

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

**Facultad de Ciencias Químicas-
Centro de Química del Instituto de Ciencias**
Posgrado en Ciencias Químicas
Área: Bioquímica y Biología Molecular
Laboratorio de Neuroquímica



Tesis profesional

Evaluación del efecto neuroprotector del
tratamiento con los probióticos *L. rhamnosus* y
B. lactis en el modelo de hemiparkinsonismo
inducido por lipopolisacárido en rata



23 de junio del 2022

Presenta

Irving Manuel Parra Becerra

Directoras de tesis

D. C. Liliana Martínez Mendieta D. C. María Isabel Martínez García



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas- Centro de Química del Instituto de Ciencias

**Posgrado en Ciencias Químicas
Área: Bioquímica y Biología Molecular
Laboratorio de Neuroquímica**

Tesis profesional

Evaluación del efecto neuroprotector del tratamiento con los probióticos *L. rhamnosus* y *B. lactis* en el modelo de hemiparkinsonismo inducido por lipopolisacárido en rata

**para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Químicas**

Presenta

Irving Manuel Parra Becerra

Directoras de tesis

D. C. Liliana Martínez Mendieta D. C. María Isabel Martínez García

23 de junio de 2022



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por el Dr. Victorino Gilberto Serafín Alatraste Bueno, Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León, Dr. José Luis Góngora Alfaro, y la Dra. Victoria Palafox Sánchez, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Evaluación del efecto neuroprotector del tratamiento crónico con los probióticos *L. rhamnosus* y *B. lactisen* en el modelo de hemiparkinsonismo inducido por lipopolisacárido en rata”**, que presenta el alumno **Irving Manuel Parra Becerra** para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los treinta y un días del mes de mayo del año dos mil veintidós.

ATENTAMENTE

Dr. Victorino Gilberto Serafín Alatraste Bueno

Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León

Dr. José Luis Góngora Alfaro

Dra. Victoria Palafox Sánchez

En memoria de W

En cierta calle | Jorge Luis Borges

En cierta calle hay cierta firme puerta
con su timbre y su número preciso [5937]
y un sabor a perdido paraíso,
que en los atardeceres no está abierta
a mi paso. Cumplida la jornada,
una esperada voz me esperaría
en la disgregación de cada día
y en la paz de la noche enamorada.
Esas cosas no son. Otra es mi suerte:
Las vagas horas, la memoria impura,
el abuso de la literatura
y en el confín la no gustada muerte.
Solo esa piedra quiero. Solo pido
las dos abstractas fechas y el olvido.

A mis padres y hermanos

La peste [fragmento] | Albert Camus

«Pues él sabía que esta muchedumbre dichosa ignoraba lo que se puede leer en los libros, que el bacilo de la peste no muere ni desaparece jamás, que puede permanecer durante decenios dormido en los muebles, en la ropa, que espera pacientemente en las alcobas, en las bodegas, en las maletas, los pañuelos y los papeles, y que puede llegar un día en que la peste, para desgracia y enseñanza de los hombres, despierte a sus ratas y las mande a morir en una ciudad dichosa».

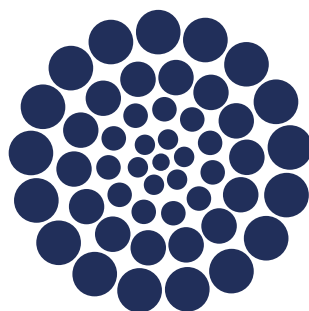
AGRADECIMIENTOS



Los sujetos experimentales fueron proporcionados por el bioterio de la **Universidad Autónoma de Yucatán**



**Fotografía por el usuario nanka de la web
shutterstock y descargada gratuitamente*



CONACYT

Al CONACyT por la beca nacional de posgrado
con CVU 1024175



Vicerrectoría de Investigación
y Estudios de Posgrado

A la BUAP por el proyecto VIEP-2021

MI ENTERA ADMIRACIÓN Y RESPETO:

A LA COMISIÓN REVISORA

D. C. Victorino Gilberto Serafín Alatraste Bueno

D. C. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León

D. C. José Luis Góngora Alfaro

D. C. Victoria Palafox Sánchez

A LAS DIRECTORAS DE LA TESIS

D. C. Lilita Martínez Mendieta D. C. Ma. Isabel Martínez García

Hastío

A los pestíferos de esta generación

Hace frío.

La noche estuvo cálida, pero en este momento siento frío. No quiero levantarme. La luz de la ventana se excede. No es posible alzar los párpados, los ojos se mueven y ven un manto arborizado rojo. La cabeza tampoco quiero moverla, mas, en un esfuerzo vano, como todos, giro el torso y quedo bocabajo. Me tapo con la almohada la cabeza y me cubro por completo. Las sábanas y cobijas y este no sé qué sensitivo de mis entrañas, en conjunto, me ofrecen mucho más que levantarme.

La mañana clara oculta tinieblas.

Mi madre golpea la puerta y grita algo, no alcanzo a distinguir las palabras —¡Ajáááá! —respondo para que no insista.

He aplazado la alarma, pero no la silencio. Sé que debo levantarme, pero me pesa hasta el infinito. Una y otra vez la aplazo, el estridente sonido, ni siquiera por molesto me obliga a levantarme. Me siento derrotado, pero lúcido, consciente de mi condición, de este espesor. No es la primera vez que me pasa, pero a veces quisiera que fuera la última, ya mediante el destierro de la mente hacia el más allá, ya por la evocación del espíritu de las obligaciones que palpitantes suenan y resuenan, estridentes, otra vez, ¡como esa maldita alarma que no quiero silenciar!, por no dormir, pero, también, por no dejar pasar el tiempo más allá de lo que se me ha dictado quedarme acostado: *inerte*.

La primera opción parece más convincente: por sencilla.

Justamente ayer, antes de acostarme, no quería hacerlo porque tenía miedo, aplazaba la hora de ir a la cama, de apagar la luz y ocultarme de las tinieblas bajo las sábanas. Hoy no me quiero levantar, quizá, por la misma razón. La oscuridad me absorbió ¿Desde cuándo?

A noche tuve el sueño nuevamente: vi a un anciano morir, triste, desahuciado. No cumplió los sueños de su juventud. La tristeza que lo acompañó toda la vida lo consumió. Al apagársele el alma, no había nada más, solo oscuridad.

Ayer por la tarde estaba convencido de que iba a conquistar el mundo al despertar.

Ayer o antier o el mes pasado o, no sé bien cuando, le regalé al mundo un código moral y un código práctico. Cómo actuar. Cómo vivir. Qué hacer para que sus facultades (no las físicas ni mentales, ojalá pudiera, sino las universitarias) obtuvieran la calidad media, al menos, para alcanzar un soplo de verdadera gloria. También les ofrecí una receta sobre cómo transmutar la realidad: basada en el amor, en la ética estética, en la estética práctica y útil. Combatí la inconsistencia de la realidad colectiva por falta de información (o de interés). Con certeza sé que compartí mis convicciones, pero no recuerdo bien para quién o para qué. Convicciones nobles, nacionales, continentales y humanas: vívidas y nobles, lúcidas e ilustres, pero ya no sé si están basadas en la realidad o a la altura de las circunstancias. No sé si encontrará oídos la reverberación del eco de mis pensamientos. Parece que todo eso que un día pensé en un hálito de soberbia estuvo siempre destinado al fracaso, al vacío, a la oscuridad misma del olvido con la que me cubro del mundo y la que oculto al mundo. El final del espíritu es el fracaso, alguien me dijo.

Hoy el mundo parece opaco.

Hace frío.

Opaco y frío. Como el Universo. Opaco y frío como el rostro de quien desde afuera mira y grita, con sonido chirriante (que es posible aplazar, pero no silenciar) que debo levantarme. Opaco y frío como como la mirada interior que susurra al oído que será imposible levantarme. Aunque susurre, y no grite, la segunda voz es más fuerte.

¡Al diablo! No quiero levantarme. No quiero conquistar el mundo. No quiero descubrir más saberes. No quiero ser político ni científico. Ni filósofo ni artista. No quiero pensar ni escribir. La carga de la conciencia es inmensa e innecesariamente pesada. Ya todo lo que existe, *Existe* y lo que es, *Es*.

¿Qué hay allá afuera que necesita que me levante?

¡Obligaciones?

¿De verdad un puñado de puntos es el estímulo más alto que puede ofrecérsese para abandonar este cómodo, pero insensato sentir de existencia? ¿Levantarme para ver a cincuenta y tantas personas con el sublime y ambicioso deseo de no ser ellos? ¡De no querer estar ahí! ¡Y yo, con el incesante deseo de ser ellos, solo por no ser yo. Solo porque lograron levantarse sin el taladrar de sus pensamientos, sin el crujir de sus huesos, sin la miseria de estar existiendo.

Al fin decido enfrentarme a las partículas de polvo flotantes en la habitación y a todas sus consecuencias. Abro lo ojos y veo un rayo de luz azul entrar apenas por la maraña de seda. Sostengo una gran bocanada de aire como si fuera la última que quedara en la tierra y la suelto como si no me importara haber dejado sin oxígeno

a todos los humanos. La realidad supera mis pensamientos. Me incorporo. Levanto el torso. Me doblo un poco y apago la alarma con la certeza de que no volverá a sonar, con la seguridad de que he dominado la gravedad. Arrojo el pesado tejido que son las sábanas, pero el entramado constructo que no me deja dormir lo llevo en la espalda, me arrastro por la espesa realidad hasta el baño. Me miro en el espejo, veo las escamas grises de mi piel, el cabello opaco, la mirada nublada. Me siento acabado, fútil.

Doy asco.

Llego a la cocina.

No hay nadie en casa. Mi padre borracho se fue al trabajo para ganar unos pesos y, con ellos, comprar más licor. Mi madre, dejó una nota: se fue a reactivar la economía, aunque esté prohibido salir. Mientras tanto yo sigo lamentando la ingrata vida de infierno.

Si tuviera que salir no cambiaría nada. Vestirme para no parecer indecente. Bañarme para no parecer vago. Estudiar para salvar a mi país del comunismo, aunque nadie sepa con precisión qué significa esa mezcla maldita de fonemas. También me han dicho que tengo que brindarle mi autonomía a una universidad que pide recursos a un gobierno neoliberal, que no rinde cuentas a nadie ¿El gobierno o la universidad? Da lo mismo, cada funcionario se siente dueño de la pequeña parcelita que le regaló el rebaño que es el pueblo y de la existencia de cada borrego que son las gentes.

Alzo la cortina. Me asomo por la ventana, veo los edificios naranjas con incomodidad. Uno de ellos tiene un nido de lodo construido por las arquitectas golondrinas. Tienen un vuelo elegante. Cantan *la canción de primavera en otoño*. Parecen inciertas esas perfectas combinaciones de rojos, negros y blancos, ese rosar de tempestuoso viento, ese revoloteo a la ida y brillar de límpidas plumas a la vuelta. Van y vienen. Ofrecen comida a sus polluelos que ni siquiera saben que existen. Si lo supieran serían conscientes de que tienen un par de alas que les permite volar, que sus vívidos colores les harían atraer más hembras, se las afeitarían y teñirían, quizá conseguirían más plumas u otros materiales para verse más pomposos, para fornicar más, para procrear más; sabrían que el planeta lo dominan aquellos individuos que no tienen colores y que no atraen hembras bailando (o no a todas, y no todos). Sabrían que morirán en algún momento y que sus crías también lo harán y que las crías de sus crías repetirán el ciclo de vaivén, de vuelo sin sentido. ¿Para qué volar? ¿Con qué fin? ¿Y si no fueran las aves y fueran los perros o los roedores o las lagartijas? ¿Verían en nosotros esclavos, amenazas o comida? Espero que sean más listos que nosotros y no nos crean dioses. Nosotros podríamos considerarnos dioses a nosotros mismos en tanto que somos capaces de modificar la realidad inmediata, pero no a otras especies, ya no más. Ni otras especies, desde luego, a nosotros ¡Jamás! Serán de sí sus propios constructores.

¡Oh! También hay un jardincito. Está muerto. Las rosas están marchitas, pero esas flores rojas de temporada empiezan a nacer. Las macetas están rotas y las cortinas que sobrevuelan las ventanas del jardín, algo desgastadas. El cielo hoy tiene un azul precioso, pero todo es ajeno, es irreal, es vano.

¿En dónde estarán mis padres? ¿Y mis hermanos? ¡Ah! ¡Sí! Mi padre se fue borracho para volver con más alcohol. Mi madre y mis hermanos a salvar la economía nacional ¿Tengo que preocuparme por ellos? ¿Ellos se preocupan por mí? Me dejan tirado cada día como un calcetín sucio, cuando no como a un perro muerto al que apenas se acercan a verterle cal para que no los moleste con el fétido olor de su presencia, de su insolencia, con la vehemencia e inconsistencia de sus reflexiones.

Me alejo de la ventana.

Veo la silla en la que he de sentarme. Esa silla existe, la ideó un carpintero o un ingeniero programó un sistema tal que construyera noventa y cinco mil idénticas a su ideal y el 5% restante se construyó a sí misma, ojalá se invirtieran los números. Ahora me siento en la silla (que existe), recargo mi espalda en el respaldo y arrojé mi cabeza al vacío. Miro al techo. —Estoy aburrido de ser yo—. Los días y las horas pasan como si no importara a quién arrasan con ellos. A pesar del tedio debo encender esa computadora, fingir que tengo un proyecto y que voy a cumplirlo frente a un monitor o una cámara o una consciencia apagada. Viviendo a la sombra del fantasma que creé.

Me enderezo apenas lo pienso, estiro el brazo y con las yemas busco, debajo del cenizo monitor, dónde oprimir un botón sumido que me permitirá ver la luz verde del hastío.

Con sus lenguas de fuego la luz de la pantalla me lleva hacia ella. Las pupilas se afilan y tomo con precisión el ratón sin ni siquiera saber exactamente en dónde se encuentra.

Como si de otra realidad se tratara, el cuerpo se hace liviano, las piernas se adormecen y la espalda se encorva. Se automatizan los movimientos (y los pensamientos).

Se cumple mi deseo: *dejé de ser Yo*.



Lineamientos Éticos y de Conducta

«Padecemos muchas dolencias, pero aspiramos a ser aquellos pueblos que redimen su dolor con la decisión inalterable de usar sus potencias en el logro de los grandes anhelos que iluminan la conciencia y ponen la conducta al servicio de la justicia, la libertad y el bien»
(Vasconcelos, 1950)

Lo expuesto aquí es creación del autor del presente *Manifiesto* motivado, en primer lugar, por la necesidad absoluta y urgente de actuar bajo lineamientos *Éticos* y *Estéticos*. Así mismo, quien escribe, fue inspirado por el primer código de ética que conoció, a saber: el del laboratorio de la asignatura de *Fisiología II* a cargo de la Doctora María Isabel Martínez García. Así, pues, justifico a continuación:

Existe un amplio margen de diferenciación entre el *Derecho* ejercido por el Estado y sus Instituciones y la *Ética*, a saber: las sanciones de orden público de lo primero, y privado, de lo segundo. Así mismo, actuar bajo los principios legales de una institución, por ejemplo, los Estatutos de nuestra Universidad o las leyes todas que emanan de la Carta Magna es sumamente fácil y estamos habituados a vivir bajo estas normas jurídicas; no ocurre lo mismo cuando hablamos acerca de los principios de la *Moral*. Queda claro que, en este momento, no debo elucubrar, por el extenso espacio y esfuerzo que requeriría, sobre mis contrariedades existenciales, ni tratar teorías que poco entiendo, mas me propuse abordar el asunto de las necesidades morales del México del tiempo en que esto fue escrito: en que se ha puesto al frente al *homo* como individuo y no al humano como colectividad y que, a la sazón, hubimos de adoptar al capitalismo artero y al materialismo vulgar por mera adaptación, pues quien no lo hiciera estaría condenado.

Los modelos aludidos, por proferir el bien material, privado e individual y el consumismo voraz (incluido el humano como objeto de consumo) han desechado todos los elementos de la alta conciencia y, en su lugar, se ha colocado al capital y a la soberbia. La crueldad y la ignominia: fatalidad de los humanos de la historia reciente y malditos nosotros que construimos nuestra propia desgracia rechazando las primicias del espíritu y disponiendo la conducta al servicio de la tiranía. Entiendo, sin embargo, lo osado que significa implicarse en la soberanía individual, mas corresponde a todos los individuos *rehacer la moral, la historia y la sociedad reforzando cada palabra con la norma que la ennoblece y con la acción que la consuma*.

Propongo, entonces, un *Utilitarismo Estético*. Primero, diremos que la *Estética*, por sí misma, tiene un ritmo compuesto, no por vibraciones estériles, sino por ondas que relacionan lo material y lo espiritual, lo humano y lo constructo. Su métrica es el *amor* y su representación física, macroscópica, la *belleza*. La *Estética*, por tanto, tal y como la expongo ha de transfigurar la realidad, hacerla bella, volverla sustancia. Debe ser el motor primero y el fin último. De esta no diremos que es una mera abstracción estéril o desinterés totalitario en la acción, sino, una *Realidad*, en la que nos movemos libremente y de la que somos enteramente partícipes, incluso, responsables. *Estética* como proyección de la imagen cruda y elevada de nuestro presente y futuro.

Lo dicho obliga a las personas responsables, conscientes y consecuentes de su realidad, de la realidad mexicana, a colaborar en las tareas superiores de nuestra época. ¡Menesterosidad urgente, por implantar en las conciencias todas el *Ideal del Deber!* El deber equivale a redimir dinámica y constantemente a la sociedad. El deber exige hallar y conservar la justicia, la paz, la libertad y el progreso para todos. El deber, pues, requiere abordar dos cuestiones fundamentales: *la rebeldía*, que no puede existir sin derroche de generoso esfuerzo y laboriosidad y la de *la luz del alma* que, con amor y compromiso, transmutará la realidad y la transformará en belleza. Con esto afirmamos que el trabajo requiere de libertad y dignidad, que garantiza la acción fructífera, que la paz necesita justicia y que toda arbitrariedad debe ser derrumbada.

Así mismo, propongo actuar bajo lo que se ha logrado llamar la *Moral Utilitaria*, no para aportarles algo a los terrenales modelos, sino para derruirlas desde su base, hacerla funcionar. Bajo esta premisa diré que, tal moral, contendrá a la *Moral de Servicio* y a la *Moral de Función*. La primera será la que dicte el servicio a la nación; a su vez, servicio, será todo aquel componente: material o constructo, que exceda al trabajo y que ha de compartirse. Con esto, en seguida se reconoce que son inútiles quienes tienen la oportunidad de aportar y, por no hacer, son equivalentes a los que destruyen; señalará, por tanto, a aquel que es útil y al que no. Para no dar torcidas interpretaciones por lo que sigue sobre el valor humano, he de aclarar que no sirven aquellos que pueden transformar su entorno social y no revolucionan; enseñar al que no sabe y no comparten la luz propia a la conciencia oscura. La segunda dirá si un sujeto dado, cumple o no con su *Función Social*, con el papel que le corresponde; no bajo el hado irrevocable, como se calendarizaba antaño, sino el que se ha designado cada uno al elegir su realidad, incluso aceptando irresponsablemente las inversiones indeseadas. Aunque debería quedar implícito, pero deseando evitar vilezas, habré de afirmar que también es inmoral aquel que todo lo tiene, ofrece migajas y se ufana de magnánimo.

Según lo dicho, un estudiante deberá estudiar y, para lograrlo con éxito tiene que descansar y cumplir sus requerimientos nutricionales según la ciencia actual, así como tener tiempo de ocio para jugar, hacer deporte, leer, realizar alguna actividad artística, en fin, todas las actividades que promuevan el desarrollo íntegro de las capacidades potenciales del humano, su naturaleza entera. No pretendo exigir desde el privilegio de quienes tienen la capacidad económica y social de lograrlo sin tropiezos, sino desde la posición indigna de múltiples estudiantes rebeldes que pueden renunciar a la precariedad. La intención de esto es tener un estado de salud óptimo para rendir los periodos de exigencia en el cumplimiento del *Ideal del Deber* según la Función que corresponde a cada uno dentro del colectivo humano y ecológico.

En el momento, pues, que algún integrante de la sociedad no cumpla con sus Funciones Morales, al mismo ritmo que estas cesan, las injusticias crecerán; dicho de otro modo: algún tipo de las injusticias nacen cuando los sujetos dejan de cumplir con su función y, por eso mismo, entorpecen las funciones del resto de los individuos. Digamos: si el Estado no da los recursos, no digo suficientes, siquiera necesarios, para que cualquier escuela tenga condiciones óptimas, o bien, salarios dignos para los Maestros, estos no podrán cumplir con las exigencias que la nación demanda y la nación exige que los niños y jóvenes aprendan. Por ello, no parece descabellado afirmar que *una vez que el maestro cumpla con su Función Moral, México empezará a civilizarse*. Para cumplir con el *Ideal del Deber*, se proyecta una infinita variedad de posibilidades, mas mi famélica capacidad me hizo apto apenas para proponer este minúsculo manifiesto con miras al derroche de esfuerzo y generosidad en virtud de la apreciación propia de la realidad en la que me he desarrollado.

El fin, como he señalado en verbo (en palabra y en la acción), es disminuir el oprobio histórico de la patria en que nos ha tocado nacer, vivir o desarrollarnos. De convertir el interés individual al colectivo. El anhelo de justicia y libertad; entender, pues, que no existe libertad individual sino no es la libertad de todos, por tanto, se

ha de preferir la libertad del colectivo para gozar de la propia; de proponer obras útiles: pensar y obrar en belleza; comprometerse con la realidad en la que nos encontramos a pesar que cada esfuerzo parezca nacido para fracasar; obrar con amor en nombre de todas las cosas a través de la Ética en la acción: lucha cuasi eterna contra las vicisitudes temporales. —Actúa con desinterés —afirma la estética tradicional, por lo mismo, propongo una *Estética Útil* porque, en patrias como la nuestra, no hacer es equivalente a destruir y es preciso el trabajo *por el triunfo de la acción libre y de la locura generosa*.

Aunque ensalzar los valores estéticos en un manifiesto que cuasipositivista parece una contradicción, la historia del hombre ha mostrado que el raciocinio absolutista ha proveído a la humanidad de deshumanismo: ahí está la importancia del retorno a los valores de la alta conciencia. Pero tampoco debe interpretarse este escrito como un humanismo antropocentrista, sino como un humanismo que vierte las capacidades de todos los humanos en salvaguardar lo que existe, incluso antes de que existiera el hombre como humano humanista: un humanismo ecocentrista si se quiere, que no busca otros planetas habitables para desechar este cuando ya no sea útil, sino para comprender el lugar que ocupa en un todo universal: *la nada*.

El tono de este manifiesto puede sonar puerilmente nacionalista y metempsicotista, mas la moral de función nos obliga a hallarnos, no solo como mexicanos, sino también como americanos, antes aun como hombres, pero sobre todo como habitantes pensantes que pueblan —acaso— el único sitio habitable de un universo exiguamente conocido; encontrarnos como humanos finitos, perecederos: que existen, pero se esfumarán como el soplo de la mañana cada día; responsables de sus tres condiciones: la creación, la construcción y la destrucción.

Según lo dicho, aunque el *Código de Conducta* presente enmarca el comportamiento dentro del *Laboratorio de Neuroquímica* durante la trayectoria de realización de tesis, servicio social o prácticas profesionales, el actuante deberá esforzarse por extrapolarlo a las situaciones todas que se presenten a lo largo de su vida y legado. Por ello, se expide:

Primero: el portador de este código debe concebir a la Ética como una *Estética de la Conducta*.

Segundo: el Código de Conducta tiene la finalidad de crear o fortalecer una conducta ética, responsable y tolerante en el actuante.

Tercero: los principios o valores que regirán al portador del *Código de Conducta*, en orden alfabético, son: autocrítica, compasión, compromiso, crítica, equidad, esfuerzo, estética, ética, honestidad, justicia, mejora continua, patriotismo, pulcritud, respeto, responsabilidad, solidaridad y tolerancia.

