives of medical research*, *39*(2), 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2007.08.001>

## T

Takahashi, K., Nishida, A., Fujimoto, T., Fujii, M., Shioya, M., Imaeda, H., Inatomi, O., Bamba, S., Sugimoto, M., & Andoh, A. (2016). Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Digestion*, *93*(1), 59–65. <https://doi.org/10.1159/000441768>

Tamtaji, O. R., Milajerdi, A., Reiner, Ž., Asemi, Z., Dadgostar, E., Heidari-Soureshjani, R., Mamsharifi, P., Amirani, E., Mirzaei, H., Hallajzadeh, J., & Ghaderi, A. (2020). A systematic review and meta-analysis: The effects of probiotic supplementation on metabolic profile in patients with neurological disorders. *Complementary therapies in medicine*, *53*, 102507. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102507>

*The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Sixth Edition by George Paxinos and Charles Watson.* (2007). eBook ISBN: 9780080475134

Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W., & Poewe, W. (2021). Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, *20*(5), 385–397. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00030-2)

Travagli, R. A., Browning, K. N., & Camilleri, M. (2020). Parkinson disease and the gut: new insights into pathogenesis and clinical relevance. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, *17*(11), 673–685. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0339-z>

## V

Villarán, R. F., Espinosa-Oliva, A. M., Sarmiento, M., De Pablos, R. M., Argüelles, S., Delgado-Cortés, M. J., Sobrino, V., Van Rooijen, N., Venero, J. L., Herrera, A. J., Cano, J., & MacHado, A. (2010). Ulcerative colitis exacerbates lipopolysaccharide-induced damage to the nigral dopaminergic system: Potential risk factor in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, *114*(6), 1687–1700. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06879.x>

Visanji, N. P., Marras, C., Hazrati, L. N., Liu, L. W., & Lang, A. E. (2014). Alimentary, my dear Watson? The challenges of enteric  $\alpha$ -synuclein as a Parkinson's disease biomarker. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, *29*(4), 444–450. <https://doi.org/10.1002/mds.25789>

Vuik, F., Dicksved, J., Lam, S. Y., Fuhler, G. M., van der Laan, L., van de Winkel, A., Konstantinov, S. R., Spaander, M., Peppelenbosch, M. P., Engstrand, L., & Kuipers, E. J. (2019). Composition of the mucosa-associated microbiota along the entire gastrointestinal tract of human individuals. *United European gastroenterology journal*, *7*(7), 897–907. <https://doi.org/10.1177/2050640619852255>

## W

Wakabayashi, K., Tanji, K., Odagiri, S., Miki, Y., Mori, F., & Takahashi, H. (2013). The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Molecular neurobiology*, *47*(2), 495–508. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8280-y>

Wang, M., Ahrné, S., Jeppsson, B., & Molin, G. (2005). Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS microbiology ecology*, *54*(2), 219–231. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.03.012>

Wardman, J. F., Bains, R. K., Rahfeld, P., & Withers, S. G. (2022). Carbohydrate-active enzymes (CAZymes) in the gut microbiome. *Nature reviews. Microbiology*, *20*(9), 542–556. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00712-1>

Weiss, G. A., & Hennet, T. (2017). Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, *74*(16), 2959–2977. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x>

Wong, R. G., Wu, J. R., & Gloor, G. B. (2016). Expanding the UniFrac Toolbox. *PloS one*, *11*(9), e0161196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161196>

## Y

Yang, B., & Sands, J. M. (2014). Overview and historical perspective. *Sub-cellular biochemistry*, *73*, 1–5. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9343-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9343-8_1)

Yang, L., Zhou, R., Tong, Y., Chen, P., Shen, Y., Miao, S., & Liu, X. (2020). Neuroprotection by dihydrotestosterone in LPS-induced neuroinflammation. *Neurobiology of disease*, *140*, 104814. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104814>

## Z

Zeng, H., Safratowich, B. D., Wang, T. T. Y., Hamlin, S. K., & Johnson, L. K. (2020). Butyrate Inhibits Deoxycholic-Acid-Resistant Colonic Cell Proliferation via Cell Cycle Arrest and Apoptosis: A Potential Pathway Linking Dietary Fiber to Cancer Prevention. *Molecular nutrition & food research*, *64*(8), e1901014. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201901014>

Zhang, J. X., Zhou, K. G., Yin, Y. X., Jin, L. J., Tong, W. F., Guo, J., Yu, L. H., Ye, X. C., & Jiang, M. (2023). Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) prevents the neuroinflammation induced dopaminergic neurodegeneration. *Experimental Gerontology*, *171*. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2022.112037>

Zheng, B., Liao, Z., Locascio, J. J., Lesniak, K. A., Roderick, S. S., Watt, M. L., Eklund, A. C., Zhang-James, Y., Kim, P. D., Hauser, M. A., Grünblatt, E., Moran, L. B., Mandel, S. A., Riederer, P., Miller, R. M., Federoff, H. J., Wüllner, U., Papapetropoulos, S., Youdim, M. B., Cantuti-Castelvetri, I., ... Global PD Gene Expression (GPX) Consortium (2010). PGC-1 $\alpha$ , a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. *Science translational medicine*, *2*(52), 52-73. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001059>

Zheng, Z., Tang, J., Hu, Y., & Zhang, W. (2022). Role of gut microbiota-derived signals in the regulation of gastrointestinal motility. *Frontiers in medicine*, *9*, 961703. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.961703>

Zhou, Z., Sun, B., Yu, D., & Zhu, C. (2022). Gut Microbiota: An Important Player in Type 2 Diabetes Mellitus. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *12*, 834485. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.834485>