Cuarto:

i. *El único compromiso inherente al investigador no es más que su encuentro desinteresado con la verdad;* por tanto, el alumno, no deberá cometer fraudes de naturaleza alguna y no modificará los datos obtenidos. Toda vez que se modifique algún dato en la bitácora de experimentos, deberá escribirse el dato correcto con el nombre y la firma de quien autorizó dicho cambio. De ser necesario, deberá escribirse una breve justificación. El único permitido para autorizar los cambios es el dueño de la bitácora. De no hacerlo, se estará faltando al presente Código.

ii. *Vivir bajo los principios morales es complicado, mas desarrollarlos o perfeccionarlos, impulsa el desarrollo cabal de las capacidades del actuante y la transformación de las realidades sociales.* En este sentido, el portador de este código ha de tener, mínimo, las siguientes funciones, a saber: de estudiante, de aprendiz y, a largo plazo, de joven investigador. El portador debe cumplir con sus funciones. Tales como: estudiar, aprender a aprender, investigar, enseñar, preguntar, proponer, participar en actividades de difusión, asistir activamente a los seminarios, y lo que se trata en adelante.

iii. *En esta realidad, la verdad y la perfección son inalcanzables; sin embargo, el estudiante deberá esforzarse por estar, cada día, más cerca de estos mejorando continuamente: pasando de lo eficiente a lo eficaz, tanto en el desarrollo de las técnicas, el rendimiento de los reactivos utilizados y en los métodos de estudio y trabajo.*

iv. *La crítica solo es justificable cuando se basa en los más nobles sentimientos de amor y compasión (o lo que es lo mismo, de justicia, con que se auxilia a los demás, a fin, de que cumplan su función), así como en el deseo de superar aquello que se señala. Por esta razón deberán tolerarse las recomendaciones hechas por los estudiantes y profesores; se asumirán las responsabilidades necesarias y se actuará con el fin de mejorar lo indicado. También deberá tolerarse, si, en el transcurso de la mejora continua, existen dudas; de hecho, se desea que existan muchas y puedan resolverse colectiva o individualmente.*

v. *El respeto y la dignidad subyacen la convivencia en entre individuos. Así, el estudiante deberá reservarse de ocupar espacios en horarios apartados por otros estudiantes, a reserva de que exista mutuo acuerdo. Deberá mantener su área de trabajo limpia y ordenada. Deberá dejar el material utilizado limpio y disponible para otros usuarios. Deberá acomodar el material seco que se encuentre en el escurridor o estufa de secado. Deberá acomodar las toallas y jergas del cuarto de lavado. Solicitar aserrín y agua cuando sea necesario. El alumno debe evitar tomar las cosas que no son suyas ni moverlas de su lugar habitual sin previa autorización. No deberá entrometarse en los experimentos de otros; solo será permitido si el otro experimentador está de acuerdo. Basados en el hecho de que todos aspiran a alcanzar la perfección en su campo de estudio y todos tienen vastas limitaciones, bajo ninguna circunstancia habrá comparaciones categóricas o clasistas entre los estudiantes, esto es: todos los estudiantes tendrán el mismo valor humano. De más aplicables que contribuyan al desarrollo de las actividades normales en el laboratorio.*

vi. *Los sujetos experimentales, tal como las revoluciones sociales, son un mal necesario. Ambas acciones, aunque deleznable, debido a los miles de millones de sacrificios, siempre que tengan un fin noble y eterno favorecen al progreso de las naciones. Por esta razón, los sujetos de experimentación no tendrán otra función más que fungir como lo señalado; no por mezquindad, pues la investigación, basada en principios como los que, quien escribe, propone; busca la verdad, así como el desarrollo de las patrias y de la humanidad y el mantenimiento de sus recursos. En este sentido: los sujetos experimentales jamás deberán ser tratados como mascotas, tampoco con crueldad o desprecio; por ello deberán ser atendidos como sujetos con una de las funciones más puras aun fundamentales en el proceso investigativo y la obtención de datos. Estos desconocen las temporalidades humanas, así, si existe una festividad humana que se traslape con el aseo o tratamiento del sujeto experimental, deberá, en todo momento, dar prioridad a las necesidades del animal. Jamás deberán eludirse los tratamientos y cuidados. Cada día, antes de abandonar el vivario, el alumno deberá dirigirse al vivario y revisar, uno a uno, la cantidad de bebida y alimento que tengan; si alguno, sin importar si es suyo o no, deberá servirles lo que necesiten (a reserva que el protocolo de investigación lo restrinja). Deberá evitarse hacer sufrir o estresar innecesariamente a estos sujetos. Aun, al sacrificarlos, sus cuerpos deberán ser tratados dignamente.*

Irving Parra

Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	I
HASTÍO.....	V
LINEAMIENTOS ÉTICOS Y DE CONDUCTA.....	VII
RESUMEN.....	XVI
PROLEGÓMENOS	1
SISTEMA INMUNE	2
Las células del sistema inmune.....	2
Hematopoyesis.....	3
Respuesta inmune innata	5
Activación de la inflamación	6
Los macrófagos y la resolución de la inflamación	9
Polarización de los monocitos/macrófagos.....	9
Resolución de la inflamación	12
Lípidos e inflamación.....	14
El sistema inmune innato del SNC: la microglía.....	18
La polarización microglial	20
EL INTESTINO	22
Inervación intestinal	24
El tejido linfoide asociado al tubo digestivo (GALT).....	26
La microbiota	27
Los probióticos	30
EJE MICROBIOTA-INTESTINO-CEREBRO	31
INTRODUCCIÓN	33
LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	34
La marcha, su evaluación clínica y la EP.....	36
La disbiosis en la EP	39
Los probióticos en modelos experimentales de EP	39
Modelos experimentales para la EP	39
Evidencia preclínica de los probióticos en el contexto de la EP	41
JUSTIFICACIÓN	45
HIPÓTESIS	47
OBJETIVOS	47
OBJETIVO GENERAL.....	48
OBJETIVOS PARTICULARES	48
DIAGRAMA DE TRABAJO.....	49
METODOLOGÍA	51
SUJETOS EXPERIMENTALES.....	52
Cirugía estereotáxica	53
Tratamiento probiótico	54
MODELO DEL CILINDRO	54
MODELO DE LA VIGA ELEVADA DE EQUILIBRIO	55
Consideraciones.....	56
Parámetros por evaluar	56

PROCESAMIENTO DE HISTOLÓGICO	58
Inmunohistoquímica	58
Procesamiento de imagen.....	60
Morfometría de subtipos microgliales.....	60
PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO	61
RESULTADOS.....	62
EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO CON EL PROBIÓTICO NO MODIFICA LA ASIMETRÍA MOTORA INDUCIDA POR LPS.....	63
EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO CON EL PROBIÓTICO NO MODIFICA EL CRECIMIENTO NORMAL DE LOS ANIMALES NI LA COORDINACIÓN MOTORA	64
EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO CON EL PROBIÓTICO PREVIENE EL EMPEORAMIENTO DE LAS AFECTACIONES MOTORAS CAUSADAS POR EL LPS	65
EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO CON EL PROBIÓTICO PREVIENE EL EMPEORAMIENTO DEL CICLO DE PASO EN EL CRUCE DE LA VIGA.....	67
EL LPS NO MODIFICA LA LONGITUD DE LAS ZANCADAS CONTRALATERALES ENTRE GRUPOS, PERO INCREMENTA POSITIVAMENTE EL PASO DE IMPRESIÓN	68
EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO CON EL PROBIÓTICO NO PREVIENE LA DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA EN LA SNPC	69
EL EL PROBIÓTICO Y ACEITE DE GIRASOL PREVIENEN LA MICROGLIOSIS ESTRIATAL.....	70
EL PROBIÓTICO NO MODIFICA LA MICROGLIOSIS EN LA SNPC	71
EL PROBIÓTICO CAUSA LA DISMINUCIÓN DE LAS CÉLULAS EN ESTADO AMEBOIDE Y ACTIVADO EN EL ESTRIADO	72
EL PROBIÓTICO NI EL ACEITE DE GIRASOL MODIFICAN LOS ESTADOS DE ACTIVACIÓN GENERADOS POR EL LPS EN LA SNPC	74
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	76
CONCLUSIONES.....	84
PERSPECTIVAS	84
REFERENCIAS	86
ANEXOS.....	95

Contenido gráfico

FIGURA 1. ONTOGÉNESIS DE LOS MACRÓFAGOS DE RATONES Y HUMANOS	4
TABLA 1. LAS BARRERAS FÍSICAS COMO PARTE DEL SISTEMA INMUNE INNATO	5
FIGURA 2. Respuesta inmune.....	7
FIGURA 3. ESPECTRO DE ACTIVACIÓN MACROFÁGICA.....	11
FIGURA 4. INFLAMACIÓN Y RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN.....	13
FIGURA 5. LÍPIDOS E INFLAMACIÓN.....	15
FIGURA 6. MICROGLIOGÉNESIS Y FUNCIONES DE LA MICROGLÍA EN REPOSO.....	19
FIGURA 7. CAPAS DE TRACTO GASTROINTESTINAL.....	23
FIGURA 8. INERVACIONES INTESTINALES	25
FIGURA 9. TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A LA MUCOSA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL	27
FIGURA 10. LA COMUNICACIÓN ENTRE LA MICROBIOTA Y EL CEREBRO	29
FIGURA 11. SÍNTOMAS CLÍNICOS ASOCIADOS CON LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	35
FIGURA 12. MECANISMO DE TOXICIDAD DEL LIPOPOLISACÁRIDO	40
TABLA 2. EVIDENCIA PRECLÍNICA DE LOS PROBIÓTICOS EN EL CONTEXTO DE LA EP.....	43
TABLA 2. EVIDENCIA PRECLÍNICA DE LOS PROBIÓTICOS EN EL CONTEXTO DE LA EP. <i>CONTINUACIÓN</i>	44
FIGURA 13. SUJETOS EXPERIMENTALES	52
FIGURA 14. CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA.....	53
FIGURA 15. EL MODELO DE LA VIGA ELEVADA Y LOS PARÁMETROS EVALUADOS	55
FIGURA 15. EL MODELO DE LA VIGA ELEVADA Y LOS PARÁMETROS EVALUADOS. <i>CONTINUACIÓN</i>	57
FIGURA 16. DESCRIPCIÓN GRÁFICA DEL PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO, INMUNOHISTOQUÍMICO Y DE IMAGEN.....	59
FIGURA 17. MORFOMETRÍA MICROGLIAL.....	60
FIGURA 18. EL TRATAMIENTO CON EL PROBIÓTICO NO MODIFICA LA ASIMETRÍA MOTORA INDUCIDA POR LPS	63
FIGURA 19. EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO CON EL PROBIÓTICO NO MODIFICA EL CRECIMIENTO NORMAL DE LOS ANIMALES NI LA COORDINACIÓN MOTORA	64
FIGURA 20. EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO CON EL PROBIÓTICO PREVIENE EL EMPEORAMIENTO DE LAS AFECTACIONES MOTORAS CAUSADAS POR EL LPS.....	66
FIGURA 21. EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO CON EL PROBIÓTICO PREVIENE EL EMPEORAMIENTO DEL CICLO DE PASO....	67
FIGURA 22. EL LPS NO MODIFICA LA LONGITUD DE LAS ZANCADAS CONTRALATERALES ENTRE GRUPOS, PERO INCREMENTA POSITIVAMENTE EL PASO DE IMPRESIÓN.....	68
FIGURA 23. EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO CON EL PROBIÓTICO NO PREVIENE LA DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA EN LA SNPC.....	69
FIGURA 24. EL PROBIÓTICO Y EL ACEITE DE GIRASOL PREVIENEN LA MICROGLIOSIS ESTRIATAL.	70
FIGURA 25. EL PROBIÓTICO NI EL ACEITE DE GIRASOL PREVIENEN LA MICROGLIOSIS NIGRAL.....	71
FIGURA 26. PROBIÓTICO CAUSA LA DISMINUCIÓN DE CÉLULAS EN ESTADO AMEBOIDE Y ACTIVADO Y EL ACEITE DE GIRASOL ÚNICAMENTE DE CÉLULAS EN ESTADO ACTIVADO EN EL NÚCLEO ESTRIADO	73
FIGURA 27. EL PROBIÓTICO O EL ACEITE DE GIRASOL NO MODIFICAN LOS ESTADOS DE ACTIVACIÓN GENERADOS POR EL LPS	75

ABREVIATURAS

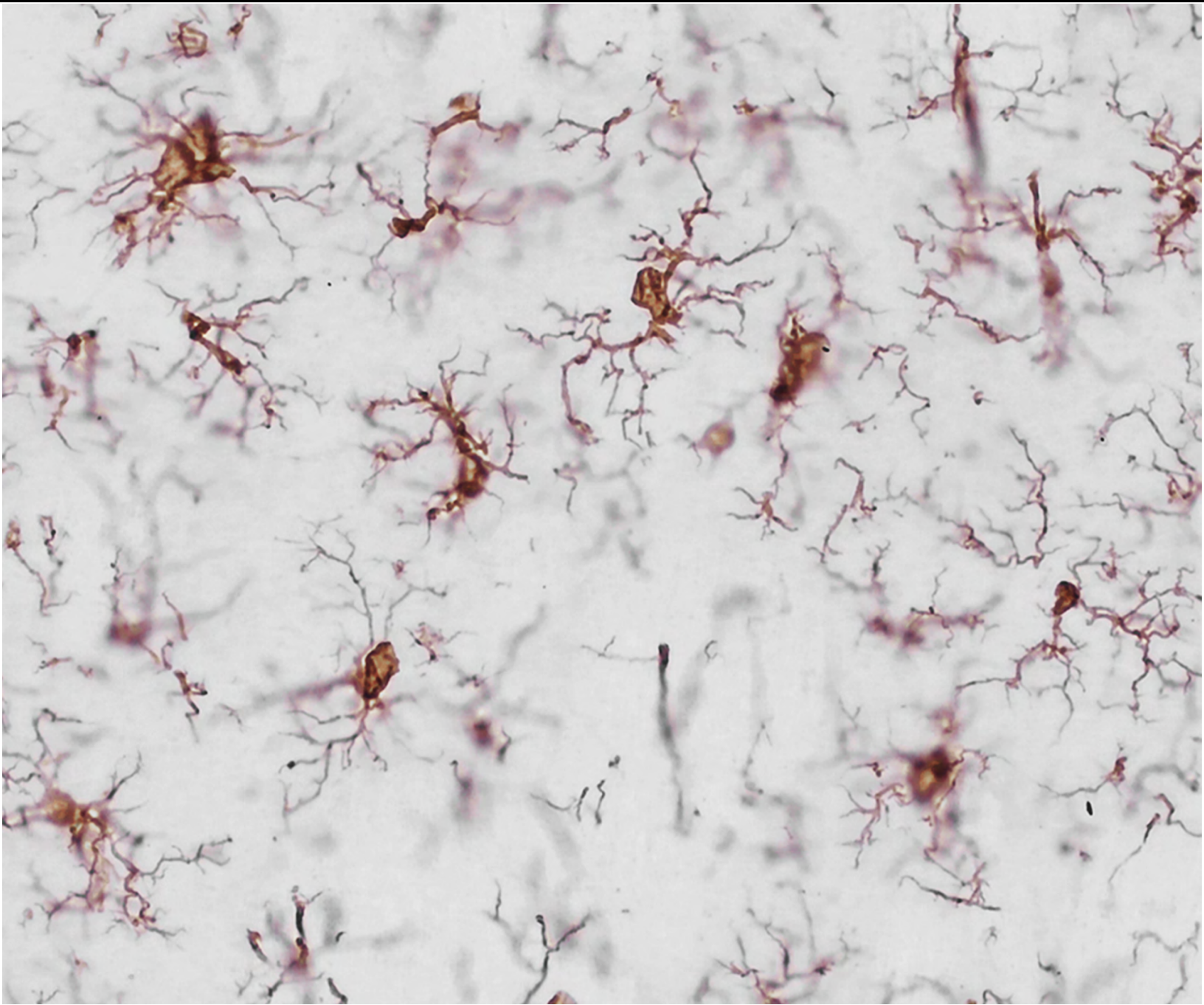
- 5HT:** 5-hidroxitriptamina
6-OHDA: 6-hidroxi-dopamina
AA: ácido araquidónico
AGCC: ácidos grasos de cadena corta
AGE: aceite de girasol + vitamina E
AGM: aorta-gónadas-mesonefros
AP: anteroposterior
BHE: barrera hematoencefálica
CD: grupo denominativo
CLR: receptores similares a la lectina del tipo C
COX: ciclooxigenasa
CSF-1: factor estimulante de colonia
CSF-1R: factor estimulante de colonia
CX3CR1: receptor quimiocinas
DA: dopamina
DAB: diaminobencidina
DAérgico: dopaminérgico
DAMP: patrones moleculares asociados a daño
DAT: transportador de dopamina
DHA: ácido docosahexaenoico
Dp: día posterior
Dpa: día posterior a la administración
Dpc: día posterior a la cirugía
Dpi: día posterior a la inyección
DV: dorsoventral
E: día embrionario
EGR1: proteína de respuesta de crecimiento temprano 1
EMP: progenitores eritromieloides
EP: Enfermedad de Parkinson
EPA: ácido icosaenoico
FCR: receptor de la fracción cristalizante del anticuerpo
FCRLS: receptor FC tipo S
FFAR: receptores de ácidos grasos libres
FL: hígado fetal
GABA: ácido γ -aminobutírico
GALT: tejido linfóide asociado a TGI
GCLC: glutamato-cisteína ligasa recombinante
GLP-1: péptido semejante a glucagón
GLP-1R: receptor del péptido semejante a glucagón
GM-CSF: factor estimulante de colonia granulocito macrófago
GPCR: receptor a proteína G
GSH-Px: glutatión peroxidasa
HETE: ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico
HLA: antígeno leucocitario humano
HO1: hemooxigenasa-1
HPETE: ácido 5-hidroperoxi-eicosatetraenoico
HSC: células madre hematopoyéticas inmaduras
HYA: ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico
IBA-1: molécula adaptadora de unión a calcio ionizado-1
IHC: inmunohistoquímica
IL: interleucina
INF: interferón
IRF8: interferón 8
Keto-c: ácido 10-oxo-trans-11-octadecenoico
LBP: proteínas de unión a LPS
LOX: lipooxigenasa
LPS: lipopolisacárido
LT: leucotrieno
LX: lipoxina
M: magrófago
MALT: tejido linfático asociado a mucosa
Mar: maresina
MEF2A: factor potenciador específico de miocitos 2A
MFB: haz del cerebro anterior
ML: mediolateral
MNS: motoneuronas superiores
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NET: netosis
NGS: suero de cabra normalizado
Nk: células asesinas naturales
NLR: receptores tipo NOD
NMI: motoneuronas inferiores
OxPhos: fosforilación oxidativa
P: probiótico
P2RY12: P2Y purinoceptor 12
PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos
PBS: buffer de fosfato sódico
PFA: paraformaldehído
PG: prostaglandinas
PLA2: enzima fosfolipasa A2
PM: área premotora
PPP: vía de las pentosas fosfato
PRR: receptores con patrones de reconocimiento
RLR: receptores tipo RIG
RNS: especies reactivas de nitrógeno
ROS: especies reactivas de oxígeno
RV: resolvinas
SALL1: proteína similar a Sal 1
SE: sujeto (s) experimental (es)
SIGLECH: ácido siálico que se une a lectina H similar a Ig
SMA: área motora suplementaria
SN: *substantia nigra*
SNA: sistema nervioso autónomo
SNC: sistema nervioso central
SNE: sistema nervioso entérico
SNP: sistema nervioso parasimpático
SNpc: *substantia nigra pars compacta*
SNpr: *substantia nigra pars reticulata*
SNS: sistema nervioso simpático
SOD: superóxido dismutasa
TAM: macrófagos asociados a tumores
TCAc: ciclo del ácido tricarbóxico
TDC: tirosina descarboxilasa
TGF: factor estimulante de crecimiento
TGI: tracto gastrointestinal
TH: tirosina hidroxilasa
TLR: receptores tipo *toll*
TMEM119: proteína transmembrana 119
TNF: factor de necrosis tumoral
Tx: Tritón-100x
TX: tromboxano
UFC: unidad formadora de colonia
Wpc: semana posterior a la fertilización
YS: saco vitelino

Resumen

Evidencia ha demostrado la íntima relación entre el cerebro, el intestino y la microbiota, así como que la disbiosis es un factor importante en la alteración del estado de salud. Por ello, las hipótesis actuales han situado a la microbiota como un componente esencial en el desarrollo de los sistemas nervioso e inmunológico, así como en el mantenimiento y recuperación de las funciones naturales de los organismos. Existen pocos estudios que demuestren la acción protectora de los probióticos en modelos animales de enfermedad de Parkinson (EP) utilizando tanto *Bifidobacterium animalis* ssp lactis Bb12 como *Lactobacillus rhamnosus* GG. En este estudio, se evaluaron los efectos de una mezcla de dos probióticos, *Bifidobacterium animalis* ssp lactis Bb12 y *Lactobacillus rhamnosus* GG (en un probiótico comercial: Microbiot®) sobre la neuroprotección y neuromodulación de la morfología de la microglía, así como sobre el comportamiento motor de ratas hemiparkinsonianas. Ambos probióticos *B. lactis* Bb12 y *L. rhamnosus* GG [1×10^9 UFC cada cepa en 300 μ L de Microbiot®] se administraron por vía oral una vez al día durante 15 días antes de la inyección estriatal de lipopolisacárido (LPS) mediante cirugía estereotáxica. El modelo animal LPS de EP conduce a deficiencias motoras 14 días después de la lesión. Se evaluó el comportamiento motor como la asimetría motora (18 días antes de la lesión, mismo día de la cirugía y 14 días después de la lesión) en el cilindro y la coordinación motora en el modelo de la viga (a los 15 y 8 días antes de la lesión y 7 y 13 días después de la lesión). Además, se realizó la cuantificación de neuronas TH positivas en la sustancia negra pars compacta (SNpc) y células Iba-1 positivas en el estriado dorsolateral y SNpc. Los resultados mostraron que los animales con lesión estriatal LPS y tratados con probióticos o vehículo (aceite de girasol + vitamina E; AGE) tienen disfunción de la extremidad anterior contralateral en el modelo de cilindro, lo que significa que los probióticos no modificaron el comportamiento de asimetría. Por el contrario, los probióticos reducen eficazmente el déficit de marcha con la extremidad trasera contralateral en la prueba de la viga. Además, nuestros hallazgos indican que la neurodegeneración en el SNpc no fue prevenida por el tratamiento probiótico profiláctico. Sin embargo, el tratamiento con probiótico provoca un bajo grado de activación de la microglía en comparación con el LPS. En conclusión, encontramos que el tratamiento profiláctico con la mezcla de los dos probióticos (*B. lactis* Bb12 y *L. rhamnosus* GG) mejora la coordinación motora en el punto alto de inflamación por LPS al tiempo que reduce la activación de la microglía, por lo que estos hallazgos sugieren explorar nuevas estrategias con esta mezcla de probióticos para evitar la neurodegeneración en la EP.

Palabras clave: probióticos; inflamación; lipopolisacárido; microglía; Enfermedad de Parkinson.

1. PROLEGÓMENOS



Sistema inmune

La inmunología es una rama de las ciencias biológicas que se ocupa del estudio del sistema inmune. El sistema inmune es el conjunto de órganos, tejidos, células y moléculas que tienen como función reconocer los elementos propios de un organismo y distinguirlos de los ajenos. Además, el sistema inmunológico provee de protección contra algunos agentes o procesos químicos (v. gr. desregulación de pH sanguíneo), físicos (p. ej. golpes y quemaduras leves) y biológicos (como microorganismos, tejidos y órganos ajenos), mediante un par de acciones vinculadas: el reconocimiento y la reacción (Abbas et al., 2015; Owen et al., 2014).

El sistema inmune consta de dos partes: el sistema inmune innato y sistema inmune adquirido (o adaptativo). Se dice que el sistema inmune adquirido tiene memoria, ya que, luego de un primer contacto con alguna estructura química, aunque lenta en la acción, capacita a las células del sistema inmune para ‘recordar’ dicha disposición molecular para, luego, durante un contacto ulterior, reaccione más rápida, intensa y eficazmente que durante el primer contacto. Por otro lado, la respuesta innata es estereotipada pues reconoce patrones proteicos con disposiciones moleculares semejantes entre distintas especies y carecen de la forma de memoria asociada con la inmunidad adaptativa o la capacidad de responder de una manera mejorada ante encuentros posteriores con la misma sustancia extraña. Estas características causan que el sistema innato sea capaz de detectar y reaccionar inmediatamente ante un suceso de invasión o de daño, pero no mejorará la capacidad de reacción ante eventos semejantes (Abbas et al., 2015; Immunopedia, 2022; Owen et al., 2014).

La inmunidad, pues, tal y como se ha tratado al sistema inmune, es el estado de protección contra el daño celular, es decir, que ha evolucionado para mantener la homeostasis y el estado de salud de los organismos que lo poseen. Sin embargo, por razones independientes a la evolución de este, es decir: la susceptibilidad genética y el medio ambiente, el sistema inmune puede llegar a desregular su actividad normal y llevarla a mantener un estado de activación constante (crónico), dejar de reconocer lo propio de lo extraño o de suprimirse.

Las células del sistema inmune

Los componentes de la respuesta inmune celular son los macrófagos tisulares especializados, que se establecen en diferentes tejidos (piel, hígado, cerebro, pulmones, etc.) durante la etapa embrionaria de los organismos y que son producidos en órganos hematopoyéticos provisionales, proceso que ha sido bien descrito en roedores (Prinz et al., 2014; 2017). En la respuesta inmune celular también participan células de diferentes estirpes celulares provenientes de una única célula troncal con capacidad de autorrenovación y diferenciación: la célula madre hematopoyética (HSC; del inglés *Hematopoietic stem cell*), que se compromete hacia un linaje mieloide o linfoide que, en un microambiente complejo, origina células maduras con capacidades de diferenciación fenotípica, de motilidad y de comunicación.

Las células maduras provenientes del linaje mieloide son las células mononucleadas (monocitos y células dendríticas clásicas o plasmotoides) y los polimorfonucleares (los neutrófilos, los basófilos y los eosinófilos) y los del origen linfoide son los linfocitos y las células asesinas naturales (NK; del inglés, *natural killer*). Estas células se originan en la médula ósea, tienen capacidades migratorias: circulan por la linfa y la sangre, viajan entre el tejido conectivo y se establecen en diversos órganos. Además, son capaces de comunicarse con otras células y de responder a señales de daño tisular y a la invasión de tejidos y células ajenas al organismo mediante la producción y recepción de proteínas solubles (Pavón-Romero et al., 2021; Wang & Wagers, 2011).

Hematopoyesis

La hematopoyesis es la formación de células sanguíneas. En ratones y humanos inicia en la etapa temprana posfecundación, durante el desarrollo embrionario. Se producen, al menos, tres fases, temporalmente traslapadas, de surgimiento hematopoyético. La primera es denominada *hematopoyesis primitiva*: comienza, durante el día embrionario número 7 en roedores (E7; en humanos, alrededor de la tercera o cuarta semana de gestación), en la placa posterior del mesodermo, específicamente en las islas sanguíneas del saco vitelino, en donde surgen células identificadas como RUNX1+; y en E7.5 comienzan a surgir los progenitores eritromieloides (EMP, del inglés: *erythromyeloid precursors*). Estos progenitores divergen hacia células eritroides nucleadas y macrófagos derivados del saco vitelino (YS, del inglés: *yolk sac*) que, a su vez, originan el estadio A1 identificado por tener el grupo denominativo 45 (CD45, del inglés: *cluster designation*), pero no marcadores mieloides. Más adelante en el tiempo, se originan células en el estadio A2, que, entre otras proteínas, presentan metaloproteinasas 8 y 9 (MPP8 y MPP9), proteína relacionada con la migración; por lo que se piensa que estas células son macrófagos que pueblan todos los tejidos del organismo, es decir, los macrófagos tisulares especializados.

La segunda fase hematopoyética, llamada: *transitoria definitiva*, que inicia hacia E8.25: comienza en el endotelio hemogénico del YS que genera EMP secundarios dependientes de un factor de crecimiento llamado MYB. El saco vitelino continúa generando macrófagos del YS como una segunda ola de macrófagos tisulares y, a su vez, algunas células, durante E9, migran al hígado fetal en donde se establecen y proliferan. Además, cercano a E10, inician la expresión del receptor al factor estimulante de colonia 1 (CSF1R, del inglés: *colony stimulating factor 1 receptor*) que es señalado como un marcador de células de linaje mieloides. En E12.5, los progenitores mieloides se diferencian en monocitos del hígado fetal: F4/80^{lo}CD11b^{hi} y tienen una alta capacidad proliferativa. Además de los macrófagos, en el hígado fetal, se producen los progenitores de las células de Langerhans que migran hacia la epidermis. En E14.5, una gran cantidad de monocitos del hígado fetal migran hacia todos los tejidos excepto al cerebro, en donde, hacia el E13.5, la barrera hematoencefálica (BHE) comienza a formarse, esto es: los monocitos del hígado fetal se convierten en macrófagos tisulares no microgliales, y se mezclan entre los macrófagos derivados del YS al punto que es imposible distinguirlos en la etapa adulta. En humanos, los macrófagos del YS migran al hígado fetal durante la quinta semana de gestación y la hematopoyesis del hígado fetal se mantiene hasta las semanas 20 a 24 y luego migran y colonizan el bazo y timo fetales.

Durante E8.5 en roedores y en la cuarta semana de gestación en humanos, inicia la tercera fase hematopoyética, designada como: *hematopoyesis definitiva*. En esta se generan HSC inmaduras del endotelio hemogénico en la región esplenopleural paraaórtica y en E10.5, de dichas zonas, se forman las regiones: mesonefros-gónada-aorta (AGM, del inglés: *aorta-gonad-mesonephros*), las cuales, durante E11-E12 (en humanos 5 semanas gestacionales), bien, contribuyen a la producción de monocitos del hígado fetal y placenta, o bien, se generan HSC maduras. La hematopoyesis, ulteriormente, hacia E14 se desplaza al bazo y luego en dirección a la médula ósea durante E18, aunque, la hematopoyesis esplénica se mantiene aún después del nacimiento. En humanos las HSC migran a la médula ósea durante el segundo trimestre gestacional. De esta forma, la hematopoyesis se mantiene en los huesos largos y mantienen la gran mayoría de la formación de células hemáticas, en donde las células madre se comprometen con un linaje celular específico (mieloides o linfoides) y la hematopoyesis extramedular multilínea es insignificante, excepto en casos de patología (Ginhoux & Guillems, 2016; Li & Barres, 2018; Prinz et al., 2017; Wang & Wagers, 2011) (**FIGURA 1**).

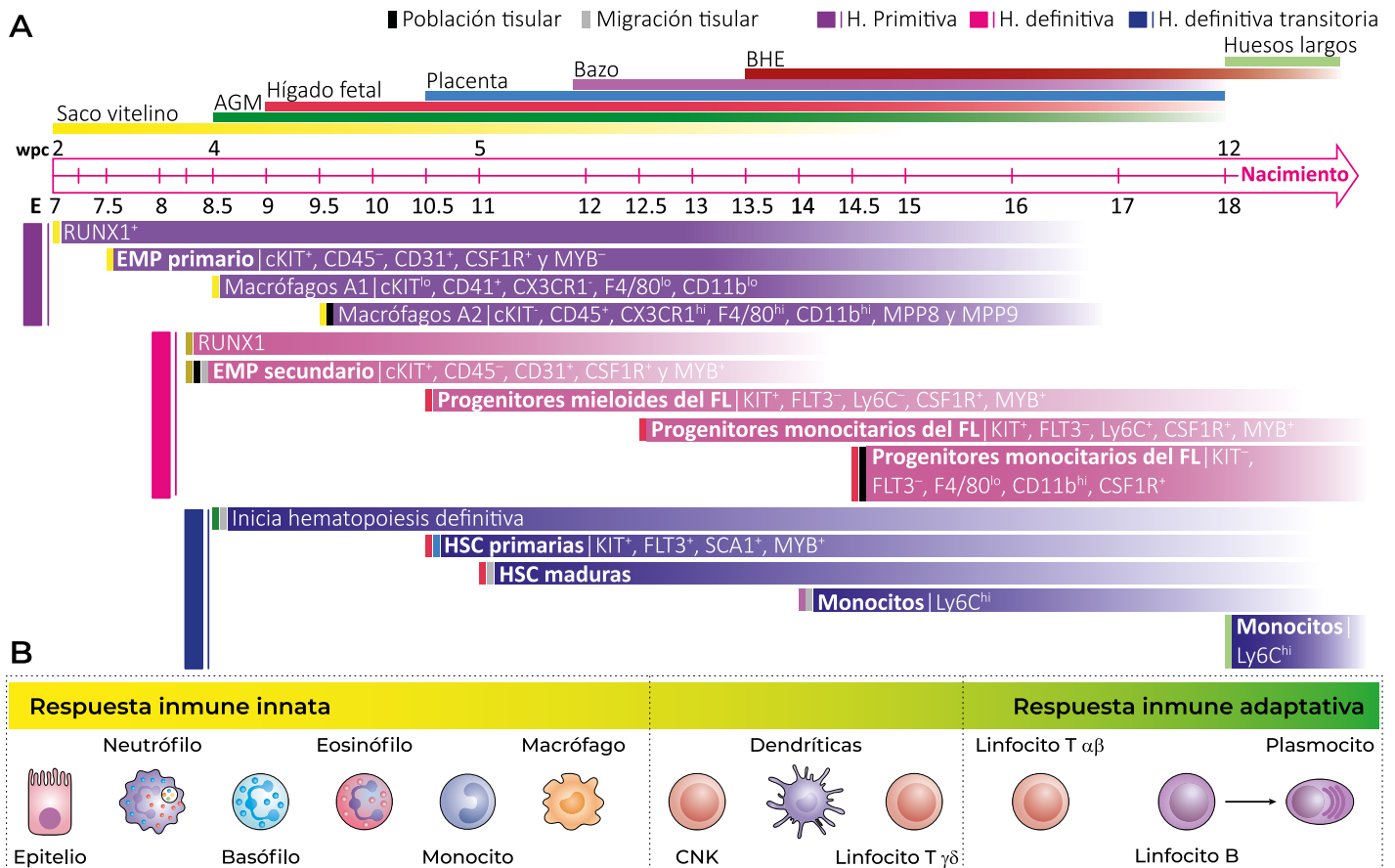


FIGURA 1. ONTOGÉNESIS DE LOS MACRÓFAGOS DE RATONES Y HUMANOS.

La hematopoyesis se inicia en diversos momentos y lugares durante el desarrollo de los mamíferos. Esta figura representa las ubicaciones anatómicas de las que emergen las células hematopoyéticas primitivas y su transición a diversos órganos hematopoyéticos. Sobre la línea del tiempo se muestra el momento del surgimiento de órganos hematopoyéticos y la BHE; las barras representan la duración de la hematopoyesis en ese tejido u órgano. Debajo de la línea del tiempo se indican las olas hematopoyéticas de novo; las señaléticas superiores indican el sitio de origen hematopoyético y, en especial, la barra negra indica la distribución a todos los tejidos embrionarios y la barra gris migración hacia tejidos hematopoyéticos específicos. En el recuadro inferior se muestran ilustraciones de las células maduras y el sistema inmune en el que se desempeñan. AGM: aorta–gonada–mesonefros; CNK: célula asesina natural; dpc: días posconcepción; E: día embrionario; wpc: semanas post-concepción; BHE: barrera hematoencefálica; HSC: células madre hematopoyéticas. Tomado y modificado de (Wang & Wagers, 2011; Li & Barres, 2017; Prinz et al., 2017).

Las células madre troncales son pluripotenciales porque tienen la capacidad de diferenciarse en diversos linajes celulares a la vez que pueden mantener su número poblacional invariable, es decir, se autorrenuevan. En condiciones normales, existe una HSC por cada cien mil células nucleadas en la médula ósea. Asimismo, las células hijas de la HSC son multipotentes, o sea que pueden diferenciarse a distintos linajes hematopoyéticos, pero no autorrenovarse. Los progenitores multipotentes dan origen al linaje mieloides, que a su vez originan a los eritrocitos, los mastocitos, los polimorfonucleares y los monocitos; y al linaje linfocitario que diverge hacia las células NK y linfocitos inmaduros. El linaje linfocitario se asocia principalmente a la respuesta adaptativa mientras que el mieloides (exceptuando a los eritrocitos) a la respuesta inmune innata, aunque, innegablemente, ambos brazos del sistema inmune trabajan en conjunto para mantener la homeostasis de los organismos que los portan.

Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata es crítica para el mantenimiento de la homeostasis del organismo, además, es la primera línea de defensa frente a agentes que causan el daño celular. El ala innata del sistema inmune consta de tres componentes: el físico, el celular y el humoral. El primer mecanismo de evasión patológica es la obstaculización del avance de los agentes nocivos. La piel constituye la primera barrera física que impide el paso de los agentes nocivos y está formada, principalmente por capas sucesivas de queratinocitos. Además, los canales al interior del cuerpo que comunican con el exterior del organismo son capaces de producir una matriz compleja de biomoléculas que impide el paso de los agentes hacia el interior del organismo. Esto es: la primera herramienta inmunológica son las barreras mecánicas que están presentes sin la necesidad de estímulos y rechazan el daño o los patógenos pasivamente. Sin embargo, estas son reforzadas por sustancias que inhiben la acción o reproducción de los agentes dañinos para el organismo que contiene al sistema inmune (**TABLA 1**). En este orden de ideas, mecanismos tales como la descamación de las células muertas de la piel, el barrido causado por la orina o el lagrimeo y parpadeo, son mecanismos dinámicos del sistema inmune que, sin destruir alguna amenaza biológica, impiden su paso hacia el interior del organismo (Abbas et al., 2015; Immunopedia, 2022; Owen et al., 2014).

Junto con la piel, las mucosas, forman parte de las barreras mecánicas y bioquímicas del sistema inmune y que, igualmente, son el primer sitio de interacción entre agentes invasores y la primera línea de protección al interior del organismo. Las mucosas son regiones supraestructurales que rodean las vías de entrada natural al organismo y que están en contacto con el medio ambiente, a saber: las vías respiratorias, el tracto digestivo y el sistema urinario. Están formadas por una lámina de células epiteliales, que fungen como barrera y tienen una estructura ciliada, plana o estratificada, y por células epiteliales especializadas que pueden generar proteínas, péptidos antimicrobianos, carbohidratos complejos como mucina, y diversas sustancias según su localización que, de forma general, forman un coloide que atrapa patógenos y anticuerpos. La lámina epitelial recubre a la lámina propia que es un tejido laxo formado principalmente por tejido conectivo y en este se localizan capilares venosos, arteriales y linfáticos; así como, leucocitos, además, en una capa muscular inferior se encuentran los plexos nerviosos que están involucrados en la motilidad, el control de la perfusión vascular y el control endócrino de la capa epitelial.

TABLA 1. LAS BARRERAS FÍSICAS COMO PARTE DEL SISTEMA INMUNE INNATO.

Factores bioquímicos	Ubicación	Función
pH ácido	Piel, estómago, vagina	Inhibir el crecimiento bacteriano
Ácidos grasos	Piel	Inhibir el crecimiento bacteriano
Peroxidasas	Lágrimas y sudor	Oxidar las membranas de las bacterias
Lisozima	Lágrimas y sudor	Degrada la pared celular bacteriana
Histatinas	Saliva	Antifúngico

Esta superestructura inmunológica es llamada tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) y es capaz de montar respuestas inmunológicas rápidas que, en condiciones normales, no involucran al resto del sistema, pero si el estímulo es persistente puede implicar a otros órganos inmunes. Finalmente, si estos mecanismos físicos y humorales son superados, el otro componentes del sistema inmune: el celular, puede combatir los eventos patológicos, principalmente, mediante la *inflamación* y la defensa antivírica (Huber-Lang et al., 2018; Owen et al., 2014; Pavón-Romero et al., 2021).

Activación de la inflamación

La *inflamación* es un proceso celular complejo, dinámico y bifásico (proinflamación y antiinflamación) que hace frente a invasores, lesiones o infecciones de naturaleza diversa que causan alteraciones en la homeostasis tisular. En este participan células del microambiente en el que se desarrolla el proceso de daño, así como células que migran al sitio insultado y proteínas solubles y ancladas a las membranas de las células antedichas. Esta respuesta inflamatoria equilibrada o bifásica está diseñada para *eliminar* el peligro molecular y *reparar* el tejido dañado; es decir: su función principal es asegurar la sobrevivencia del tejido y restaurar la homeostasis. Además, la activación de la inflamación lleva a modificaciones del microambiente tisular, tales como las modificaciones en la expresión proteica que son reprimidas en un estado fisiológico, pero que se exacerban en un estado patológico, así como durante la diferenciación celular y el reclutamiento de células inmunitarias periféricas. Si bien, una respuesta organizada y llevada a cabo de forma sincronizada facilitará la reparación, regeneración, adaptación y sobrevivencia de los tejidos dañados, el mantenimiento prolongado de la respuesta inflamatoria puede ser tóxico para las células de los tejidos involucrados (Abbas et al., 2015; Headland & Norling, 2015; Owen et al., 2014; Pavón-Romero et al., 2021).

Las lesiones o invasiones se pueden asociar a la presencia de patrones moleculares que no se encuentran en el hospedador y son casi idénticas (conservada evolutivamente) en diversos microorganismos (bacterias, virus y hongos) denominadas *patrones moleculares asociados a patógenos* (PAMP, del inglés: *pathogen-associated molecular pattern*). Además, el sistema inmune también puede reconocer la presencia de *patrones moleculares asociados a daño* (DAMP, del inglés: *damage-associated molecular patterns*) tales como el ATP, las histonas o el ADN mitocondrial, etc. que pueden ser endógenos o exógenos (Huber-Lang et al., 2018; Pavón-Romero et al., 2021).

Las señales de peligro molecular pueden detectarse a través de *receptores de reconocimiento de patrones* (PRR, del inglés: *pattern-recognition receptors*), receptores que, al igual que sus ligantes, están altamente conservados y se encuentran en diversas células, incluyendo a los leucocitos y las células epiteliales y endoteliales. Una parte importante de los PRR se encuentran en la fase fluida (o humoral) del sistema inmune, como las pentraxinas y las colectinas; otros se encuentran asociados a membranas celulares o vesiculares, como los receptores tipo toll (TLR, del inglés: *Toll like receptor*) los receptores similares a la lectina del tipo C (CLR, del inglés: *C-type lectin receptors*), los receptores purinérgicos, para el sistema del complemento, para la fracción cristalizable de los anticuerpos (FCR) y de péptidos formilados, entre otros. Finalmente, los receptores también se ubican en el citosol, tal como, los receptores tipo NOD (NLR, del inglés: *NOD like-receptor*), de los cuales, la subfamilia NLRP tiene una participación importante en el proceso inflamatorio debido a que está involucrada en la formación del inflamosoma, un complejo multiproteico que es controlado por diversos mecanismos como la estimulación de TLR, la detección de cristales insolubles o la salida de potasio intracelular; además, tiene particular responsabilidad en el mantenimiento de la proinflamación y la muerte por piroptosis (Galluzzi et al., 2018; Huber-Lang et al., 2018) (**FIGURA 2**).

Luego de que los mecanismos de daño superaron los límites físicos y bioquímicos del sistema inmune y al sistema de reconocimiento de insultos, presente en todo el organismo, se activa la *respuesta inflamatoria*; es decir: la única condición que requiere el sistema inmune para activar el proceso inflamatorio es reconocer una señal como una amenaza. Estas amenazas son llamadas: *inductores de la respuesta inflamatoria* y su naturaleza es diversa como: ADN, ARN, componentes de la pared o membrana celular, ATP, proteínas glicosiladas o nitradas, agregados proteicos, metales pesados, cristales, sílices y asbestos, medios ácidos e hipóxicos o productos de la degradación de la matriz extracelular, etc. (Huber-Lang et al., 2018; Pavón-Romero et al., 2021).

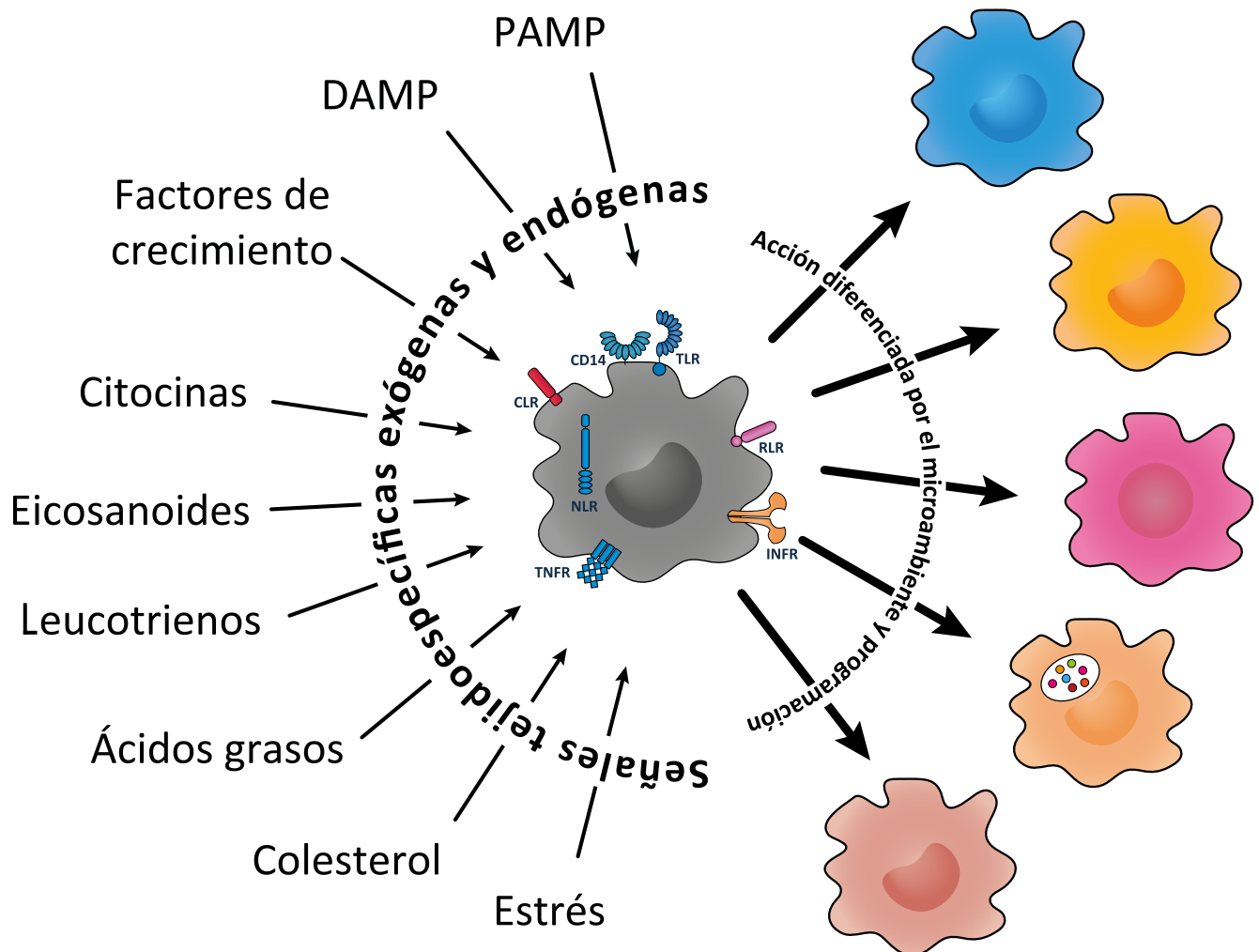


FIGURA 2. Respuesta inmune.

Las señales moleculares de peligro pueden detectarse a través de los PRR, receptores altamente conservados que se encuentran en diversas células incluyendo, a los leucocitos y las células epiteliales y endoteliales. Estos pueden detectar señales propias y ajenas al organismo y, según la señal y el microambiente en el que se encuentre la célula, se desarrollará una respuesta específica, a través de la reprogramación celular. PRR: receptores de reconocimiento de patrones; DAMP: patrones moleculares asociados a daño; PAMP: patrones moleculares asociados a patógeno; TLR: receptores tipo toll; TNFR: receptor de factor de necrosis tumoral; INFR: receptor del interferón; NLR: receptor tipo NOD; CLR: receptor tipo lectina del tipo C.

Una vez que los inductores entran en contacto con los receptores de las células tras un insulto tisular, se ejecutan efectos protectores encaminados a recuperar la homeostasis del organismo a través de un amplio espectro de respuestas que son, en realidad, la suma de distintos tipos celulares y sus propios estados individuales que coexisten en el microambiente tisular. Las células que son capaces de identificar las variaciones en el ambiente son los macrófagos tisulares especializados y las células dendríticas, además, las células epiteliales, endoteliales y las especializadas del tejido son capaces de producir quimiocinas y citocinas con el fin de arrojar señales de auxilio para atraer a más macrófagos y células dendríticas de los alrededores. Si dicha respuesta se extiende en el tiempo, puede volverse sistémica y requerir la presencia de leucocitos circundantes en el torrente sanguíneo y si estas señales persisten la respuesta inflamatoria puede convertirse en una respuesta tóxica y degenerativa (Huber-Lang et al., 2018; Pavón-Romero et al., 2021).

El reclutamiento de las células leucocitarias desde los vasos sanguíneos a los tejidos, es decir, la diapédesis, es un evento ordenado que inicia con la atracción de neutrófilos, luego de monocitos y, finalmente, linfocitos. Tras esta última migración, se iniciaría lo que se conoce como la respuesta *inmune adaptativa*.

El proceso inflamatorio, en gran medida, es mediado por la quimiotaxis dirigida y la liberación de citocinas como: interferón γ ($\text{INF}\gamma$), factor de necrosis tumoral α (del inglés, *Tumoral Necrosis Factor α* ; $\text{TNF}\alpha$), interleucina (IL)-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-25 e IL-33, así como, de diversos factores mediadores de la inflamación, a saber: las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés: *reactive oxygen species*) y nitrógeno (RNS, del inglés: *reactive nitrogen species*), MPP, péptidos inhibidores de proteasas, derivados lipídicos como las prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, resolvinas y lipoxinas (*ver más adelante*), y neurotransmisores; tales que modulan procesos relevantes en la maquinaria inflamatoria como la iniciación de la cascada de la coagulación, inducción de la producción de proteínas de adhesión, la desgranulación de neutrófilos y monocitos, la fagocitosis, la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) y la destrucción de los agentes nocivos (Ellis et al., 2018; Headland & Norling, 2015; Huber-Lang et al., 2018; Pavón-Romero et al., 2021).

La respuesta inflamatoria, pues, representa uno de los componentes complejos de la primera línea de defensa de los organismos. Se encarga de contener el daño tisular a través del reconocimiento de los inductores de la inflamación a través de receptores conservados evolutivamente presentes en las membranas y citosol de células efectoras del sistema inmune y del parénquima tisular, así como en la mucosa, la matriz extracelular y circulando por la sangre. Dicho reconocimiento desencadena la producción de mediadores químicos como citocinas y quimiocinas, lípidos, agentes oxidantes, entre otros, para amplificar la respuesta celular y acelerar la eliminación de aquello que afecta la salud tisular. Finalmente, este mecanismo tiene como finalidad restaurar la homeostasis tisular.

Los macrófagos y la resolución de la inflamación

Los macrófagos y monocitos forman parte del sistema fagocito-mononuclear; estos participan de forma activa en todo el proceso inflamatorio. Los macrófagos y los monocitos son células muy versátiles, tales que, pueden diversificarse en una amplia variedad de fenotipos con firmas moleculares específicas. Como se refirió en un apartado superior, los macrófagos tisulares especializados migran a los tejidos en dos momentos, primeramente, desde el saco vitelino y, segundamente, desde el hígado fetal. Mientras que los monocitos proceden de la médula ósea. Es cierto que, en el parénquima cerebral, debido a que la barrera hematoencefálica se cierra antes de que inicie la hematopoyesis del hígado fetal, los macrófagos tisulares del cerebro, es decir: la microglía, únicamente se origina en el saco vitelino y que, durante los procesos inflamatorios a lo largo de la vida, los monocitos que circulan por el torrente sanguíneo, al migrar al tejido dañado, se activan y transforman en distintos fenotipos que ofrecen respuestas celulares diferenciadas y que, al resolverse el proceso inflamatorio, aquellos macrófagos sustituyen a los macrófagos tisulares especializados y a las células dendríticas de tejido. Finalmente, aún no está del todo claro cómo es que los macrófagos tisulares se renuevan, especialmente en el cerebro en donde se piensa que no hay paso de monocitos cuando los organismos se encuentran en homeostasis, aunque se ha sugerido que la microglía tiene capacidad proliferativa (Ginhoux & Williams, 2016; Ginhoux et al., 2016; Walker & Lue, 2015).

Los macrófagos tisulares tienen una amplia variedad de fenotipos especializados, por ejemplo: los osteoclastos se encuentran en los huesos; los macrófagos alveolares, en los pulmones; los histiocitos, en el tejido conectivo intersticial; las células de Kupffer, en el hígado; la microglía, en el parénquima cerebral; los macrófagos perivasculares, en la periferia del endotelio, etc. Por su parte, existen dos subconjuntos principales de monocitos tanto en ratones como en humanos: los clásicos y los no clásicos que se diferencian entre sí porque presentan diversos marcadores de superficie. En ratones, los monocitos clásicos se caracterizan por la combinación de marcadores de superficie específicos Ly6C^{alto}, CCR2⁺, CX3CR1^{bajo}, CD62L⁺, Gr1⁺ y en humanos, CD14⁺ y CD16⁻; por su parte, los monocitos no clásicos se caracterizan por los marcadores Ly6C^{bajo}, CCR2^{bajo}, CX3CR1⁺, CD62L⁻, Gr1⁻ o CD14^{bajo} y CD16⁺, en ratones y humanos, respectivamente. Se piensa que los primeros son capaces de transformarse en macrófagos o células dendríticas que promueven la inflamación, mientras que los segundos, examinan las células endoteliales y los tejidos circundantes en busca de daño o infección viral (Madel et al., 2019).

Polarización de los monocitos/macrófagos

Los macrófagos, desde su origen hasta la etapa adulta, representan un espectro de poblaciones inmunofenotípicamente distintas, que modifican la forma del citoesqueleto, el metabolismo celular, la expresión génica y, con ello, la producción de proteínas solubles y ancladas a la membrana, según el microambiente en el que se encuentren y el estado fisiológico que este represente: de salud o de enfermedad. Se sabe que distintos inductores generan poblaciones diversas de macrófagos con respuestas igualmente diferentes. Por ello, históricamente, se ha hecho un gran esfuerzo en tratar de caracterizar estos fenotipos.

Los estados de activación de macrófagos han sido nombrados como M1 o proinflamatorio y M2 o antiinflamatorio. Nomenclatura derivada de la clasificación de linfocitos cooperadores Th1 y Th2 de los que, se sabe, los primeros son productores de INF γ , un potente promotor de la inflamación (y, a su vez, del estadio M1) y, los segundos, expresan IL-10, una citocina relevante en la supresión de la proinflamación y promotor de la resolución. Sin embargo, debido a que, diversos inductores causan respuestas distintas en los macrófagos, se propuso una nomenclatura que toma en cuenta tanto al inductor como a las proteínas membranales que son expresadas por estos y matiza las respuestas que los macrófagos producen, a saber: el estadio M1, es inducido por las proteínas

TNF α e INF γ o TNF y LPS, produce citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , la IL-6 y TNF α , así como ROS y RNS, promueve la inflamación y tiene una alta capacidad fagocítica; M2a, es inducido por la IL-4 y la IL-13, se sabe que es capaz de producir IL-10, -6, -12 y TNF α y tienen capacidades para causar la reparación del tejido o fibrilarlo; M2b, es transformado por la IL-1 β y es el fenotipo más cercano al fenotipo M2 ya que es capaz de suprimir la respuesta inflamatoria y tienen una capacidad fagocítica elevada; M2c, es inducido por la IL-10 y se aproxima a las acciones producidas por el M2 que, a través de la producción del factor de crecimiento transformante (del inglés, *transformant grow factor*; TGF) suprime la respuesta inflamatoria y la muerte por apoptosis, así como que promueve la reparación del tejido y, finalmente, el fenotipo M3, que es inducido por la IL-34 y por el factor estimulante de colonia macrófago, se propuso como un fenotipo con capacidad proliferante (Gordon et al., 2014; Martinez & Gordon, 2014; Murray et al., 2014; Pavón-Romero et al., 2021; Walker & Lue, 2015).

Alternativamente, se propuso una nomenclatura muestra el escenario del estímulo, esto es: aquello con lo que se estimula a las células, los marcadores de membrana que se explorarían, marcadores específicos y el modelo en el que se desarrollara el supuesto experimento. V. gr. Macrófagos estimulados con IL-10 *in vitro*, estaría formando un fenotipo *in vivo* M(IL-10) o una línea celular *in vitro* inducida con LPS generaría un fenotipo *in vitro* M(LPS). En ambos casos se infiere que uno es un M2c y un M1, respectivamente; no obstante, en experimentos más complejos podrían describirse fenotipos como *ex vivo* M(LPS)iNOS+CD68+IL-10^{bajo} en donde se indica que se estarían explorando células monocito/macrófago en algún órgano en el que fue administrado LPS y que, ese fenotipo, es capaz de producir NO y tiene capacidades fagocíticas y escasamente inmunosupresoras (Gordon et al., 2014; Martinez & Gordon, 2014; Murray et al., 2014; Pavón-Romero et al., 2021; Walker & Lue, 2015).

Finalmente, existe una propuesta de nomenclatura unificadora para los monocitos, macrófagos y células dendríticas mieloides constituida por dos niveles fundamentales: el *origen del macrófago* (la etapa embrionaria o la médula ósea) y la *función, ubicación y fenotipo del macrófago*. Sin embargo, uno de los defectos de esta nomenclatura es que se basa principalmente en datos del sistema inmunológico del ratón, pero que, según los autores, esta nomenclatura podría usarse en humanos y otras especies sobre la base de la homología transcripcional, fenotípica y funcional entre especies (Guilliams et al., 2014).

En la literatura, asimismo, los autores han usado estas y otras formas de nombrar a la polarización o activación de los macrófagos indistintamente, tales como la activación clásica o alternativa, que es análoga a la M1 y M2; macrófagos reguladores (Mreg); macrófagos asociados a tumores (TAM); macrófagos derivados de CSF-1 o derivados del factor estimulante de colonia granulocito macrófago (GM-CSF del inglés: *granulocyte macro-phage colony-stimulating factor*) (Mantovani et al., 2004; Murray et al., 2014); sin embargo, las nomenclaturas ofrecidas intentan responder netamente a la caracterización, es decir: a la forma, a la función y a la participación de los macrófagos en una situación específica, lo cual, describir a un espectro de amplias posibilidades, en sí mismo, implica un esfuerzo inmenso.

En este contexto multiestímulos, las respuestas están íntimamente ligadas a dos funciones primordiales: la *promoción* de la respuesta inflamatoria o la *supresión* de la respuesta inflamatoria (acciones proinflamatorias o antiinflamatorias, respectivamente). En ese sentido, se puede decir que los macrófagos que fueron definidos como activados clásicamente, M1 y las formas adoptadas mediante la estimulación de macrófagos en estado basal con: INF- γ , TNF, IL-1 β , IL-12, ligantes de los TLR, GM-CSF, etc., y que podríamos nombrar de forma general como el espectro de activación M1, está relacionado con la defensa del hospedero ante una gran variedad de bacterias, protozoos y virus, en general, son células que promueven la activación y sostenimiento de la respuesta inflamatoria. Por su parte, aquellos macrófagos que fueran determinados como macrófagos activados alternativamente, M2, M2a, M2b, M2c, TAM, las células estimuladas con IL-4, IL-13, IL-10, CSF-1, etc., o bien, de forma

análoga a lo anterior, el espectro de activación M2, cuenta con propiedades supresoras de la inflamación y de reparación del daño. Así mismo, se ha caracterizado un fenotipo nombrado M regulador (análogo a los linfocitos Treg) que, aunque está relacionado con lo que se nombró el espectro M2, se le ha propuesto como un macrófago separado de los otros dos espectros ya que tiene funciones proresolutivas en las que no participan plenamente las células en un fenotipo antiinflamatorio: especialmente sobre la regulación de la reparación tisular (**FIGURA 3**).

Dado el amplio abanico de posibilidades de respuestas y fenotipos macrófágicos y, al mismo tiempo, la simpleza que ofrece encajonar estas acciones en un espectro que va desde lo proinflamatorio y lo antiinflamatorio hasta lo proresolutivo que, actualmente, aparte de los linfocitos Th y los macrófagos que ya se ha descrito en este apartado, investigadores han mostrado que otros tipos celulares como los astrocitos y los neutrófilos presentan fenotipos inflamatorios y antiinflamatorios (A1, N1 y A2, N2, respectivamente) (Escartin et al., 2021; Ohms et al., 2020).

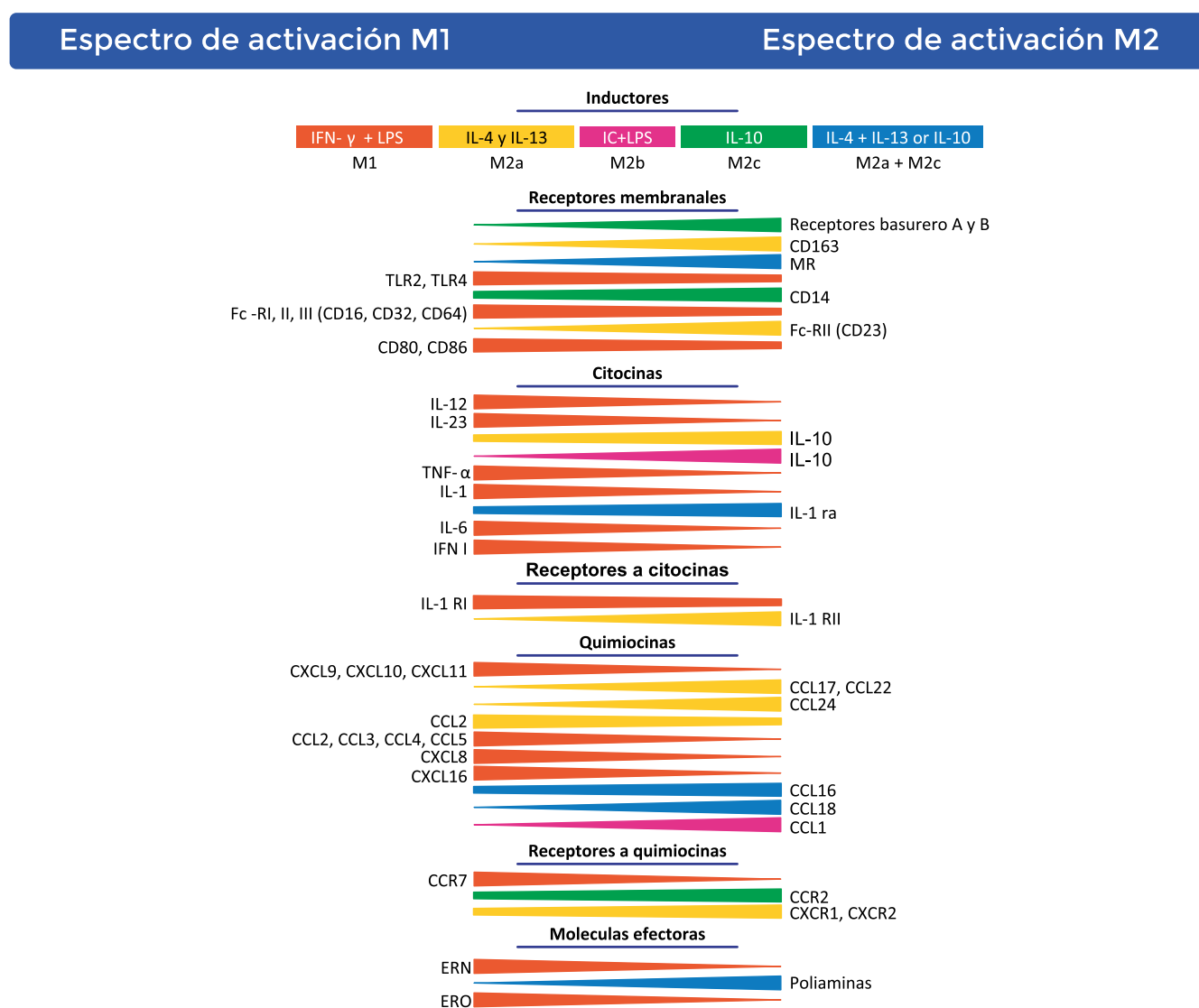


FIGURA 3. ESPECTRO DE ACTIVACIÓN MACROFÁGICA.

La activación de los macrófagos está íntimamente relacionada con el cambio en la expresión genética y, al mismo tiempo, se expresan en un diverso perfil de fenotipos caracterizados por la producción de proteínas solubles como citocinas, quimiocinas y receptores de membrana. Se muestra el perfil fenotípico de los macrófagos activados. TLR: receptores tipo toll; NLR receptores tipo NOD; CLR: receptores similares a la lectina del tipo C; RLR: receptores tipo RIG; INFR: receptores de Interferón; TNFR: receptores a TNF. Tomado y modificado de: (Gordon, 2003; Mantovani et al., 2004; Martínez & Gordon, 2014).

A pesar de la clasificación previa, es sumamente importante comprender que la nomenclatura mostrada aquí surgió de estudios *in vitro* en condiciones en las que el investigador puede controlar los escenarios de reacción y respuesta (las citocinas a estudiar, el conjunto celular y las respuestas ejercidas por el mismo sistema) y, de este modo, pudieron definirse los estados de polarización de los macrófagos. Además, aunque en las nomenclaturas más modernas tratan de incluirse macrófagos obtenidos *ex vivo*, el estudio es mucho más complejo debido a la vasta variedad de interacciones celulares en el evento fisiopatológico, ya que, durante el daño tisular *in vivo*, coexiste una población heterogénea de células del parénquima y del sistema inmune innato y adaptativo que responden de acuerdo con el microambiente tisular en el que se encuentran a lo largo del tiempo.

Resolución de la inflamación

Diversos estímulos logran que los macrófagos pasen de un espectro de activación proinflamatorio a uno antiinflamatorio, sin embargo, es notable afirmar que la inflamación, al ser un mecanismo de carácter dual, la promoción de la inflamación traerá consigo la supresión de la misma, es decir: el estado no-inflamatorio no surge pasivamente debido a la ausencia de los estímulos inflamatorios; sino que, más bien, el mantenimiento del equilibrio homeostático en la salud requiere de mecanismos activos que supriman las reacciones potencialmente inflamatorias y promueva, al mismo tiempo, mecanismos de reparación. Por ello, el paradigma de la inflamación no es puramente la proinflamación y su antagonismo, sino la inflamación y su *resolución*. Dicho de otro modo: la resolución de la inflamación es un proceso activo provocado por la biosíntesis de mediadores que actúan sobre eventos clave de la inflamación para promover el retorno a la homeostasis. En este contexto, la homeostasis se recuperará si se llevan a cabo coordinadamente los *signos cardinales de la resolución* que son: la limitación o cese de la diapédesis de leucocitos, la contrarregulación de citocinas y quimiocinas, la inducción de la muerte por apoptosis a neutrófilos, la eferocitosis (del inglés *efferoctosis*) de los neutrófilos apoptóticos, la reprogramación de macrófagos M1 a M2 y Mreg y la reparación tisular a un estado previo al proceso inflamatorio o a la readaptación del nuevo contexto tisular. Además, se dice que una reparación tisular exitosa es aquella en la que el regreso a la homeostasis no llevó a la formación de fibrosis o cicatrices (Freire & Van Dyke, 2013; Kourtzelis et al., 2020; Pavón-Romero et al., 2021; Sugimoto et al., 2016) (**FIGURA 4**).

Los macrófagos tisulares constituyen el 10-15% de las células tisulares. Representan la primera línea de defensa celular del sistema inmune innato, por lo que, son capaces de detectar las variaciones homeostáticas como la tensión de oxígeno, responden al estrés metabólico y tienen papeles importantes en el recambio y la reparación de los tejidos. Contribuyen al desarrollo de los tejidos y al mantenimiento de la homeostasis, mediante la fagocitosis; la producción y secreción de partículas reclutadoras, activadoras de otras células, de adhesión celular, tróficas y de destrucción microbiana. Siguiendo esta línea de pensamiento, los monocitos mantienen el mismo dinamismo y la alta capacidad de diferenciación que los macrófagos tisulares, ya que, pueden ser reclutados desde los sitios hematopoyéticos definitivos y la sangre conforme sean requeridos, participan en la repoblación de macrófagos tisulares especializados y células dendríticas tisulares y contribuyen al establecimiento y resolución de las reacciones inflamatorias locales y participan en la vigilancia inmunitaria innata del organismo. Según esto, puede asumirse la enorme capacidad adaptativa y funcional de estas células. No obstante, las células trabajan en conjunto con los demás mecanismos de respuesta celular para cumplir los objetivos del proceso inflamatorio que es la reparación del tejido y el retorno a la homeostasis (Freire & Van Dyke, 2013; Kourtzelis et al., 2020; Pavón-Romero et al., 2021; Sugimoto et al., 2016).

Los macrófagos tisulares dan las primeras señales de auxilio a nivel local y son capaces de resolver el reto si no es demasiado desestabilizador. Este proceso es conocido como *parainflamación* o *inflamación de bajo grado*, ya que, el agente dañino no supera las capacidades de los macrófagos tisulares y no se requiere toda la maquinaria inmunitaria para reparar el proceso de desequilibrio homeostático. Cuando los monocitos son reclutados al sitio de daño, son reclutados retardadamente, ya que su llegada procede a la de los neutrófilos, los cuales, en condiciones normales, mueren por apoptosis al terminar con su función en el sitio inflamatorio y, luego, son fagocitados por los macrófagos.

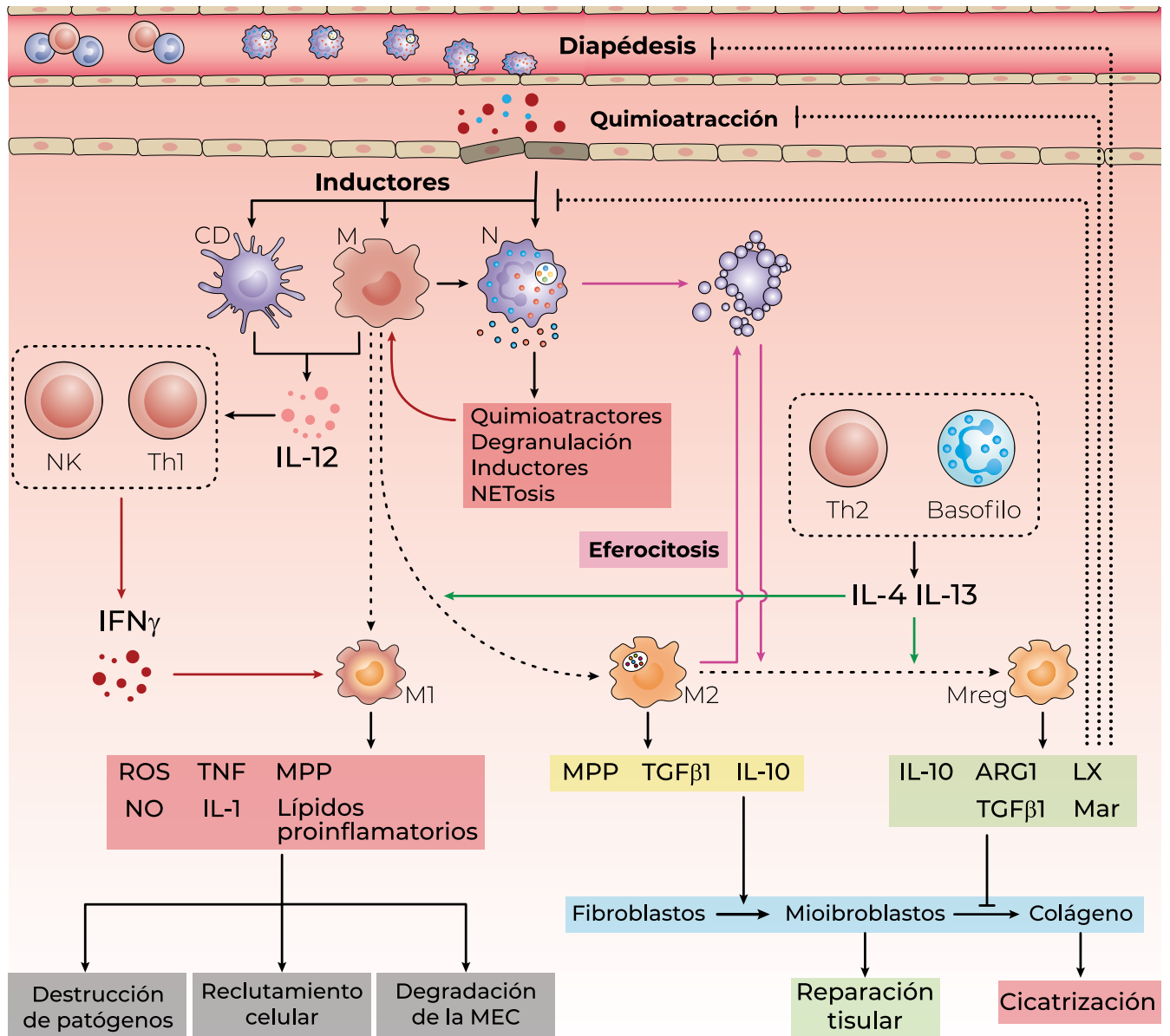


FIGURA 4. INFLAMACIÓN Y RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN.

La respuesta al daño es detectada, en primer lugar, por las células dendríticas y los macrófagos tisulares. El $IFN\gamma$ transforma el fenotipo M0 a M1. El daño tisular genera la migración de neutrófilos y monocitos circundantes al sitio de daño para ampliar el proceso inflamatorio. El daño tisular también puede causar la liberación de alarminas como $IL-25$ o $IL-22$ (no mostrado) que causan que los basófilos y los linfocitos Th2 liberen $IL-4$ o $IL-13$, tales que modifican los fenotipos M0 y M1 a M2 y M2 a Mreg. Los signos cardinales de la resolución de la inflamación son la limitación de la diapédesis, la contrarregulación de inductores inflamatorios, la eferocitosis y la reprogramación celular del estadio M2 a Mreg. Los neutrófilos apoptóticos son reprogramadores celulares de M2 a Mreg. El estadio M2 activa a los fibroblastos y los transforma en miofibroblastos capaces de producir colágeno, una producción excesiva de esta proteína puede generar fibrosis y disfunción tisular, el estadio Mreg modula la cantidad de colágeno que lo miofibroblastos producen y, con ello, auxilia a reear los tejidos. Modificado de Pavón et al., 2021. CD: célula dendrítica; LX: lipoxina; M: macrófago; Mar: marcinas; MEC: matriz extracelular; MPP: metaloproteinasas; N: neutrófilo; NO: óxido nítrico; ROS, especie reactiva de nitrógeno; TGF: factor de crecimiento transformante.

La muerte de los neutrófilos trae consigo el inicio de la resolución, ya que liberan diversas proteínas y sustancias como el ATP intracelular, que son capaces de atraer a los macrófagos; la anexina o ferritina que inhiben la diapédesis de neutrófilos o proteasas, que pueden modular la quimiotaxis y la amplificación de la respuesta proinflamatoria al hidrolizar quimiocinas e interleucinas. Además, el reconocimiento de estas células apoptóticas por parte de los macrófagos no causa la liberación de agentes proinflamatorios sino la inducción de proteínas antiinflamatorias como la IL-10 y el TGF β (Freire & Van Dyke, 2013; Serhan et al., 2007; Sugimoto et al., 2016).

Así mismo, durante la inflamación, cuando los monocitos llegan al sitio de lesión, tienen un fenotipo M1, pero más adelante en el tiempo, debido a señales como IL-4 e IL-13 provenientes de linfocitos y mastocitos, una parte de estos puede convertirse al espectro fenotípico M2, que contribuye a la respuesta antiinflamatoria y a la atracción y activación de células estromales, principalmente fibroblastos. Sin embargo, si esta capacidad de activar fibroblastos y, a su vez, de producción de colágeno, no es controlada adecuadamente, puede llevar a la fibrosis tisular y, por tanto, a la disfunción del tejido. Por ello, las células contrarreguladoras de los macrófagos en fenotipos M2, son los macrófagos en fenotipo *Mreg* que, por una parte, inhiben la producción de colágeno y, por la otra, participan en la remodelación del tejido y readaptación del tejido dañado (Freire & Van Dyke, 2013; Kourtzelis et al., 2020; Pavón-Romero et al., 2021; Sugimoto et al., 2016).

Los mecanismos de reprogramación celular de M2 a *Mreg*, así como su participación completa en la reparación de tejidos todavía está incompleta. Aunque se sabe que el receptor del complemento 3, los mediadores de lípidos proresolutivos (principalmente las lipoxinas, LX; las prostaglandinas antiinflamatorias: PGJ, y los derivados de ácidos grasos insaturados ω 3, resolvinas y protectinas) y las proteínas TIM4 y TGF- α promueven la fagocitosis de los leucocitos apoptóticos por parte de los macrófagos. Así como que dan señales de saciedad mostradas a través de tener pequeñas cantidades de CD11 en la membrana plasmática, un incremento en la capacidad eferocítica, una menor respuesta a ligantes de TLR4 y la migración hacia órganos linfoides. Finalmente, los macrófagos M1 muestran una inducción marcada de ciclooxigenasa 2 (COX2), con regulación a la baja de COX1, leucotrieno A4 hidrolasa, tromboxano A sintasa 1 y araquidonato 5-lipoxigenasa. Por el contrario, los macrófagos M2 muestran una regulación positiva de la araquidonato 15-lipoxigenasa y COX1. Además, la PGE sintasa microsomal, la enzima clave en la producción de PGE2, es inducida en macrófagos por señales inflamatorias de M1 como LPS y está funcionalmente acoplada a la expresión de COX2. Por el contrario, los estímulos M2 como IL4 e IL13 regulan negativamente la expresión de PGE sintasa microsomal-1 (mPGES) en macrófagos (Ortega-Gómez et al., 2013; Pavón-Romero et al., 2021; Schif-Zuck et al., 2011).

Lípidos e inflamación

Los lípidos, tienen un papel relevante en el funcionamiento normal de los organismos complejos. Ya que, además de ser la fuente de almacenamiento y de producción más importante de energía, así como, de ser el principal componente de las membranas celulares; son inductores inflamatorios y proresolutivos. Brevemente, el ácido palmítico (16:0), que es el ácido graso saturado más común en el cuerpo humano, pues representa entre el 20 - 30% del total de ácidos grasos en los fosfolípidos de membrana y los triacilgliceroles de los adipocitos, es el principal precursor de los ácidos grasos de cadena larga. Además, pueden obtenerse de la dieta o sintetizarse *de novo* en diversos organismos. El ácido palmítico da origen a otros ácidos grasos más largos y complejos como el ácido esteárico (18:0) y oleico (18:1), así como a los ácidos linoléicos (18:2) y linolénico (18:3), que son ácidos grasos ω -6 y ω -3, respectivamente y precursores de moléculas lipídicas de gran relevancia fisiológica para los

organismos. Sin embargo, los humanos no tienen la capacidad enzimática para sintetizar estos dos últimos, por lo que, necesariamente, deben ser obtenidos a través de la dieta (Desale & Chinnathambi, 2020; Nelson & Cox, 2019).

Una vez ingerido el ácido linoleico, este puede convertirse hacia distintos ácidos grasos polinsaturados, principalmente los ácidos γ -linoléico, eicosatrienoico y araquidónico (AA). Así mismo, del ácido α -linoléico se obtienen el ácido icosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). El AA, el EPA y el DHA son precursores de importantes icosanoides. Del EPA derivan los tromboxanos (TX) y PG de la serie 3, las resolvinas (Rv) de la serie 5 y los leucotrienos (LT); del DHA, algunas Rv y maresinas (Mar) y, finalmente, del ácido araquidónico, los tromboxanos y PG de la serie 2, las LX y los leucotrienos (LT) de la serie 4 (Nelson & Cox, 2019) (FIGURA 5).

El AA es un precursor endógeno común para la biosíntesis de eicosanoides y se deriva de la posición sn-2 de los fosfolípidos de la membrana celular (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol) a través de la acción de la enzima fosfolipasa A2 (PLA2), que libera al AA de la membrana. La PLA2 se activa por el aumento de los niveles de calcio y la fosforilación. Una vez activada, la PLA2 se traslada del citoplasma a las membranas intracelulares, incluido el retículo endoplásmico y la envoltura nuclear, donde tiene acceso a sustratos de fosfolípidos que contienen al AA. Este se convierte rápidamente en varios mediadores lipídicos mediante las enzimas ciclooxigenasas (COX), lipoxigenasas (LOX) o epoxigenasas para producir PG, LT y endoperóxidos, respectivamente (Desale & Chinnathambi, 2020; Nelson & Cox, 2019; Yao & Narumiya, 2019).

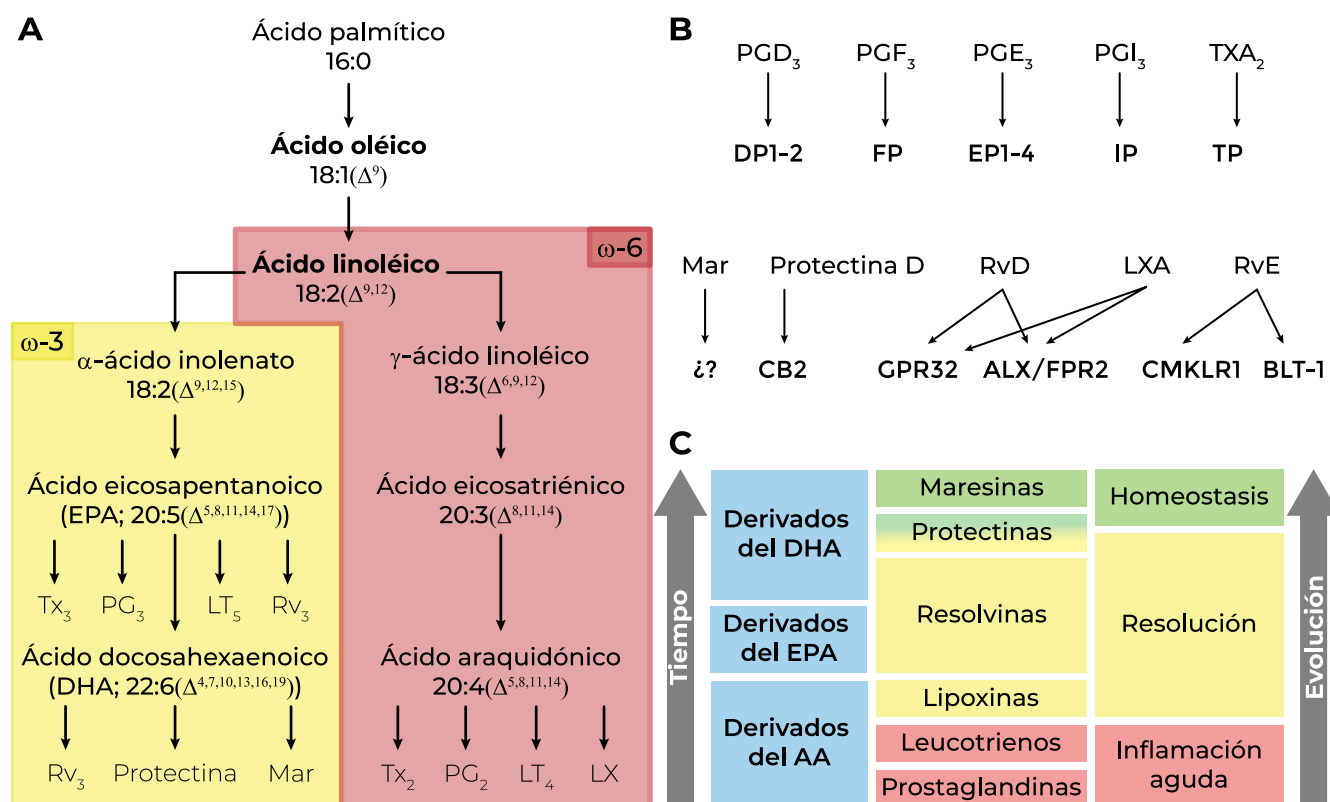


FIGURA 5. LÍPIDOS E INFLAMACIÓN.

(A) se muestra, de manera resumida, la ruta sintética de los ácidos grasos de cadena larga y las moléculas derivada de estos. (B) se indican los principales receptores a los que, los lípidos que participan en la respuesta inflamatoria se unen para generar sus acciones en el organismo. (C) El diagrama muestra el momento en el que las moléculas lipídicas participan en la respuesta inflamatoria y su resolución. Modificado de Nelson & Cox, 2019 y de Pavón-Romero et al., 2021.

Prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos

El AA es metabolizado por las COX-1 (expresada constitutivamente), que es responsable de los niveles basales de síntesis de PG, y por la COX-2 (inducible), que cataliza la conversión del AA a mediadores lipídicos durante la inflamación, hacia la PGH₂. Las COX, son enzimas que catalizan la ciclooxygenación del AA a PGG₂, seguida de una hidroperoxidación de PGG₂ a PGH₂. La PGH₂ se difunde desde la luz del RE a través de su membrana hasta el citoplasma para convertirse en prostanoïdes más polares y, a través de sintasas específicas de PG localizadas en la cara citoplásmica del RE, acopla la síntesis de diferentes tipos de PG. Las PG tienen 10 subclases, de las cuales D, E, F, G, H e I son las más importantes en la inflamación. De manera análoga a las sintasas específicas, cada PG actúa sobre un receptor específico, a saber: la PGD₂ se relaciona con los receptores de PGD: DP1 y DP2; las PGE₂ actúan sobre los receptores de PGE, EP1-4; las PGF₂α tienen afinidad sobre el receptor de PGF, FP; la PGI₂, sobre el receptor de PGI, IP y el tromboxano A₂, sobre el receptor de TXA, TP. De manera específica, la PGE₂ se genera a través de la PGE sintasa en los leucocitos, mientras que la PGI₂ se genera a través de la prostaciclina sintasa en las células endoteliales y los TX se generan a través de la tromboxano sintasa en las plaquetas. Los nueve receptores de PG son receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y ejercen sus acciones mediante la modulación de segundos mensajeros y la transducción de señales intracelulares. Según sus vías de señalización cascada abajo y su similitud estructural, se clasifican en tres grupos: el grupo relajantes (del inglés: *relaxant*) consiste en los receptores DP1, EP2, EP4 e IP que se acoplan principalmente GsPCR, que incrementan de los niveles de AMPc intracelular y activan la vía AMPc-PKA+CREB. El grupo contráctil (del inglés: *contractile*) consta de los receptores EP1, FP y TP que están acoplados a GqPCR, que señalizan inducen la salida de Ca²⁺ y la activación de PKC. Tanto los receptores EP3 como DP2 están acoplados a GiPCR, por tanto, inducen la reducción de los niveles de AMPc intracelular y pertenecen al grupo de receptores inhibidores de PG. Además de estas vías de señalización, cada receptor de PG también activa otras vías de transducción de señales lo que vuelve complejo el proceso inflamatorio tanto agudo como crónico. Por ejemplo, los receptores EP2 y EP4 activan la vía PI3K y forman un complejo con β-arrestina para transactivar el receptor EGF; Los receptores TP y EP3 activan la pequeña proteína G Rho; el receptor IP activa la PKC y la liberación de Ca². Todas estas acciones llevan a la modulación de diversos mecanismos celulares y moleculares como la síntesis de interleucinas, citocinas y factores de crecimiento así como al incremento de la permeabilidad vascular y diapédesis, en muchos casos, según el tipo celular que se estimule, con lo cual, se aprecia la complejidad del proceso inflamatorio (Yao & Narumiya, 2019).

Por su parte, las LOX catalizan la formación de ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HPETE) a partir del AA, lo que lleva a la formación de leucotrienos y otros compuestos. Hay tres lipoxigenasas distintas que son específicas de células: 5-LOX en células mieloides; 12-LOX en plaquetas; y 15-LOX en células epiteliales/endoteliales. Los LT son producidos predominantemente por células inflamatorias, incluidos leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y mastocitos. La 5-LOX convierte el AA liberado en el epóxido LTA₄, que sufre transformación por distintas vías, una de las cuales genera LTB₄, un potente regulador de la quimiotaxis de los neutrófilos y la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales. Los productos finales de la 12-LOX y la 15-LOX son el ácido 12-HPETE y el ácido 15-hidroxieicosatetraenoico (15-HETE), respectivamente, que continúan transformándose en otros mediadores.

Lipoxinas

Las LX son las moléculas prorresolutivas producidas a partir del ácido araquidónico. Las LXA4 y B4 se sintetizan en los tejidos de las mucosas humanas como el tracto gastro intestinal (TGI), las vías respiratorias y la cavidad bucal, mediante las enzimas 15-LOX y 5-LOX, seguida de una reducción enzimática. Además, en los vasos sanguíneos, la 5-LOX biosintetiza a la LXA4 y en las plaquetas, la 12-LOX, produce la LXB4. La LXA4 se une estereoselectivamente a los receptores de LXA4/péptido formilo₂ (ALC/FPR2) y al receptor acoplado a proteína G32 (GPR32); estos receptores son expresados por neutrófilos y monocitos. Las LX inhiben la diapédesis de neutrófilos y favorecen el de los monocitos, de modo que iniciará la eferocitosis, la polarización a macrófagos Mreg y la disminución de la migración de neutrófilos, algunos signos cardinales de la resolución de la inflamación.

Protectinas

Las protectinas también se sintetizan a través de una vía mediada por lipoxigenasa. Esta vía convierte el DHA en un intermediario que contiene 17S-hidroxi-peróxido que es absorbido rápidamente por los leucocitos y convertido en ácido 10,17-dihidroxidocosahexaenoico, o bien: protectina D1 o neuroprotectina. La protectina se une a los receptores CB2 ubicados en las plaquetas y los neutrófilos. Su activación conduce a la inhibición de la expresión de P-selectina, lo que disminuye la diapédesis de los neutrófilos. La protectina D1 es producido por linfocitos Th2, a través de los cuales, reduce la secreción del TNF α e INF γ , bloquea la migración de células T y promueve la apoptosis de células T.

Resolvinas

Las resolvinas son mediadores lipídicos de la resolución de la inflamación que se sintetizan a partir de los ácidos grasos poliinsaturados ω -3, el EPA y el DHA. Existen dos familias de las resolvinas estructuralmente distintas entre sí: la serie E, derivada del EPA y la serie D, derivada del DHA. Las resolvinas de la serie E tiene afinidad por dos receptores acoplados a proteínas G: el receptor 1 semejante a quimiocinas (CMKLR1), que se expresa en monocitos y células dendríticas, y al receptor de leucotrienos 1 (BLT-1), ubicado en neutrófilos. Mientras que las resolvinas de la serie D, tienen afinidad por los mismos receptores que la LXA4, es decir, por los receptores ALC/FPR2 y GPR32 y por el receptor CB2. La unión de las resolvinas E atenúa la señalización del NF κ B y la producción de citocinas proinflamatorias.

Maresinas

Los mediadores macrofágicos de la resolución de la inflamación, es decir: las maresinas, son derivados del DHA que ocurre a través de la ruta de la 14-lipoxigenasa y un mecanismo complejo de isomerización. Se piensa que son moléculas producidas principalmente por macrófagos. Aun no se conoce el mecanismo de acción de este mediador prorresolutivo, pero se sabe que, análogamente a las LX, Rv y protectinas, estimula eficazmente la eferocitosis (Freire & Van Dyke, 2013; Kourtzelis et al., 2020; Serhan et al., 2014; Serhan et al., 2009).

El sistema inmune innato del SNC: la microglía

La mayoría de los animales cuenta con un sistema nervioso que recibe las señales del medio y las traduce a señales eléctricas y químicas con el fin de responder a un estímulo externo. El sistema nervioso no está formado únicamente por neuronas, sino por una población celular diversa. En este conjunto de células se encuentran la macroglía (que tiene un origen embrionario común al neuronal) y la microglía (que procede del mesodermo).

La microglía forma parte de la respuesta inmune innata celular en el SNC y constituye del 5–20% de las células gliales. De forma general, la microglía es un fagocito-mononuclear que se desarrolla tempranamente, durante la embriogénesis, en el saco vitelino y migra hacia el cerebro, de hecho, es el único macrófago que, en condiciones homeostáticas, está en contacto con las neuronas y la macroglía.

Se describió arriba que los macrófagos tisulares descienden de la primera célula hematopoyética distinguida como RUNX1+ localizada en el YS entre los días E7 y E7.5 y que más tarde expresan cKit y luego pasa a los estadios A1 y A2, como todos los macrófagos que descienden del YS. Hacia el E9.0 expresan MPP8-9 migran hacia el cerebro y el resto del organismo. El desarrollo de las células microgliales no depende del factor de transcripción MYB (del que sí dependen otros macrófagos tisulares de origen embrionario y las HSC para diferenciarse), pero depende de los factores de transcripción RUNX1, PU.1 y el factor regulador de interferón 8 (IRF8). Durante el desarrollo, PU.1 y RUNX1 impulsan la transición de EMP al estado inmaduro A1 (células que expresan CD45 y niveles bajos de Kit, pero no expresan el receptor 1 de quimiocinas 3 (CX3CR1) en E8 en ratones. IRF8 y RUNX1 son necesarios para la maduración de células A1 a células A2, que comienzan a expresar CX3CR1 y pierden la expresión de Kit en E9. La IL-34 y el TGFβ1, también son esenciales para el desarrollo de la microglía temprana. Hacia E14 la BHE se cerró por completo y el cerebro queda aislado de macrófagos derivados del hígado fetal o de órganos hematopoyéticos provisionales o definitivos, por lo que, la microglía, se distingue del resto de los macrófagos tisulares por descender únicamente del YS. En estas condiciones, la estimulación del CSF1R por parte del CSF1 es necesaria para pasar al estadio de premicroglía que se aprecia por la disminución en la proteína F4/80 y con el inicio de su modificación fenotípica redondeada a ramificada. Finalmente, la microglía madura u homeostática (M0) se autorrenova a través de la señalización del TGFβ1, mediante cascadas desencadenadas por los factores de transcripción PU.1 SMAD3, que impulsan la regulación transcripcional de genes como el factor de transcripción MAFB, la proteína similar a Sal 1 (SALL1), el factor potenciador específico de miocitos 2A (MEF2A) y la proteína de respuesta de crecimiento temprano 1 (EGR1) que, a su vez promueven la traducción de varios receptores de superficie únicos, como: P2Y purinoceptor 12 (P2RY12), proteína transmembrana 119 (TMEM119), receptor FC tipo S (FCRLS), CD39 y similar a Ig de unión al ácido siálico lectina H, isoforma CRA_a (SIGLECH). Asimismo, en los diferentes núcleos cerebrales, la microglía tiene diferentes firmas de microRNAs. La microglía homeostática, además de tener capacidad autoproliferativa, se mantiene en un estado ramificado debido a la estimulación de los receptores ENTPD1 y CX3CR1, por el mantenimiento de proteínas como CSF1, IL-34 y TGFβ1 en el tejido y por señales de “no me comas” enviadas por las neuronas a la microglía, especialmente CD47-CD172, CD200-CD200R y CD22-CD45. En el cerebro adulto parece que cada célula ocupa un territorio definido, aunque, se sabe que en ciertas regiones del cerebro existe una densidad mayor de células microgliales (**FIGURA 6**).

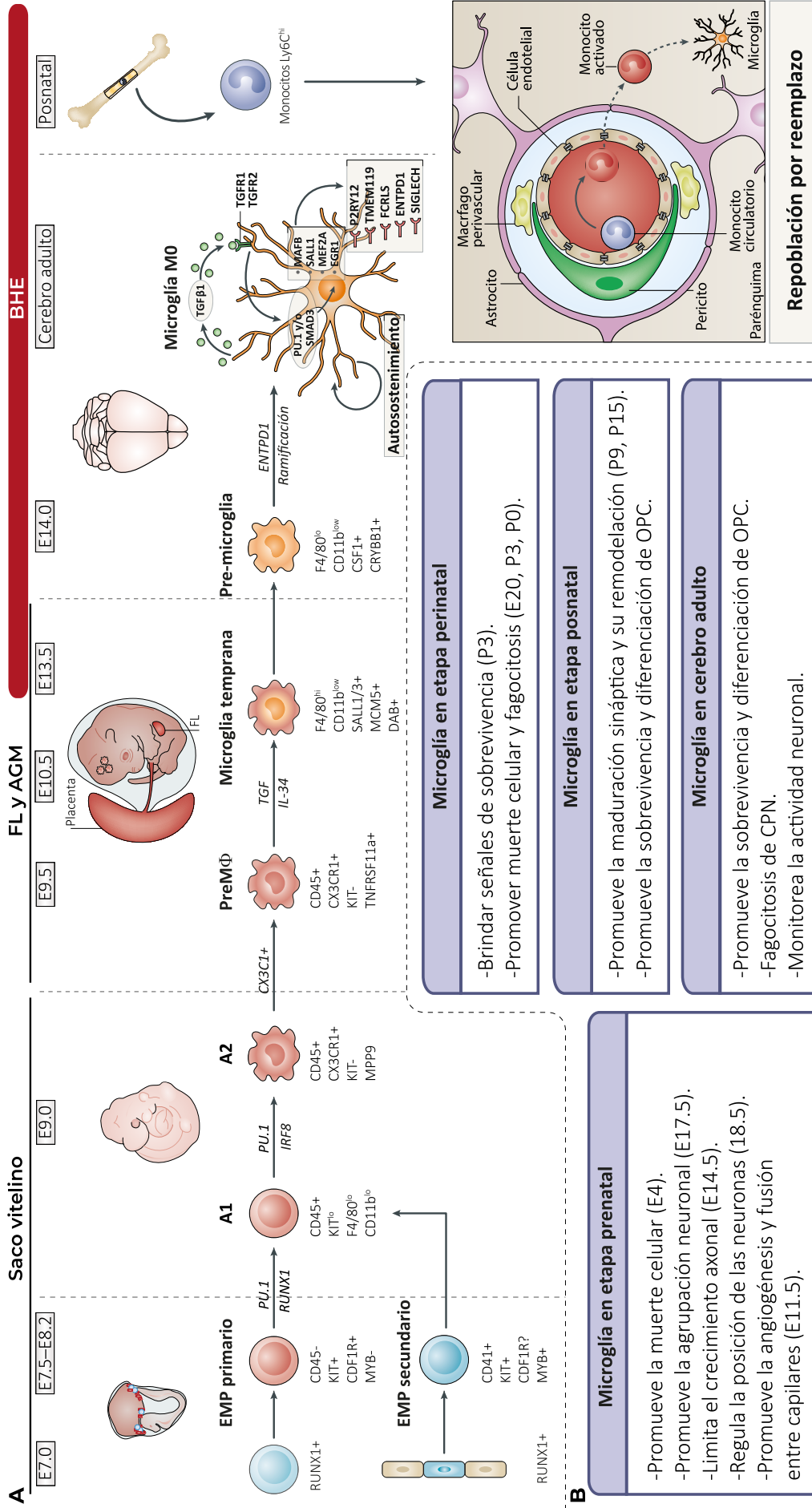


FIGURA 6. MICROGLIOGÉNESIS Y FUNCIONES DE LA MICROGLÍA EN REPOSO.

(A) se muestra el desarrollo de la microglía desde el estado embrionario hasta la edad adulta. La microglía únicamente tiene linaje de precursores eritromieloides del saco vitelino, ya que, la barrera hematoencefálica se cierra aproximadamente en el día E13.5 y los macrófagos de otros órganos embrionarios empiezan a nacer posteriormente a esta fecha. La cantidad de células microgliales se mantiene estable en un cerebro sano debido a que la microglía tiene capacidad autorrepliativa, sin embargo, en procesos patológicos puede ser sustituida por macrófagos circundantes. (B) se indican las funciones que la microglía tiene en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis del cerebro en diferentes etapas pre y posnatales. Modificado de Prinz et al., 2014, 2017; Li & Barres, 2017 y Butovsky & Weiner, 2018. E: día poscoito. CPN: células progenitoras de las neuronas; OPC: células progenitoras de oligodendrocitos.

Después de un evento patológico, la microglía, nuevamente, experimenta una transformación y toma distintas formas según su estado de activación que, en general, se muestran cada vez menos ramificadas hasta llegar a formas casi completamente redondeadas. Además, si, debido a un estado patológico se pierden células microgliales, estas pueden ser reemplazadas por macrófagos tisulares no parenquimatosos o monocitos circundantes que pueden adquirir las firmas de una microglía madura. Finalmente, estas células tienen la capacidad de migrar, proliferar y fagocitar (Butovsky et al., 2014; Butovsky & Weiner, 2018; Kettenmann et al., 2011; Kettenmann et al., 2013; Li & Barres, 2018; Prinz et al., 2017; Saijo & Glass, 2011)

Por otro lado, ya es bien sabido que la microglía no son células quiescentes que únicamente entran en acción cuando existe estrés celular; en este sentido, aunque se dice que la microglía está en reposo, realmente está supervisando dinámicamente el parénquima cerebral. Sus procesos se contraen y alargan equivalentemente y tiene un cuerpo celular, más bien, pequeño. Participa en procesos fundamentales en el desarrollo y homeostasis del SNC fetal y adulto sano. Cumple un papel importante en el control de proliferación y diferenciación neuronal, en la formación o poda (eliminación) de conexiones sinápticas y en la remodelación neuronal mediante la remoción de neuronas apoptóticas. Además, sus procesos están en movimiento, por lo que, monitorean constantemente el largo y ancho del SNC (Butovsky & Weiner, 2018; Li & Barres, 2018; Nimmerjahn et al., 2005).

La polarización microglial

La microglía son un conjunto de células versátiles y altamente especializadas; pueden modificar su citoesqueleto con el fin de adaptarse a una situación presentada. Como ocurre con todas las células del organismo, la morfología está ligada directamente a la función que desempeñan, por lo que se han identificado algunas formas y, con ello, funciones distintas que las relacionan con la intensidad con que promueven la inflamación (Lee et al., 2018; Parra et al., 2020; Torres-Platas et al., 2014). Se definió previamente a la inflamación como una de las respuestas del sistema inmune innato que hace frente a agentes nocivos gracias al auxilio de componentes diversos. En esta línea de pensamiento, la neuroinflamación, hace referencia al desarrollo de un proceso inflamatorio localizado en SNC en el que están implicadas células neurogliales y microgliales, así como macrófagos cerebrales no microgliales y leucocitos circundantes. La principal célula implicada en la respuesta del sistema inmune innato es la microglía (Sochocka et al., 2017).

Por otro lado, la activación microglial involucra cambios fenotípicos y genotípicos y, de manera análoga al resto de macrófagos, la microglía puede polarizarse según los estímulos que reciba desde su entorno próximo como de los mismos núcleos cerebrales y distante como los que llegan por vías sanguíneas o linfáticas. La microglía activada clásicamente (del espectro de activación M1) se caracteriza por los cambios en la membrana plasmática, un incremento en la capacidad de adherirse a sustratos inertes, fagocítica y pinocítica y, por tanto, por un alto número de fagolisomas y vesículas endocíticas. Así como, por activación del complejo inflamosoma, la producción de citocinas proinflamatorias, ROS y NRS, producto del estallido respiratorio, y $TNF\alpha$, que es un potente estimulador proinflamatorio de la mayoría de las células inmunes. La microglía activada alternativamente (del espectro de activación M2), por su parte, muestra propiedades antiinflamatorias: inhibe la producción de $INF-\gamma$, antagoniza las respuestas de este (incluida la activación de M1) y es inducida por diferentes mediadores. Tiene capacidad fagocítica incrementada y produce factores de crecimiento como el TGF, así como, interleucinas antiinflamatorias y proresolutivas como la IL-10; tiene la capacidad de modular la apoptosis, de retirar

células apoptóticas y regenerar los tejidos. Existen diferentes estados de M2 que pueden ser identificados por marcadores exclusivos de estos inmunofenotipos, sin embargo, no serán detallados en este escrito, además, el estado Mreg, aunque es probable que exista, no se ha identificado como tal (Butovsky et al., 2014; Butovsky & Weiner, 2018; Orihuela et al., 2016; Prinz et al., 2017; Walker & Lue, 2015).

La mayoría de los datos publicados sobre los requerimientos energéticos del espectro de activación inflamatoria se ha generado en células inmunes periféricas y solo unos pocos estudios examinan a la microglía (Caputa et al., 2019; Orihuela et al., 2016). Se ha afirmado que existe una reprogramación metabólica que está ligada a la regulación de la respuesta inflamatoria. Esta reprogramación metabólica refleja la respuesta de los macrófagos a los cambios de su entorno, y es fundamental para apoyar los distintos requisitos funcionales de los macrófagos activados.

Como lo hacen los macrófagos, es probable que la microglía en el estado de vigilancia dependa del metabolismo de la fosforilación oxidativa, esto es: en condiciones normales de oxígeno, la glucosa se convierte en piruvato a través de la glucólisis, entrando en el TCA para producir ATP a través de la oxidación fosforilativa (OxPhos). Asimismo, se ha mostrado tanto en macrófagos de la periferia como en células microgliales *in vitro*, que, la estimulación con lipopolisacárido (LPS), es decir, la inducción del perfil proinflamatorio causa que los macrófagos cambien su actividad metabólica de la OxPhos a la glucólisis anaerobia. El aumento de la glucólisis permite desencadenar rápidamente la actividad microbicida y permite que las células sobrevivan en un ambiente hipóxico. Además, aumenta la demanda de glucosa del medio y la producción de lactato, la activación de la vía de las pentosas fosfato (PPP, del inglés: *pentose phosphate pathway*) y la disminución del consumo de oxígeno mitocondrial. La activación de los macrófagos también depende de la producción de NO que, a través del metabolismo de la arginina, puede inhibir reversiblemente la cadena transportadora de electrones y con ello desviar la fosforilación oxidativa a la glucólisis anaerobia (Fumagalli et al., 2018; Kourtzelis et al., 2020).

En contraste con lo anterior, la estimulación con IL-4 causa que los macrófagos y las células microgliales reduzcan el consumo de glucosa y la producción de lactato. En ese sentido, contrariamente a los inducidos con LPS, los macrófagos asociados al perfil M2, utilizan la *oxidación de ácidos grasos* y la OxPhos para la producción de energía; muestran un alto consumo de oxígeno mitocondrial y una gran capacidad respiratoria de reserva. Se sugiere que este cambio está asociado con las acciones fagocíticas de las células y la reducción en la necesidad de reacciones anabólicas, así como con las funciones a largo plazo como la reparación de tejidos y la curación de heridas. El perfil antiinflamatorio y reparativo promueve la proliferación celular, la reparación y remodelación de tejidos a través de la síntesis de poliaminas y colágeno. Esto sugiere que el destino metabólico de la arginina está intrínsecamente relacionado con la activación de macrófagos, con vías divergentes que compiten para producir NO a través de iNOS en M(LPS), o para producir prolina y poliaminas a través de arg-1 en M(IL-4). Además, este estado metabólico contribuye a realizar la fagocitosis al regular las demandas de energía y la fluidez de la membrana. En ese sentido los ácidos grasos derivados de la dieta son buenos inductores de una microglía proregenerativa (Fumagalli et al., 2018; Kourtzelis et al., 2020).

El intestino

El tracto digestivo consta de la boca, la faringe, el esófago, el estómago y los intestinos delgado y grueso. Tiene una longitud de 5 - 7 metros en una persona viva. En este se lleva a cabo la digestión de los alimentos, gracias a los órganos accesorios, como los dientes, la lengua, las glándulas salivales, el hígado, la vesícula biliar y el páncreas; así como la absorción de nutrientes provenientes de la dieta y los producidos por la microbiota intestinal.

Las paredes del TGI, a partir del esófago hasta el canal anal, tiene una arquitectura tisular semejante compuesta por cuatro capas, a saber: de la luz al exterior, la mucosa: compuesta por el epitelio mucoso, la lámina propia y una fina capa muscular llamada *muscularis mucosae*; la submucosa: que contiene a las principales glándulas; la muscular: compuesta por dos capas musculares, la circular, que está dispuesta perpendicularmente al tubo digestivo y la longitudinal, que está dispuesta paralelamente el TGI y la capa serosa: formada por tejido conectivo y por el peritoneo (**FIGURA 7**) (Tortora & Derrickson, 2017).

La mayor parte de la absorción de los nutrientes digeridos ocurre en el intestino delgado y la mayor parte del agua absorbida de los alimentos, así como los nutrientes producidos por la microbiota intestinal se llevan a cabo en el intestino grueso. De forma general, histológicamente el intestino delgado y grueso están compuestos por las mismas capas escritas arriba. La mucosa en sí misma es una región supraestructural y superficial del intestino. Una capa de mucina recubre al epitelio que, a su vez, recubre la lámina propia formada por tejido conectivo y vasos sanguíneos y linfáticos. El revestimiento epitelial del intestino delgado está formado por los *enterocitos* y las *células secretoras*. Las células secretoras son: las células *calciformes* que participan en la liberación de mucina y las células de *Paneth* que controlan la diversidad bacteriana mediante la secreción de defencinas y lisozimas y están capacitadas para la fagocitosis. Entre las células *enteroendócrinas* se encuentran las células S, las células CCK, y las células K, que tienen el control neuroendocrino a través de la liberación de sustancias como la secretina, la colesistocinina, y el péptido insulínico dependiente de glucosa, respectivamente, entre otras. Los enterocitos, por su parte, son las células encargadas de absorber los nutrientes y los líquidos lumbinales del intestino. El epitelio del intestino grueso está compuesto principalmente por enterocitos y células secretoras calciformes (Madigan et al., 2018; Tortora & Derrickson, 2017) (**FIGURA 7**).

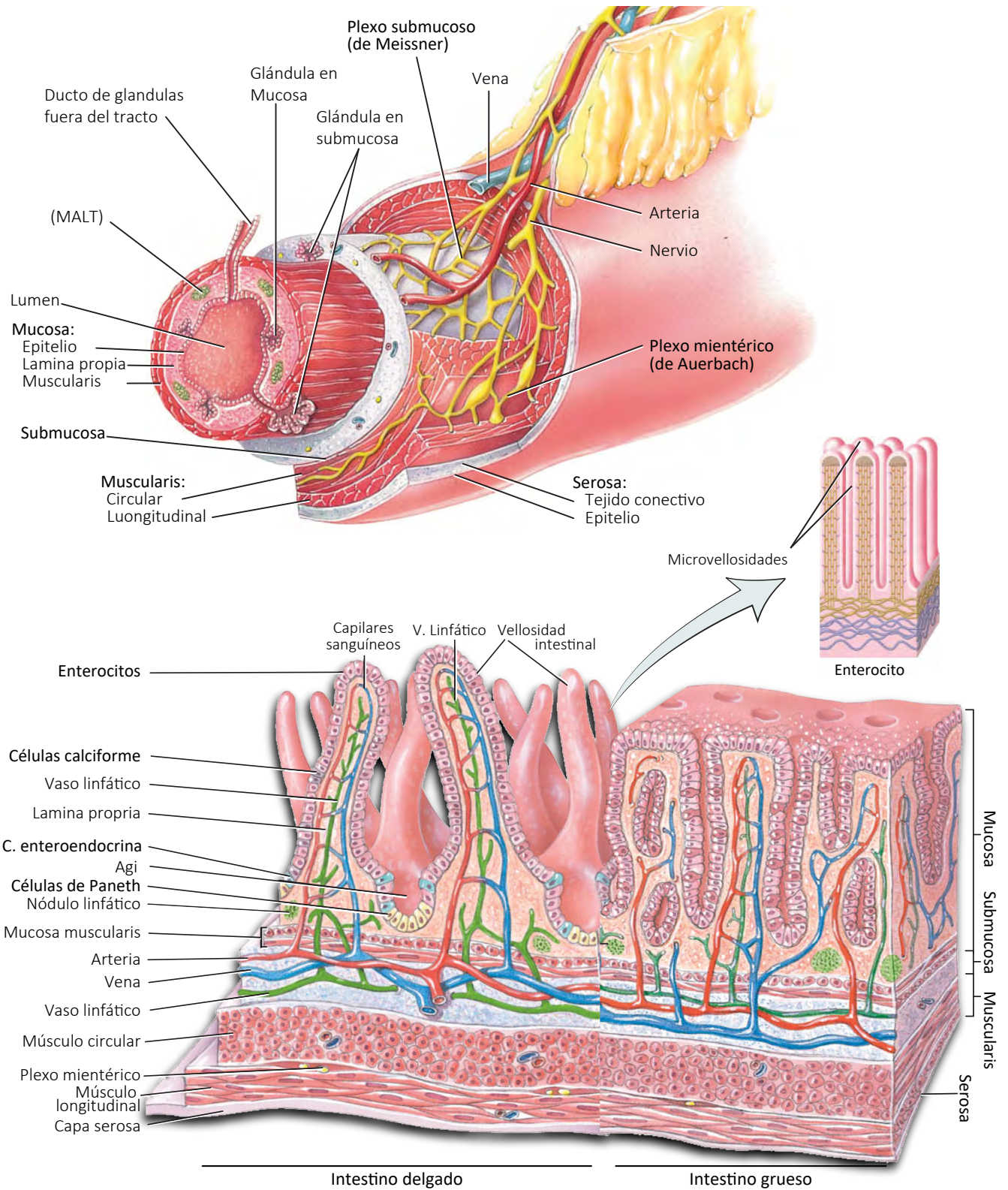


FIGURA 7. CAPAS DE TRACTO GASTROINTESTINAL.

Se muestran las imágenes tridimensionales de las capas que componen el tracto gastrointestinal y, especialmente, de los intestinos delgado y grueso. Tomadas de Tortora & Derrickson, 2017.

Inervación intestinal

De forma general, el sistema nervioso puede clasificarse según la anatomía o según la función. En el primer caso, existe el sistema nervioso central (SNC) formado por el encéfalo y la médula espinal. En el segundo, el sistema nervioso somático o voluntario, que involucra al músculo esquelético, y autónomo o visceral. Este último a su vez se subdivide en los sistemas nerviosos simpático (SNS) y parasimpático (SNP), que se relaciona con el movimiento de los músculos liso y cardíaco y de las glándulas, y el sistema nervioso entérico (SNE) relacionado con el músculo liso y las glándulas del TGI (Purves et al., 2018; Tortora & Derrickson, 2017).

El SNE es presentado como el cerebro intestinal ya que consta de 100 millones de neuronas que se extienden desde el esófago hasta el ano y se piensa que existen más neuronas en el intestino que en la medula espinal. Las neuronas del SNE están organizadas en dos plexos: el mientérico (o de Auerbach), ubicado entre las capas musculares del TGI, y el submucoso (o de Meissner), encontrado en la submucosa. Los plexos constan de neuronas motoras, interneuronas y neuronas sensoriales (Purves et al., 2018; Tortora & Derrickson, 2017).

Debido a que el plexo mientérico está ubicado entre las capas musculares longitudinales y circulares, está más relacionado con la motilidad del TGI y, las motoneuronas del plexo submucoso, con el control de la secreción de las glándulas del TGI. A su vez, las interneuronas mantienen la comunicación entre ambos plexos nerviosos. Finalmente, las neuronas sensoriales contienen dos tipos de receptores: los mecanorreceptores, y los quimiorreceptores, los cuales, se encargan de conocer el ambiente luminal, así como captar la distensión o estrechez, la oxigenación y el dolor difuso en las paredes del tracto e integrarlas hacia el SNC. Es relevante saber que la actividad aferente proveniente del TGI proporciona de retroalimentación a los reflejos locales que modulan la actividad motora visceral en todo momento dentro de cada órgano. Asimismo, informa a los centros integradores superiores de los patrones más complejos de estimulación que podrían indicar condiciones potencialmente amenazantes o requerir la coordinación de actividades motoras viscerales, motoras somáticas, neuroendocrinas y conductuales más difusas. El *núcleo del tracto solitario* en el bulbo raquídeo es la estructura integradora de la información sensorial visceral en el cerebro. Además, es interesante saber que las conexiones viscerales llegan, a través, del núcleo del tracto solitario, hasta el hipotálamo y el núcleo parabránquial que releva, entre otros núcleos, con la amígdala. Núcleos importantes en la respuesta al estrés (Purves et al., 2018; Tortora & Derrickson, 2017).

El intestino recibe innervaciones simpáticas, desde la región torácica (T6-10) y lumbar superior de la médula espinal, y parasimpáticas, desde el tronco del encéfalo, en específico, del núcleo motor dorsal del *nervio vago* (*X par craneal*) y de las regiones sacras (S3-S4) de la médula espinal. Además, las neuronas posganglionares parasimpáticas hacen sinapsis con las neuronas del SNE. (Purves et al., 2018; Tortora & Derrickson, 2017) (**FIGURA 8**).

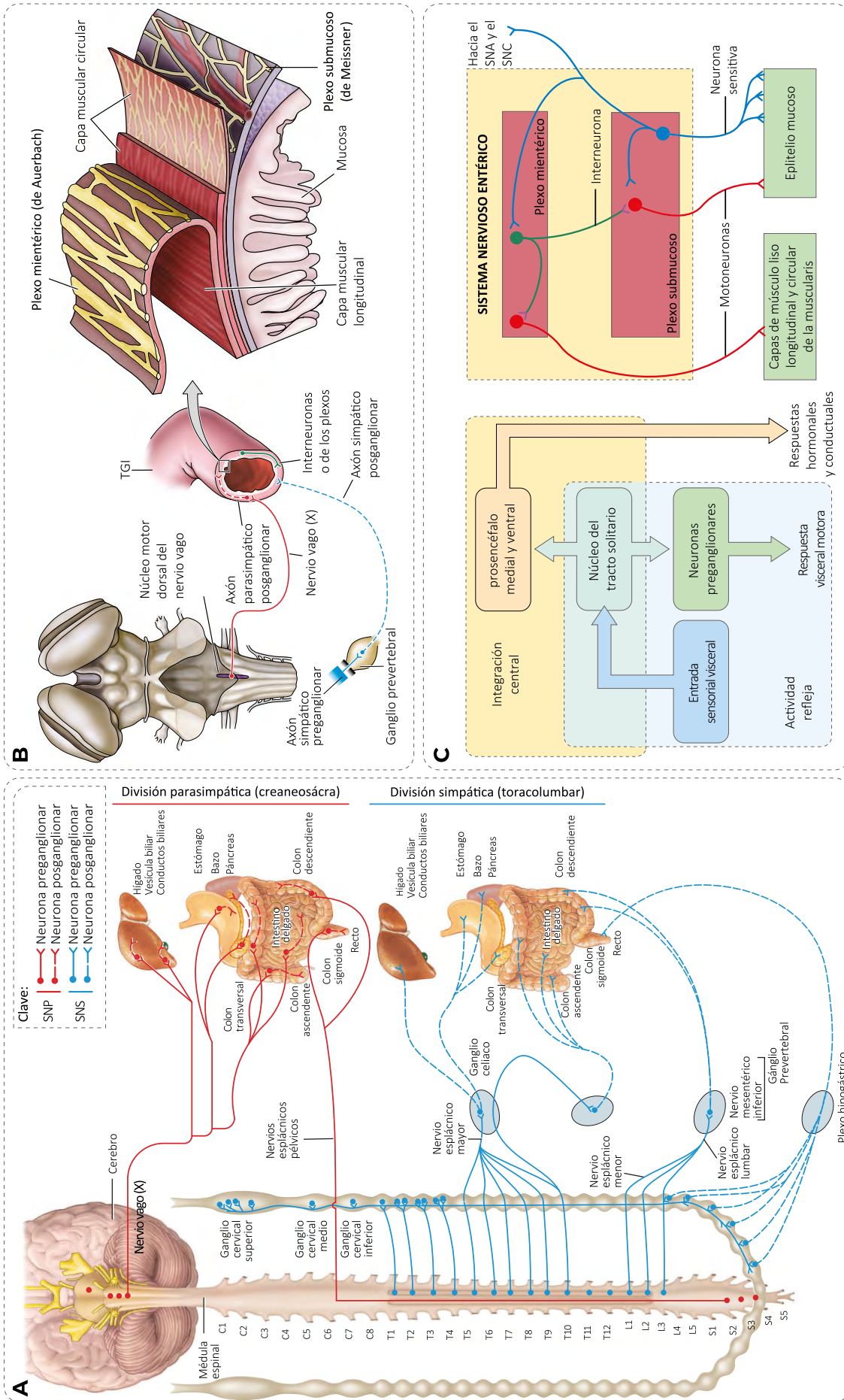


FIGURA 8. INERVACIONES INTESTINALES.

(A) Se muestran las inervaciones parasimpáticas (rojo) y simpáticas (azul) del intestino. Las primeras surgen del nervio vago y de las regiones sacras (S3-4), mientras que las segundas de las regiones torácicas (T6-10). (B) Se representa una imagen tridimensional de los plexos intestinales dentro de las capas del tracto gastrointestinal. (C) se indican las conexiones del SNE y del SNC. Tomadas de Purves et al., 2018; Tortora & Derrickson, 2017.

El tejido linfoide asociado al tubo digestivo (GALT)

Junto con la piel, las mucosas forman parte del sistema inmune innato físico. La mucosa está formada por las células epiteliales cilíndricas y la lámina propia. La lámina propia es un tejido conectivo elástico a través del cual cruzan canales linfáticos y vasculares y desde del que se depositan células inmunitarias. La mucosa intestinal forma con invaginaciones, que está compuesta por las principales células secretoras, y proyecciones digitiformes, formada principalmente por células epiteliales y calciformes, denominadas criptas y vellosidades intestinales, respectivamente. Además, en ciertas regiones de la mucosa intestinal se encuentran cúmulos de tejido linfoide recubiertos, principalmente, por células epiteliales y células M, células con una alta especialización fagocítica y de presentación de antígenos. Esta zona no tiene formas ni de criptas ni de vellosidades, sino en forma de domo.

La mucosa estructural está cubierta por una capa de bacterias comensales: la microbiota; por una capa de moco formada por agua, iones y mucina que tiene cuenta con dominios de unión a carbohidratos que forma un gel capaz de contener anticuerpos provenientes de la lámina propia y de atrapar bacterias útiles para estimular una respuesta inmune de bajo grado y controlada y por diversas proteínas como los TLR, NLRyRLRy glicoproteínas: como el glicoálx, capaces repeler estáticamente a los cuerpos celulares bacterianos (Abbas et al., 2015; Pavón-Romero et al., 2021; Tortora & Derrickson, 2017).

La presencia de la microbiota y el intercambio de sustancias entre esta y el intestino justifica la presencia de tejido linfoide tal que provea de protección a la probable vulnerabilidad (por contacto y permeabilidad) del epitelio hacia una potencial invasión microbiana. La estructura del *tejido linfoide asociado al intestino* (GALT, del inglés: *gut associated lymphoid tissue*) está bien descrita: esta se encuentra por debajo de la capa epitelial asociada a folículo linfoide (en la lámina propia y en la submucosa) y contiene grandes cantidades de células plasmáticas productoras de anticuerpos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos B organizadas en agrupaciones y folículos y linfocitos T distribuidas difusamente por toda la mucosa. Finalmente, las *células M*, que conforman entre 10-20% de la lámina epitelial, no tienen glucocálx y tienen contacto directo con los antígenos de las bacterias de la microbiota, tal que, activan un mecanismo de presentación antigénica, los linfocitos los reciben y, a su vez, producen anticuerpos tipo A. Este mecanismo también es logrado por las células dendríticas que tienen extensiones protoplasmáticas transepiteliales (Abbas et al., 2015; Owen et al., 2014; Pavón-Romero et al., 2021; Tortora & Derrickson, 2017) (**FIGURA 9**).

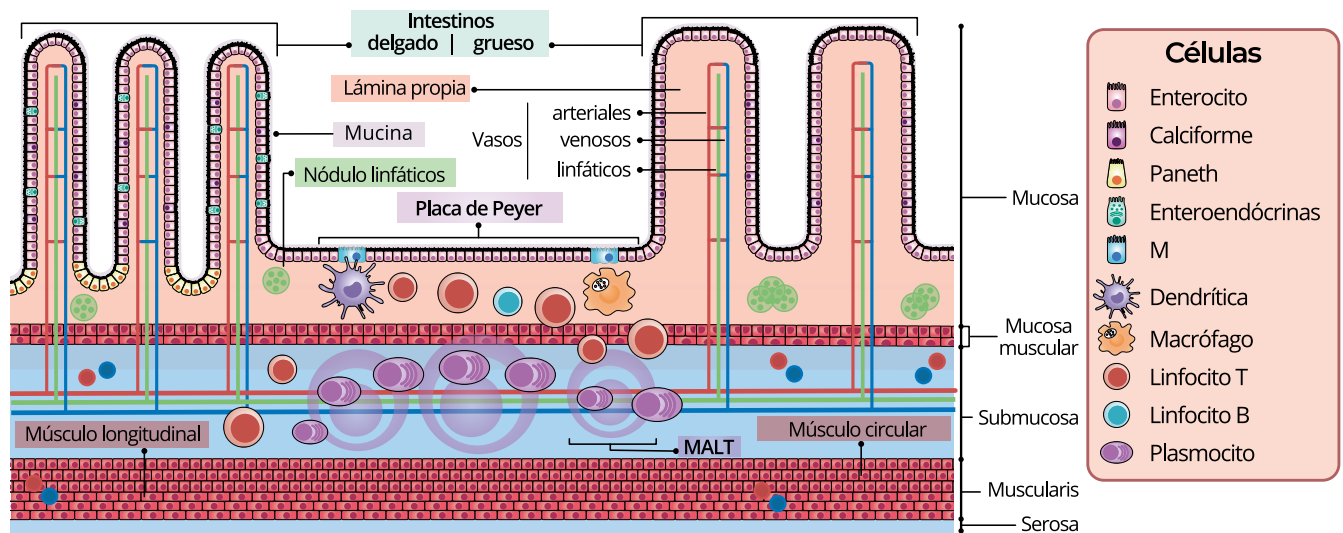


FIGURA 9. TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A LA MUCOSA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL.

Se muestra la estructura general del intestino. El tejido linfático asociado a mucosa tiene un componente celular formado por los macrófagos tisulares intestinales, las células dendríticas de la submucosa y transepiteliales, las células M y calciformes en el epitelio y por un conglomerado de células linfoides que se ubican en la lámina propia y la submucosa. También tienen una fracción humoral compuesta por la mucina creada por las células calciformes que retienen proteínas y anticuerpos generados por el componente celular de las GALT. Modificado de Pavón-Romero et al., 2021.

La microbiota

Todos los animales, pero principalmente los vertebrados tienen en sus cuerpos condiciones tales que son favorables para el crecimiento de hongos, bacterias y virus, es decir, las especies animales están cubiertas y contienen en su interior un microecosistema de microorganismos en una relación simbiótica, esto es: un mutualismo benéfico para el huésped: los microorganismos y el hospedador: la especie animal. Esta comunidad compleja de microorganismos y las funciones que realizan se denomina microbioma, al conjunto de virus: viroma, al conjunto de hongos micobiota y la de bacterias microbiota. El número de bacterias es tan abundante que se estima que podría haber un número igual o superior de bacterias al número de células del organismo en sí (una relación 1:3). La microbiota que se encuentra en la piel, es una de las causantes de los olores que expide la piel; en las vías respiratorias superiores, o sea: desde la cavidad nasofaríngea hasta la laringe y rara vez se encuentran microorganismos en el tracto respiratorio inferior (la tráquea, los bronquios y bronquiolos). También se encuentran en las vías urinarias: la uretra, pero no en la vejiga. En mujeres, específicamente a partir de la adolescencia, crecen bacterias acidolácticas en la vagina. Finalmente, la microbiota más estudiada y que ha tomado mucho interés en la comunidad científica es la que se encuentra en el tracto digestivo, es decir: en la boca, el estómago y, especialmente, en los intestinos (Madigan et al., 2018).

El intestino humano alberga una multitud de microorganismos comúnmente denominados como microbiota. Se estima que existen entre 10^{11} - 10^{12} microorganismos/gramo de contenido intestinal. En conjunto, tiene una masa estimada de 1 a 2 kg, se cuentan en billones y juntos poseen 100 veces la cantidad de genes en el genoma humano. La composición bacteriana se establece durante las primeras horas posparto y se desarrolla, según distintos factores, tales como: el método de parto (cesárea o parto natural); si al infante se le amamanta o se le da alguna fórmula láctea, la alimentación a lo largo de la vida; el uso de antibióticos y fármacos en general; la exposición a infecciones y la exposición a factores estresantes (Kelly et al., 2015; Madigan et al., 2018; Rea et al., 2016).

Los microorganismos en el tracto intestinal humano se pueden dividir en tres dominios basados en la filogenia molecular: *Eucarias*, *Bacterias* y *Arqueas*. El dominio *Eucaria* incluye organismos como levaduras y parásitos unicelulares. Por otro lado, el dominio *Arquea* está dominado por las metanobacterias. Por su parte, el dominio *Bacteria* es el dominio prominente en el intestino y, entre estos, tan solo los filos *Firmicutes* (64%) y *Bacteroidetes* (23%) cubren el 89% del total. Además de estos, también está formado por *Proteobacterias* (8%), *Actinobacterias*, *Fusobacterias*, *Verrucomicrobia*, *Sinergistetes*, *Espiroquetas* y *Cianobacterias* (en suma, 3%). Así mismo, se ha estimado que el tracto gastrointestinal de los seres humanos adultos contiene aproximadamente entre 500 y 1000 especies bacterianas distintas y más de 7000 cepas de bacterias (Abenavoli et al., 2019; Kelly et al., 2015; Rea et al., 2016).

La interacción de la microbiota y el hospedero es simbiótica, por un lado, el hospedador provee de un ambiente propicio para el desarrollo de los microorganismos y, por su parte, las bacterias ofrecen protección contra patógenos y producen sustancias químicas bioactivas como bacteriocinas, ácidos biliares, neurotransmisores, colina, vitamina B12 y K, y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que son esenciales para la salud del hospedero. Las bacteriocinas inhiben el crecimiento de otras bacterias cercanas y limitan la proliferación de patógenos, contribuyendo de manera importante con las defensinas y de más proteínas producidas por las células de Paneth. Mientras que los AGCC, incluidos el ácido butírico, el ácido acético, el ácido propanoico y el ácido láctico son metabolitos bacterianos derivados de la fermentación de polisacáridos que pueden activar los receptores de ácidos grasos libres (FFAR del inglés: Free fatty acid receptor), mediar eventos epigenéticos y tener acciones neuroactivas y hematopoyéticas. Además, fomenta el correcto funcionamiento de las barreras epiteliales intestinales y hematoencefálica, al regular la expresión de proteínas de unión estrecha como ocludina y claudinas. Además, las vitaminas B12 y K, que no son sintetizadas por los humanos, son producidas por la microbiota y absorbidas por el intestino; lo mismo que la dopamina (DA) y la serotonina y esteroides que tienen implicaciones neuronales y metabólicas, respectivamente (Harsanyiova et al., 2020; Kelly et al., 2015; LeBlanc et al., 2017; Madigan et al., 2018; Markowiak-Kopeć & Śliżewska, 2020; Pavón-Romero et al., 2021; Russell et al., 2013). Asimismo, el ácido 10-oxo- trans -11-octadecenoico (KetoC) y el ácido 10-hidroxi- cis -12-octadecenoico (HYA) son ácidos grasos de cadena larga generados a partir del ácido linoleico por el *L. plantarum* y se ha informado que tienen actividad antiinflamatoria en el intestino y cerebro (Ikeguchi et al., 2018). Por ello, las hipótesis actuales han situado a la microbiota como un componente crucial en la regulación del desarrollo de las funciones del organismo que colonizan como el desarrollo del sistema inmune y nervioso, el metabolismo y la conducta.

Según lo dicho, la alteración en la composición y en la concentración de los elementos que forman la microbiota, es decir, la *disbiosis*, es perjudicial para los organismos vivos que la padecen. La disbiosis es causada por el elevado consumo de grasas saturadas y carnes rojas, así como, debido al bajo consumo de fibra o de alimentos fermentados, así como por el uso desmedido de antibióticos. En ausencia de una microbiota sana, organismos oportunistas, como parásitos, levaduras como *C. albicans* y bacterias como estafiloscocos o clostridios patógenos pueden poblar la luz intestinal y causar afectaciones sobre la barrera epitelial, inducir una respuesta proinflamatoria exasperada a nivel local y, si se vuelve crónica, a nivel general.

Afortunadamente, la evidencia informa que el consumo de microorganismos probióticos, benefician la salud intestinal y la salud general. Estos microorganismos pueden encontrarse naturalmente en alimentos fermentados, además, en el mercado existen presentaciones farmacéuticas que contienen uno o más microorganismos que han sido probados en humanos y animales y se conocen sus efectos sobre la salud (**FIGURA 10**).

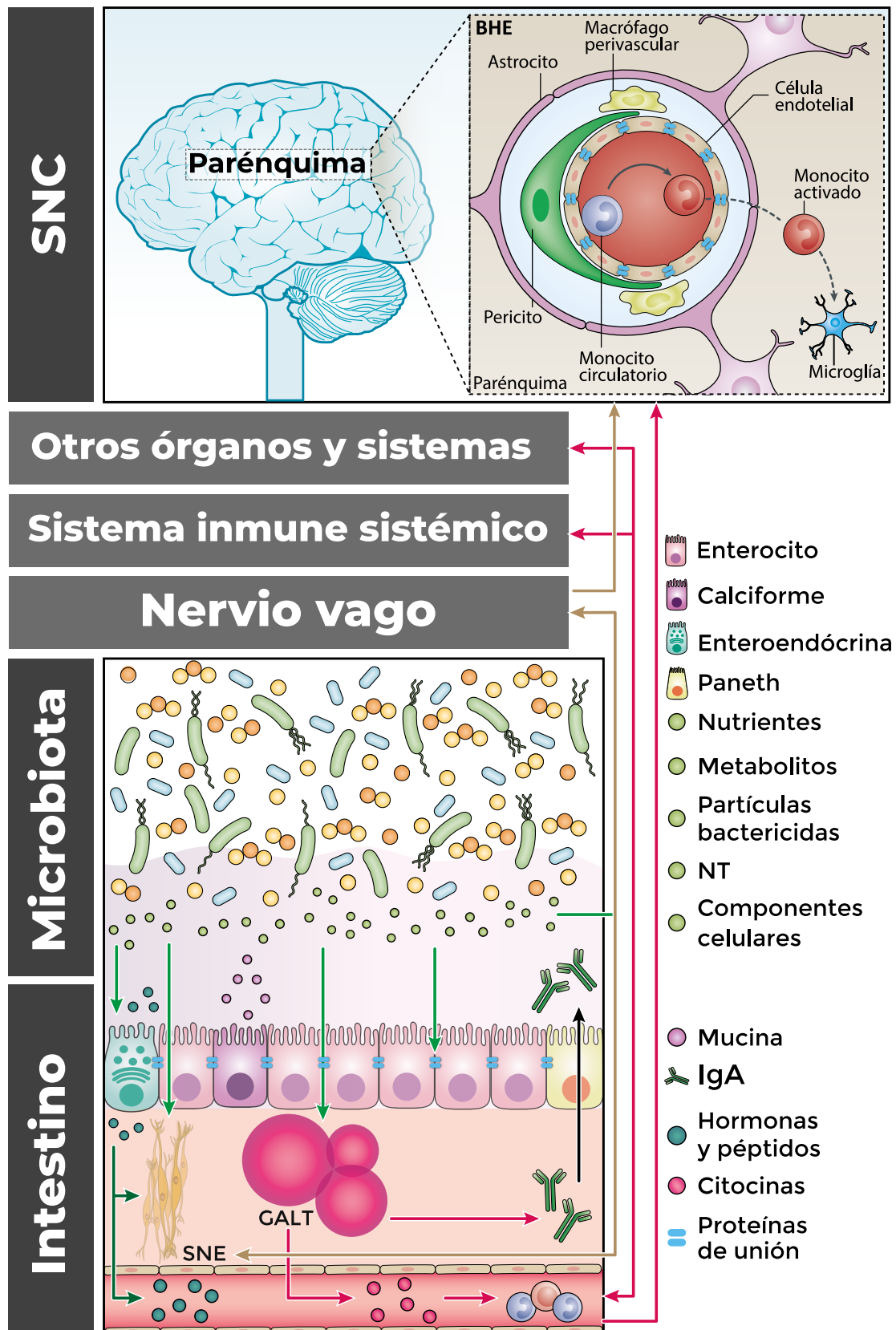


FIGURA 10. LA COMUNICACIÓN ENTRE LA MICROBIOTA Y EL CEREBRO.

Los metabolitos y componentes de recambio celular que produce la microbiota, los productos de la digestión y las proteínas producidas por las células del sistema inmune estimuladas por los componentes antedichos son los principales factores de comunicación. Los principales canales de comunicación son las vías neuronales, endócrinas e inmunológicas. Esta comunicación es bidireccional. El diagrama BHE fue tomado y modificado de Li & Barres, 2017. BHE: barrera hematoencefálica. GALT: tejido linfóide asociado al tracto gastrointestinal; NT: neurotransmisores; SNC: sistema nervioso central; SNE: sistema nervioso entérico.

Los probióticos

Los probióticos son organismos vivos (bacterias y levaduras) que, ingeridos en una concentración adecuada: entre 10^6 y 10^8 , unidades formadoras de colonia (UFC), causan beneficios a la salud. Existe una gran variedad de microorganismos con capacidad probiótica, entre los que se encuentran: *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus plantarum* 299, *Lactobacillus sporogens*, *Enterococcus* SF68, *Bifidobacterium lactis* BB12 (L), *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei* (L), *Bifidobacterium longum* BB 536 (L), *Lactobacillus acidophilus* LA1, *Escherichia coli* Nissle 1917 (serotipo 06:K5:H1), aunque las especies *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son, en general, los probióticos más utilizados (de Melo Pereira et al., 2018).

La selección de los probióticos requiere de un estudio detallado sobre su capacidad de superar las condiciones adversivas del TGI (v.g: las enzimas de la saliva, los diversos niveles de pH y los jugos estomacal y pancreáticos, las sales biliares y los movimientos peristálticos y los antimicrobianos intestinales). Entre estos estudios se encuentran algunos exámenes fisicoquímicos que evalúan el contacto de la pared o membrana bacteriana con las células epiteliales del TGI, ya que, es necesario que las bacterias se adhieran al epitelio intestinal para ser considerados candidatos a probióticos. Además, deben mostrar que son capaces de producir sustancias que inhiban el crecimiento de bacterias patológicas como ácidos orgánicos, enzimas, bacteriocinas, etc. Y, finalmente, los candidatos a probióticos deben mostrar seguridad de uso. Sobre este aspecto se considera cómo se aisló el microorganismo, su identidad taxonómica, que no sea virulenta, infectiva, tóxica y que no sea capaz de transferir genes de resistencia a antibióticos. Para incrementar la compatibilidad de los probióticos con los humanos y su sobrevivencia al TGI, la mayoría de los probióticos disponibles en el mercado fueron aislados de humanos que los ingirieron. A pesar de que las bacterias cumplan con estos estudios no se debe considerar que los probióticos son seguros por completo debido al riesgo latente sobre la transmisión de genes de resistencia y al grado de permeabilidad del epitelio intestinal, ya que, estas podrían superar las barreras físicas del sistema inmune e invadir al macroorganismo causando afectaciones graves (de Melo Pereira et al., 2018; Doron & Snyderman, 2015; dos Santos et al., 2015; Gonzales-Sánchez et al., 2010; McFarland, 2014).

La evidencia sobre los beneficios de consumir probióticos incluye la repoblación de una microbiota sana, la prevención y el alivio de varios tipos de diarrea y el tratamiento de la colitis por *Clostridium difficile*, así como la modulación de distintas interleucinas y citocinas proinflamatorias y factores inmunomoduladores; pero estos efectos no son únicamente a nivel intestinal sino que se ha probado que pueden causar eventos benéficos en otros órganos como el hígado o el cerebro.

Finalmente, un estudio de revisión sistemática con fuentes entre 1985 y 2013, en los que se analizaron tres situaciones, a saber: (modelo A) pacientes con microbiota sana a los que se les indujo una alteración en esta y luego se trataron con probióticos, (modelo B) pacientes con la microbiota alterada que fueron tratados con probióticos y (modelo C) pacientes sin alteraciones en la microbiota que fueron tratados con probióticos, se obtuvo que, para el modelo de estudio A, la bacteria *Lactobacillus rhamnosus* GG sola o mezclada con *L. bifidus* y *L. acidophilus* restaura parcialmente la microbiota alterada con ceftriaxona y que la mezcla de bacterias que incluye al probiótico *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis* restaura parcialmente la microbiota de pacientes con *H. pylori* elevada y que fueron tratados con amoxicilina y claritromicina, o bien, restaura la microbiota de pacientes sin afectaciones ni modificaciones en la microbiota, aunque, en este caso, es preferible asumir que el efecto se atribuye a la mezcla y no a una cepa en específico. Asimismo, para el modelo B, los tipos de factores pre-

existentes que alteraron la microbiota incluyeron pacientes con dermatitis atópica, alergias, cirrosis, vaginosis bacteriana, síndrome del intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa y diverticulitis), diarrea idiopática, alimentación enteral, síndrome del intestino corto y cáncer de colon, y se obtuvo que *B. animalis* lactis, por sí sola, no modifica la microbiota de los pacientes evaluados. Por su parte *L. rhamnosus* mejoró la puntuación de Nugent para vaginosis. Además, en la mayoría de los estudios en los que se incluye a esta bacteria probiótica, restaura, mejora, o modifica la microbiota. Finalmente, para el modelo C, en donde los participantes no tuvieron exposición a antibióticos o medicamentos o presencia de enfermedades agudas o crónicas, ni *B. animalis* lactis ni *L. rhamnosus* GG, administradas individualmente o en conjunto, modificaron la microbiota normal de los voluntarios. Además, el autor refiere, entre otros, a *L. rhamnosus* como un probiótico capaz de restaurar la microbiota, especialmente en la diarrea asociada antibióticos (McFarland, 2014).

Por lo descrito, la investigación sobre los mecanismos de acción de los probióticos, las repercusiones de su uso sobre los efectos en la respuesta inmune y adaptativa; sobre los distintos efectos tisulares y sistémicos; así como los efectos nutricionales deberán ser estudiados con ímpetu e integración de las distintas áreas académicas y de salud para desentrañar a cabalidad (Markowiak-Kopec & Ślizewska, 2020; McFarland, 2014; Olveira & González-Molero, 2016).

Eje microbiota-intestino-cerebro

Se sabe que existe una comunicación bidireccional entre el intestino y el cerebro que está regulada a nivel neuronal, endócrino e inmunológico que se ven influidas en todos los aspectos por la microbiota, los metabolitos que produce y los productos de recambio por el ciclo de vida bacteriano. Estos componentes forman el eje microbiota-intestino-cerebro, el cual está constituido por una matriz dinámica de tejidos y órganos que incluyen a los sistemas nervioso central, periférico y entérico, a las glándulas endócrinas, al intestino, a las células inmunitarias y a la microbiota gastrointestinal. Se propone que estos componentes se comunican de una manera compleja y multidireccional para mantener la homeostasis y que, esta interacción, contribuye a la regulación de eventos clave del desarrollo de los sistemas inmune y nervioso central, el metabolismo y la conducta. Lo cual implica que existe un mecanismo de acción, de mantenimiento, deterioro o de recuperación de la comunicación entre los componentes de este eje que aún no se han resuelto.

Aún está en debate cómo las señales de la microbiota llegan hasta el cerebro. Sin embargo, hay algunas propuestas sobre esta vía de acceso. Como se vio un apartado anterior, el SNC está conectado al sistema nervioso autónomo (SNA), el cual, se divide funcionalmente en SNS, SNP y SNE. Los cuales tienen conexión directa con el tronco del encéfalo, el hipotálamo y el sistema límbico, así como con el sistema de respuesta al estrés: el eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal que podría estar influyendo en la composición de la microbiota y, a través de la liberación de los corticoesteroides, regular el eje sistema inmune-cerebro. Por otro lado, los componentes estructurales de los microorganismos de la microbiota (como las endotoxinas), así como los metabolitos que producen estimulan localmente al GALT, inducen la producción de efectores biológicos (como inmunoefectores, mensajeros endocrinos y subproductos microbianos circulantes), y pueden infiltrarse en los sistemas sanguíneo y linfático a fin llegar a diferentes puntos anatómicos como el cerebro y tener efectos sobre la micro y astrogliya, y, así, generar cambios en el entorno celular (**FIGURA 10**) (Ceppa et al., 2020; Rea et al., 2016; Zheng et al., 2020).

Por otro lado, la dieta es un factor relevante para tener una vía de comunicación intestino-cerebro, ya que, esta determina los metabolitos que la microbiota producirá. Una dieta alta en fibra causará que la microbiota

produzca AGCC y estos, a su vez, estimulen procesos como la producción de mucina, el incremento de proteínas de adhesión celular en la capa epitelial entérica y en la BHE, es decir: en el fortalecimiento de las barreras y la disminución de la permeabilidad cerebral e intestinal. Los AGCC también pueden estimular a las neuronas del SNE promoviendo la secreción de serotonina, dopamina y de ácido γ -aminobutírico (GABA), así como, sus precursores a nivel intestinal que, eventualmente podrían viajar hasta el SNC. Finalmente, la microbiota, a través de los AGCC, se comunica con las células enteroendócrinas del intestino para producir péptidos neuroactivos (péptido YY, neuropéptido Y, CCK y sustancia P, entre otras) y causar efectos neuroprotectores entéricos. Además, los AGCC causan la neuroprotección mediante la inducción de las neurotrofinas BDNF y GDNF que se logra a través de la acetilación de la histona H3, implicada en la inhibición de la histona desacetilasa. interesantemente, los AGCC promueven el incremento de la producción de la proteína semejante a glucagón-1 (GLP-1), que es capaz de atravesar la BHE y que tiene como objetivo al receptor GLP-1R (ubicado en neuronas, astrogía y microglía) que provoca un adecuado enfrentamiento al estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria; ala inhibición de la apoptosis y aumenta la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) (Braniste et al., 2014; Ceppa et al., 2020; Cox & Weiner, 2018; Kelly et al., 2015; Srivastav et al., 2019; Suganya & Koo, 2020; Sun et al., 2021; Wang et al., 2022; Willemsen et al., 2003).

Asimismo, la microbiota es capaz de producir los precursores y metabolitos del triptófano, la 5-hidroxitriptamina (5HT), la glutamina, la histamina y de los aminoácidos de cadena ramificada. La tirosina descarboxilasa (TDC), cuyos genes están codificados principalmente en el genoma de *Lactobacillus* y *Enterococcus*, es esencial para la biosíntesis de tiramina. Dada la similitud entre la estructura química de la L-tirosina (precursor de la tiramina) y la levodopa (precursor de la dopamina), esta enzima también podría estar involucrada en la síntesis de dopamina, además, estos precursores sí atraviesan la BHE lo que hace posible incrementar los sustratos para la síntesis de neurotransmisores en el cerebro. En ese sentido se sabe que las cepas *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* producen GABA a partir de glutamato monosódico; *L. plantarum* y *L. lactis* mostraron capacidad para producir glutamato y *C. perfringens*, de 5-hidroxitriptamina (5HT) y, finalmente, la biosíntesis de dopamina se produce tanto en las neuronas como en los compartimentos periféricos, incluido el TGI (Braniste et al., 2014; Ceppa et al., 2020; Cox & Weiner, 2018; Kelly et al., 2015; Srivastav et al., 2019; Suganya & Koo, 2020; Willemsen et al., 2003).

Existe evidencia sobre el papel que tiene la microbiota en el desarrollo sano del sistema inmune y del SNC, pero aún existen pocos datos sobre los mecanismos y las vías por las cuales la microbiota influye en las funciones cerebrales e inmunológicas (Abdel-Haq et al., 2019; Erny et al., 2015). Estudios muestran la falta de madurez o alteraciones en las funciones normales de las células microgliales de sujetos libres de microbiota, con microbiota alterada y libres de patógenos específicos y cómo las funciones de la microglía pueden mejorarse si los intestinos de estos sujetos son recolonizados (Erny et al., 2015)

Con lo anterior se ha ido estableciendo con solidez que, además de proteger la integridad intestinal, de incrementar la cantidad de nutrientes disponibles para el organismo en el que se hospedan y proteger contra patógenos potenciales, la microbiota, y más apropiadamente: una microbiota diversa, es fundamental para el desarrollo, la maduración y la función de la microglía y de SNC y la salud general. Por el contrario, la disbiosis puede revertir todos los efectos benéficos. Se han utilizado diversas formas para reestablecer eficientemente la microbiota como el trasplante fecal, la inoculación directa y el consumo de probióticos. Todos han mostrado ser capaces de rediversificar la microbiota y de revertir los efectos negativos de su ausencia, no obstante, las dos primeras son invasivas y la segunda puede realizarse mediante administración oral de suspensiones o comprimidos (**FIGURA 10**).

2. INTRODUCCIÓN



La Enfermedad de Parkinson

La Enfermedad de Parkinson (EP) es una patología neurodegenerativa, caracterizada por la muerte sucesiva de neuronas dopaminérgicas (DAérgicas) de la *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc); es una enfermedad que evoluciona progresiva y lentamente y es, principalmente, de carácter idiopático, aunque existe una base genética y epigenética para el inicio y, posiblemente, para su progreso. La EP está ligada al envejecimiento, es decir: raramente aparece antes de los 50 años y la incidencia incrementa de 5 a 10 veces a partir de la sexta y novena década de vida. Las estimaciones de casos a nivel mundial oscilan entre 5 y >35 casos nuevos por cada 100,000 personas al año (Poewe et al., 2017; Salama et al., 2015) y reportes epidemiológicos en México afirman que la prevalencia de la EP está en 37 casos por cada 100, 000 habitantes por año (Rodríguez-Violante et al., 2019).

Típicamente, el criterio central para el diagnóstico de la EP ha sido el síndrome motor, no obstante, actualmente, ya no se limita a este, debido a que, la mayoría de los pacientes presentan sintomatología no motora, incluso antes de que la EP sea diagnosticada. Además, aunque los criterios clínicos, neuropatológicos y genéticos del síndrome motor clínico acompañado de la neurodegeneración de las neuronas de la SNpc, el depósito de sinucleína o las mutaciones continuarán siendo un estándar para el diagnóstico de la EP los paradigmas en cuanto a la evolución de la enfermedad han ido cambiando (Berg et al., 2014; Heinzl et al., 2019).

La EP transcurre por tres etapas: una preclínica, en la que el proceso neurodegenerativo ha iniciado, pero no hay sintomatología asociada y pasa inadvertida; una fase prodrómica en la que los síntomas son insuficientes para dar un diagnóstico certero, pero que, a través de una honda investigación de criterios basada en factores de riesgo y marcadores estadísticos puede aumentar la precisión diagnóstica de la enfermedad y la etapa clínica que es el diagnóstico realizado por la opinión médica experta según criterios diseñados para tales fines (Berg et al., 2015; Goetz et al., 2008; Mahlkecht et al., 2015).

La EP prodrómica es una definición de reciente creación que está basada, principalmente, en marcadores no motores (signos, síntomas o biomarcadores) con los cuales, debido a que no son universales para todos los pacientes ni se desarrollan de la misma manera entre uno u otro paciente, se estima estadísticamente si un individuo puede pertenecer a este grupo y si eventualmente evolucionará a la EP clínica clásica (Postuma et al., 2015).

Estos criterios toman en cuenta la edad, el género, la historia clínica, la progresión de los síntomas y factores de riesgo como se describe más adelante. Según esto, los hombres tienen el doble de probabilidad que las mujeres de padecer la EP. Los trastornos de la regulación del ciclo sueño-vigilia, el deterioro cognitivo: incluida la disfunción frontal ejecutiva, déficits de recuperación de la memoria, demencia y alucinosis, los trastornos del estado de ánimo y afectivos; la disfunción autonómica: hipotensión ortostática, disfunción urogenital, estreñimiento e hiperhidrosis y los síntomas sensitivos como la hiposmia o el dolor. La exposición regular a pesticidas y solventes, los bajos niveles de uratos en plasma, la hiperecogenicidad en la sustancia negra (SN, *Substantia nigra*) y tener familiares con la EP son factores de riesgo. Además, no usar cafeína, padecer diabetes mellitus tipo II, no tener actividad física o cualquier combinación de estos factores predispone a las personas a padecer la EP (Nair et al., 2018; Noyce et al., 2012; Postuma et al., 2015). Finalmente, los criterios predictivos validados son los trastornos de la conducta del sueño en la etapa de movimientos oculares rápidos y la portación de la mutación al gen LRRK2 (Berg et al., 2015; Heinzl et al., 2019; Mahlkecht et al., 2015).

Para definir si el parkinsonismo, es decir: la presencia de bradicinesia en combinación con rigidez, temblor en reposo o ambos, es atribuible a la EP es necesario un examen clínico arduo en el que se deben descartar enfermedades que también causan desordenes del movimiento (como aquellas que afectan al cerebelo o la médula espinal); además, si el inicio de la enfermedad es unilateral o bilateral, ya que, el inicio de los síntomas motores en la EP suele ser unilateral y puede persistir así a lo largo de varios años. Además, los trastornos de la marcha son uno de los problemas motores más comunes en la EP que se manifiestan a través de la postura encorvada, caminar arrastrando los pies, disminuyendo la longitud de la zancada y la velocidad general. La alteración progresiva de la marcha combinada con la inestabilidad de la postura puede llevar a caídas, inseguridad para caminar y privar a los pacientes de las actividades de la vida diaria, lo cual, culmina con una importante disminución de la calidad de vida del paciente (FIGURA 11) (Berg et al., 2014; Boix et al., 2018; Chuang et al., 2010; Morris et al., 1994, 1996).

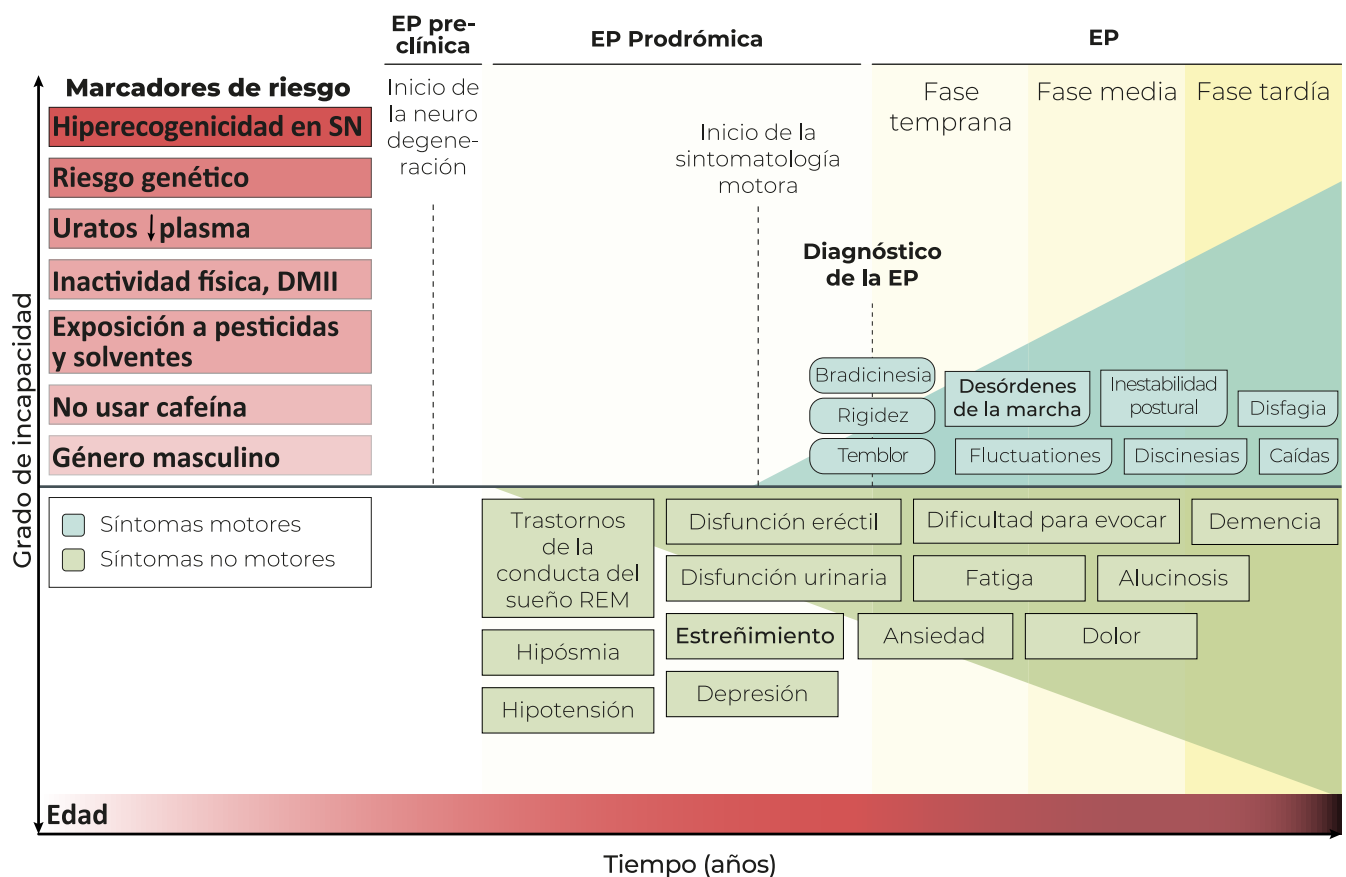


FIGURA 11. SÍNTOMAS CLÍNICOS ASOCIADOS CON LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

Los marcadores de riesgo para la enfermedad de Parkinson son realizados a través de una encuesta y estudios clínicos (la intensidad del color rojo es proporcional al porcentaje de riesgo de padecer la enfermedad). El diagnóstico de la Enfermedad de Parkinson (EP) ocurre con el inicio de los síntomas motores (EP en etapa temprana) generalmente a finales de los 50 años, pero puede estar precedida por una fase prodrómica que puede durar décadas antes de que el paciente muestre síntomas motores y se caracteriza por síntomas no motores específicos. Los síntomas no motores se vuelven cada vez más frecuentes y evidentes a lo largo del curso de la enfermedad, pero pueden estar presentes en un grado variable a lo largo de todas las etapas de la EP. La discapacidad progresiva de la EP es impulsada por la combinación de estos problemas no motores con una gravedad creciente de las características motoras cardinales (bradicinesia, rigidez y temblor). Modificado de Poewe et al., 2017. DMII: diabetes mellitus tipo II; EP: enfermedad de Parkinson; SN: sustancia nigra.

La EP es esporádica y está asociada a los cambios fisiológicos propios de la edad que, en conjunto, contribuyen a la degeneración de la función y anatomía cerebral y de otros órganos. En tales casos se sabe que la disminución progresiva de la función inmunitaria y un estado proinflamatorio generalizado inducen, en el SNC, daño oxidativo e incremento en la polarización de fenotipos microgliales hacia un estado proinflamatorio y la permeabilidad en la BHE y del epitelio intestinal. Tales cambios causan el contacto de sustancias nocivas con los sistemas sanguíneo, digestivo y nervioso entérico mediante los cuales se afecta al SNC a través de mecanismos moleculares y celulares que involucran el estrés oxidativo y nitrosativo; la disfunción mitocondrial y proteasomal; la agregación proteica y la neuroinflamación (Forsyth et al., 2011; Harsanyiova et al., 2020; Jankovic & Tan, 2020; McGeer et al., 1988; Poewe et al., 2017). La mayoría de los pacientes con EP son personas de edad avanzada en las que, mientras envejecen, la microglía muestra cambios senescentes en sus fenotipos, como un aumento de las reacciones proinflamatorias y una disminución de las actividades fagocítica y quimiotáctica. Los déficits de la microglía senescente en la actividad fagocítica podrían estar relacionados con el aumento de la incidencia de EP en sujetos de edad avanzada. Presumiblemente, esto se debe a que las células senescentes ya no pueden compensar para la reducción de DA en el cuerpo estriado al eliminar las sinapsis glutamatérgicas del STN hiperractivo (Aono et al., 2017; McGeer et al., 1988).

La marcha, su evaluación clínica y la EP

La marcha, en animales terrestres, se describe como el movimiento sobre una superficie plana mientras se mantiene el equilibrio. En humanos, la marcha implica una secuencia de movimientos rítmicos, coordinados y alternantes mientras se avanza y se mantiene una postura vertical (erguida) que se logra mediante la integración de estímulos sensoriales exteriores, propioceptivos espaciotemporales y cognitivos, así como, la ejecución del sistema musculoesquelético. La marcha normal es estable y flexible, ya que, permite cambios de velocidad y ajustes según el contexto exterior, como una superficie plana o un terreno lleno de obstáculos, manteniendo la eficiencia energética (Mirelman et al., 2018; Takakusaki, 2017).

Los movimientos voluntarios provienen de ordenes motoras desde la corteza, pasan por el tronco del encéfalo y llegan hasta la médula espinal. Además, la conducta motora *emocional* inicia desde las regiones límbicas-hipotalámicas, a través del tronco del encéfalo. En ambos casos, se requiere de mecanismos autónomos de control postural en el tronco y la médula espinal, aunque para adquirir habilidades motoras o adaptarse a situaciones desconocidas también se requiere de una regulación cognitiva que implica atención, memoria y aprendizaje (Mirelman et al., 2018; Takakusaki, 2017).

La marcha está controlada por una compleja red neuronal que involucra órdenes desde la corteza cerebral: motora, premotora, premotora suplementaria, sensorial primaria, temporoparietal, etc., y el tronco del encéfalo: el núcleo rojo, el colículo superior la formación reticular pontina y bulbar y los núcleos vestibulares (en conjunto, las neuronas corticales y troncoencefálicas son llamadas motoneuronas superiores, MNS); los ganglios basales, el cerebelo y la médula espinal que culmina con la sinapsis muscular. Las señales visuales, vestibulares y somatosensitivas que son procesadas en las regiones de la corteza respectivas (visual, vestibular y sensorial primaria, S1) son integradas en la corteza temporoparietal, incluida la corteza vestibular y corteza posteroparietal para construir el modelo interno corporal, así como la verticalidad, orientación, la percepción del cuerpo, de los objetos y del ambiente en el espacio. Luego, la información corporal se transmite al área motora suplementaria

(SMA) y al área premotora (PM), en donde la información se puede utilizar como material para identificar y generar programas motores adecuados. De manera similar, la información se transfiere al hipocampo en donde se produce la información espacial y de memoria a corto plazo útil para navegar entre obstáculos (Aono et al., 2017; Mirelman et al., 2018; Takakusaki, 2017).

Las áreas corticales motoras cooperan estrechamente con los ganglios basales y el cerebelo para que se construyan los programas motores más adecuados participando en distintos procesos como en el aprendizaje de la conducta motora que permite la automatización del movimiento, los movimientos finos, la planeación y la coordinación, así como, en el control postural, y la percepción del movimiento del cuerpo en el espacio. Así, la información corporal generada en la corteza vestibular puede utilizarse para mantener la postura vertical a través del tracto corticovestibular y vestibuloespinal. Las señales de la corteza prefrontal, incluidos los planes y las intenciones, pueden desencadenar la ejecución de programas motores en las cortezas motora suplementaria y premotora, que pueden incluir movimientos con un propósito y control postural asociado. El programa de control postural puede utilizarse para generar un ajuste postural anticipatorio a través del tracto cortico-reticular y reticuloespinal. Luego, los programas motores se envían a la corteza motora primaria (CxM1) para que se puedan lograr movimientos hábiles dirigido a un objetivo (Aono et al., 2017; Mirelman et al., 2018; Takakusaki, 2017).

Aunque en humanos no hay información concluyente, en la médula espinal de cuadrúpedos (generalmente gatos) existen centros generadores de patrones, que son redes neuronales capaces de producir movimientos rítmicos y coordinados independientemente de los estímulos sensoriales y de las indicaciones corticales y troncoencefálicas (Mirelman et al., 2018; Takakusaki, 2017).

Por otro lado, las señales excitatorias e inhibitorias convergen en las neuronas motoras que extienden los axones fuera del tronco encefálico y de la médula espinal para inervar los músculos esqueléticos del tronco. Estas neuronas, conocidas como motoneuronas inferiores (NMI), poseen el soma en el tronco encefálico y la médula espinal. Desde el tronco encefálico, los axones de las NMI inervan los músculos esqueléticos de la cara y la cabeza. Desde la médula espinal, inervan los músculos esqueléticos de los miembros y el tronco. Solo las MNI envían eferencias del SNC a las fibras de músculo esquelético. Por esta razón, también se las conoce como vía final común (Purves et al., 2018; Tortora & Derrickson, 2017).

Cada grupo de motoneuronas inerva las fibras musculares al interior de un único músculo. De estos grupos de neuronas se identifican dos tipos de MNI, las γ (o intrafusales) y las α (o extrafusales). Las primeras inervan fibras musculares especializadas que, en conjunto con las fibras musculares que inervan, constituyen los receptores sensitivos llamados husos musculares, mientras que las segundas inervan las fibras musculares estriadas responsables de generar la fuerza para el mantenimiento de la marcha y la locomoción. Los husos musculares son los propioceptores de los músculos esqueléticos y participan en los reflejos de estiramiento. Mediante el ajuste de la intensidad de la respuesta de un huso muscular al estiramiento de un músculo esquelético, el encéfalo establece un nivel general de tono muscular, el pequeño grado de contracción presente cuando el músculo está en reposo. La mayoría de las fibras musculares extrafusales están inervadas por una única motoneurona α que se ramifica al interior del músculo incrementando el número de sinapsis con las múltiples fibras musculares. Esta asociación sináptica, es la unidad mínima de movimiento, es decir, la fuerza más pequeña que puede activarse para producir el movimiento y se denomina *unidad motora* (Purves et al., 2018; Tortora & Derrickson, 2017).

La evaluación de diversos parámetros de la marcha puede ayudar a estimar el estado general de salud o alteraciones en la conducta natural de la marcha y, con ello, sugerir una patología subyacente. Además, la evaluación de la marcha patológica puede ser auxiliar para diferenciar entre diferentes patologías específicas, evaluar la progresión de alguna enfermedad o los defectos terapéuticos a largo plazo (Mirelman et al., 2018).

En la práctica, típicamente la marcha se ha definido de acuerdo con los patrones de pisadas o las propiedades biomecánicas entre las que se incluyen tres perspectivas básicas: (i) dividir un ciclo de paso en fases de soporte o apoyo y balanceo. En la primera, es cuando una extremidad está en contacto con la superficie y, en la segunda, cuando se levanta y se mueve hacia delante, o sea, cuando no está en contacto con la superficie. En adultos jóvenes sanos, el 60% del ciclo pertenece a la fase de soporte y el 40% a la de balanceo. (ii) el enfoque está relacionado con las propiedades espacio temporales de la marcha como el tiempo en que se recorre cierta distancia y la longitud de un paso o una zancada. (iii) identifica la funcionalidad de los eventos dentro del ciclo de la marcha, como el contacto inicial con el suelo (prebalanceo) o la etapa de despegue.

Por otra parte, se ha descrito que diversas variables de la marcha en ratas y ratones tienen relación estadística con la velocidad, esto es: la cadencia, el tiempo de soporte, el tiempo de balanceo, el ciclo de paso, la longitud de zancada, la velocidad de balance y la posición de impresión dependen de la velocidad (Aceves et al., 2020; Batka et al., 2014; Clarke & Parker, 1986). En ese sentido, la normalización de datos en el análisis de la marcha es común en la clínica que lleva realizándose cerca de 50 años, aunque ha estado más relacionada con las dimensiones corporales de los pacientes; por ejemplo: si un paciente es alto respecto a otro, la zancada (por mencionar algún parámetro) será más larga y, debido a esto, deben realizarse ajustes matemáticos para lograr que la altura de los individuos no sea una variable que afecte el estudio y los datos obtenidos de diversos pacientes puedan compararse (Baker, 2013). Además, la práctica más aceptada es la división por números que, luego del análisis de unidades de medida, logren volver adimensional al parámetro de interés (Baker, 2013; Hof, 1996). Sin embargo, en muchos casos, los valores no son obvios de interpretación y, en general, aún no existe un consenso sobre cómo abordar el tema de la normalización o de la interpretación de los resultados.

Los trastornos de la marcha y el control postural son uno de los problemas motores más comunes en la EP que se manifiesta mediante una postura encorvada, caminar arrastrando los pies y disminuyendo la longitud de la zancada y la velocidad general. (Berg et al., 2014; Boix et al., 2018; Chuang et al., 2010; Morris et al., 1994, 1996; Postuma et al., 2015). Estas alteraciones se atribuyen al fallo de los sistemas dopaminérgico y colinérgico, al deterioro de las funciones cognitivas, a la falta de generación de programas motores y a las afectaciones en las áreas del tronco encefálico que controlan la marcha y la postura. El daño en las neuronas DAérgicas que proyecta hacia los ganglios basales aumenta la salida inhibitoria GABAérgica lo que puede inhibir fuertemente la salida talamocortical. Además, las afectaciones colinérgicas del tronco del encéfalo y prosencéfalo basal que proyectan hacia los ganglios basales y la SNpc y hacia la corteza cerebral, respectivamente, generan alteraciones en la atención, en la formación de modelos propioceptivos y graviceptivos, de programación motora y el procesamiento cognitivo (Mirelman et al., 2018).

La disbiosis en la EP

La evidencia acumulada indica que los problemas gastrointestinales pueden fungir como marcadores tempranos del desarrollo de la EP. La alteración en el vaciamiento gástrico, la disminución de la recurrencia a evacuar y la disbiosis intestinal correlacionan positivamente con la posibilidad de desarrollar la EP y que, aún durante la enfermedad los síntomas que los pacientes presentan empeoran (Abbott et al., 2001; Gazerani, 2019; Goetze et al., 2005; Minato et al., 2017; Tan et al., 2014). Se sabe, por ejemplo, que la prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* es alta en los pacientes con EP (1:3 respecto a pacientes sanos) y causa alteraciones motoras debido a que dificulta la absorción de fármacos antiparkinsonianos (Çamcı & Oğuz, 2016). Así mismo, la disbiosis en el intestino delgado prevalece sobre un cuarto de los pacientes con la EP y, controlarla, mejora el tránsito intestinal (Tan et al., 2014). Además, está reportado que el recuento de bacterias del grupo de *Clostridium coccoides* es alto en los pacientes con EP temprana, mientras que el recuento del subgrupo de *Lactobacillus gasseri* es alto en los pacientes con EP avanzada. Asimismo, que las bacterias *Enterobacteriaceae* son más abundantes en pacientes que muestran un fenotipo de inestabilidad postural y dificultad para caminar que aquellos en los que predomina el temblor y se piensa, por otro lado, que un recuento bajo de *Bifidobacterium* está asociado con el empeoramiento de los síntomas de la EP y, a su vez, que la administración de este puede proteger contra la progresión de la enfermedad. Actualmente existen propuestas preclínicas y clínicas que coinciden en que la administración de probióticos como *Lactobacillus*, *Enterococci*, *Bifidobacteria* y levaduras, conducen a una mejora significativa de los síntomas gastrointestinales y motores y marcadores bioquímicos (Ceppa et al., 2020; Gazerani, 2019; Hsieh et al., 2020; Klann et al., 2021; Minato et al., 2017; Scheperjans et al., 2015).

Los probióticos en modelos experimentales de EP

Modelos experimentales para la EP

En el contexto de la EP, los modelos más ampliamente utilizados son aquellos que replican las características oxidantes de los procesos neuropatológicos tales como los modelos animales en los que se administra 6-hidroxidopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) o rotenona que inhiben alguno de los complejos mitocondriales, lo cual, inicia con la disfunción de la mitocondria y que, consecuentemente, lleva a una alta producción de ROS y NRS y, la oxidación de las membranas lipídicas y de proteínas, el agotamiento del sistema antioxidante, la activación glial y la muerte celular (Blum et al., 2001; Tieu, 2011).

Por otra parte, el modelo habitual para abordar el estudio de la EP desde una perspectiva inflamatoria es mediante la administración de LPS (Choi et al., 2009; Choi et al., 2010; Hunter et al., 2017; Hunter et al., 2009; Hunter, Choi, et al., 2007; Hunter et al., 2008; Hunter, Dragicevic, et al., 2007; Stern et al., 2000), el cual, ha dejado importantes bases en la caracterización de la neurodegeneración DAérgica de la vía nigrostriatal de manera más reciente que los modelos clásicos. El modelo inducido con LPS ha demostrado que la inflamación generada puede replicar las características de la EP, incluyendo la extensa activación de la microglía y la disminución selectiva y progresiva de las neuronas DAérgicas de la SNpc, la agregación proteica, la disfunción mitocondrial, entre otras. En este orden de ideas, el modelo parkinsoniano inducido con LPS, además, cuenta con algunas características, como son: (1) se basa, de modo exclusivo en la inflamación, por estimulación de los receptores TLR-4; (2) los factores liberados por la microglía, son suficientes para iniciar y propagar el proceso neurodegenerativo; (3) mimetiza de forma retardada, progresiva y particular la degeneración de las neuronas de la SNpc y (4) es una herramienta importante para delinear la contribución del proceso inflamatorio en la degeneración DAérgica (Dutta et al., 2008; Liu & Bing, 2011) (**FIGURA 12**).

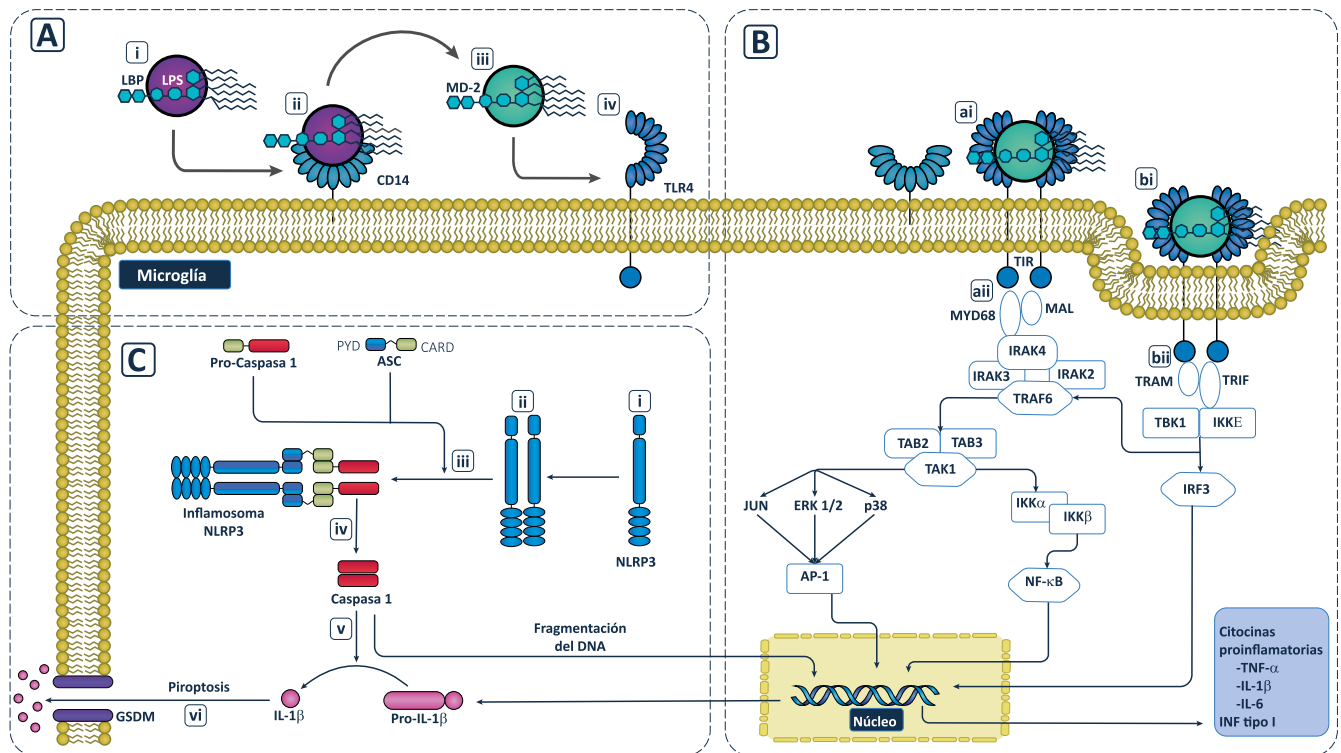


FIGURA 12. MECANISMO DE TOXICIDAD DEL LIPOPOLISACÁRIDO.

(A) El LPS es liberado al medio celular (i) y se liga a la LBP, que, a su vez, (ii) se une con el receptor CD14. Este, (iii) facilita su unión a MD-2 y así (iv) el LPS entra en contacto con el TLR-4. (B) La unión del MD-2 y el TLR4 produce la adhesión de un TLR más, (ai) pudiendo formar un heterodímero, o bien un homodímero, formando, de este modo, el complejo TLR4/MD2/LPS, que tiene forma de M. La cascada de señalización está determinada por (bi) la endocitación del LPS o (ai) su permanencia en la superficie celular. La primera (bii) resulta en la producción de INF de tipo I y (aii) la segunda, a través NF- κ B, (C) en la traducción de pro-IL-1 β y NLRP3. Diversos estímulos (i) activan al NLRP3, este, se (ii) homooligomeriza, (iii) recluta a la pro-caspasa 1 y se une a esta a través del adaptador ASC. En este punto, está formado el complejo inflamosoma, el cual, (iv) escinde a la pro-caspasa 1 que tiene actividad proteolítica. (v) La caspasa 1 proteolisa a la pro-IL-1 β y (vi) es liberada por los poros celulares creados por las proteínas GSDM. (Akira et al., 2006; Latz et al., 2013; Walsh et al., 2014; Broz & Dixit, 2016). LPS: lipopolisacárido; LBP: proteína de unión a LPS; TLR: receptor tipo toll; NF- κ B: factor nuclear kappa B; IL: interleucina; INF: interferón.

En el laboratorio de Neuroquímica-BUAP, caracterizamos temporalmente los efectos de la administración estriatal del LPS sobre la conducta motora, en el modelo del cilindro; sobre la neurodegeneración de las células TH+ en la SNpc; así como los efectos del LPS sobre la conducta fenotípica de la microglía determinada mediante la evaluación de las células Iba-1+ (molécula adaptadora de unión a calcio ionizado-1, del inglés: *ionized calcium-binding adapter molecule 1*) y a través de la evaluación de los cambios morfológicos de la microglía cuantificados en el núcleo estriado dorsolateral y en la SNpc. En aquel estudio encontramos que el LPS indujo una asimetría motora severa. Esto es: hubo un deterioro significativo en el uso de ambas extremidades anteriores durante la prueba del cilindro a los 14 días después de la inyección (dpi) del inflamógeno y, a su vez, incrementaron el uso de la extremidad ipsilateral respecto al vehículo. Este deterioro motor se asoció con la pérdida de neuronas TH+ en SNpc iniciada 1 día posterior a la administración (dpa) del LPS. Finalmente, el modelo parkinsoniano que diseñamos y caracterizamos mostró un incremento constante de células Iba-1+ y modificaciones fenotípicas predominantemente relacionadas con el proceso proinflamatorio. Uno de los hallazgos más relevantes del estudio fue que, entre los tres puntos temporales evaluados (1, 7 y 14 dpi de LPS) el momento en el que existe un proceso inflamatorio más elevado es durante en 7dpi del inflamógeno que fue detectado mediante un elevado número de células microgliales en un estado ameboides y activado (Parra et al., 2020).

Evidencia preclínica de los probióticos en el contexto de la EP

La evidencia experimental y bibliográfica da cuenta de la íntima relación entre el cerebro y el intestino, a través de la microbiota, así como de que la disbiosis es un factor importante para alterar el estado de salud. Así mismo, el estudio en animales ha dejado importantes bases en el modelamiento de la patogénesis y fisiopatología de la EP, tales como la relación del estrés oxidativo y la inflamación con la neurodegeneración DAérgica de la vía nigrostriatal, así como que el estrés y la toxicidad oxidante sistémica puede generar hiperpermeabilidad intestinal y causar los efectos de un modelo parkinsoniano. Además, se ha evidenciado cómo el tratamiento con probióticos puede atenuar, los efectos negativos de los tóxicos administrados sobre los sujetos experimentales (Klann et al., 2021).

Hasta la fecha existen 11 estudios preclínicos que muestran resultados alentadores sobre el tratamiento con probióticos, sin embargo, el inconveniente que se presenta es que cada estudio es diferente en cuanto al régimen de tratamiento y ninguno utiliza las mismas bacterias para explorar profundamente los efectos de una cepa en específico, sin embargo, como se verá, existen convergencias en algunos resultados. En primer lugar, existen 7 estudios realizados en ratón macho, 6 de la cepa C56BL/6 y un transgénico MitoPark PD, y 3 en rata macho, dos de la cepa Sprague-Dawley y uno de la cepa Wistar. Dentro de los cuales, el modelo parkinsoniano más utilizado es el del MPTP, que es usado en cinco estudios, seguido por la 6-OHDA, que fue usada en cuatro y, finalmente el modelo transgénico, la rotenona y el LPS + paraquat que fueron usados en 1 estudio diferente cada uno. Por otro lado, en suma, se administraron 20 especies de probióticos de los cuales, el 60% de estos son del género *Lactobacillus*, el 30% del género *Bifidobacterium*, y el 10% restante está dividido en los géneros *Streptococcus* y *Clostridium*. Además, es destacable que, aunque se usan subespecies de estos probióticos, las bacterias más utilizadas son las *L. plantarum*, usado en 5 estudios; *L. rhamnosus*, administrado en 4 estudios y *L. acidophilus*, utilizado en 4 estudios, así como *B. brave* y *S. thermophilus*, usados en 3 estudios y, en general, estos se administraron entre 10^6 – 10^{11} UFC de microorganismos (Klann et al., 2021). Existe un estudio en el que, a ratones C56BL/6 se les administraron lactobacilos genéticamente modificadas que producen constitutivamente GLP-1 que, como se describió en un apartado anterior, atraviesa la BHE y tiene efectos a nivel central sobre el estrés oxidativo y la inflamación, aunque no fue considerado en la suma de los estudios anteriores (Fang et al., 2019).

Los resultados de estos estudios sugieren que la administración de probióticos previene la degeneración DAérgica evitando que las células TH⁺ de la SNpc mueran y que la dopamina disminuya de la región sináptica (aunque, en un par de estudios el probiótico no fue capaz de evitar la muerte de las células dopaminérgicas (Dwyer et al., 2021; Xie & Prasad, 2020)). Esta protección se ve evidenciada a nivel conductual al reducir la asimetría motora en los modelos hemiparkinsonianos y al mejorar la conducta motora como la marcha o la coordinación, incluso, mejorando los movimientos finos como la capacidad para remover cinta adhesiva de la nariz (Castelli et al., 2020; Dwyer et al., 2021; Hsieh et al., 2020; Nurrahma et al., 2021; Perez Visñuk et al., 2020; Srivastav et al., 2019; Sun et al., 2021). Los beneficios también se muestran a nivel no motor como se muestra en (Alipour Nosrani et al., 2021; Ishii et al., 2021; Sun et al., 2021; Xie & Prasad, 2020) en dónde se pone a prueba a los probióticos frente a procesos de aprendizaje, memoria, ansiedad y depresión.

Por otro lado, los experimentos bioquímicos aportan datos sobre los cuales podría desarrollarse un hipotético mecanismo acerca de aquello que subyace a la neuroprotección causada por los probióticos. Se sabe que los probióticos son capaces de incrementar la diversidad microbiana en animales con una microbiota alterada

(Dwyer et al., 2021; Sun et al., 2021) restaurando bacterias relevantes como las del género *Proventilla*, *Clostridium*, *Bacteroidetes*, *Akkermancia* y, aunque no es nativa de la microbiota intestinal, *Lactobacillus*. Así como restaurar la producción de AGCC, en especial, los ácidos propanoico, isobutírico y butírico (los efectos de los AGCC se abordaron ampliamente en un apartado anterior). Además, los efectos de los probióticos abordan los problemas causados por los tóxicos desde dos flancos cruciales para las enfermedades neurodegenerativas, a saber: el estrés oxidante y la respuesta proinflamatoria exacerbada y promoviendo, a su vez, el sistema antioxidante y la respuesta antiinflamatoria y proresolutiva, así como, mediante la activación de vías de supervivencia celular.

La respuesta antioxidante puede ser promovida a través de las vías Nrf-2/APE y PPAR- γ , que pueden aumentar la expresión de proteínas antioxidantes, como la hemoxygenasa-1 (HO-1), la catálisis de glutamato-cisteína ligasa recombinante (GCLC), la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GSH-Px). Así como, mediante restauración de la función mitocondrial que, en conjunto con lo descrito en este párrafo, se disminuye la producción de ROS, de lipoperoxidación, de agregados de α -sinucleína y, por extensión, la activación glial (Alipour Nosrani et al., 2021; Castelli et al., 2020; Sun et al., 2021; Wang et al., 2022). Por otro lado, la respuesta antiinflamatoria que, si bien, por una parte, es frenada por la ausencia de estímulos oxidantes a nivel de SNC, por otra, es abordada a través de la disminución de TNF α , IL-6 y lipocalina en sangre (Dwyer et al., 2021; Perez Visñuk et al., 2020), así como, mediante la disminución de las vías que activan la respuesta proinflamatoria, la producción de estas citocinas a nivel de SNC y de la ausencia de la activación del inflamósoma NLRP3 (Castelli et al., 2020; Wang et al., 2022). Finalmente, las vías de supervivencia celular son activadas por el BDNF, el GDNF (Castelli et al., 2020; Ishii et al., 2021; Srivastav et al., 2019; Wang et al., 2022) (**TABLA 2**).

Para finalizar, es interesante que en un modelo parkinsoniano tratado con trasplante de microbiota fecal de ratas sanas, se obtengan resultados comparables con los que se obtienen con la administración de los probióticos (Sun et al., 2018). La importancia de esta comparación radica en que, si llegaran a tener los mismos efectos benéficos, el trasplante fecal, que es un procedimiento invasivo, podría ser completamente sustituido por la terapia probiótica vía oral y que, además, puede consumirse preventivamente. Así, entre estos estudios las diferencias metodológicas son abundantes, no obstante, en algunos casos, en que se evalúa lo mismo, se obtienen resultados semejantes, lo cual, da cierta solidez a los beneficios que este conjunto de bacterias puede otorgar a los organismos. También es interesante que en un estudio de lesión medular el ácido oléico causa mejoras motoras en los animales ya que aquello en lo que se administran los probióticos (agua, aceite o solventes) debe ser tomado en cuenta para preparar un experimento más íntegro (Galán-Arriero et al., 2017).

TABLA 2. EVIDENCIA PRECLÍNICA DE LOS PROBIÓTICOS EN EL CONTEXTO DE LA EP

Autores	Probióticos	Modelo de estudio	Conducta motora	Conducta no motora	Sistema DAérgico
Wang et al., 2022	<i>L. plantarum</i> DP 189	Ratón C57BL/6, MPTP	-	-	↓ α-Syn en la SN ^p
Dwyer et al, 2021	<i>S. thermophilus</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. helveticus</i> .	Ratón C57BL/6, LPS intraSNpc + paraquat i.p.	No modifica la coordinación ^g ni la exploración ^m .	-	No evita la ↓ de células y axones TH(+) ^o
Perez-Visiñuk et al., 2020	<i>L. plantarum</i> , <i>S. thermophilus</i> CRLL 808 y 807	Ratón C57BL/6, MPTP/probenecida	No se alteran los movimientos finos ^d ni el equilibrio ^c	-	Evita la ↓ de células TH(+) ^o
Castelli et al., 2020	Agimixx, Vital Slab51: <i>S. thermophilus</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i>	Ratón C57BL/6, 6OHDA intraestriatal	Evita la asimetría motora ^b	-	Evita la ↓ de células y axones TH(+) ^o e IF-DAT
Srivastav et al., 2019	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>B. animalis</i>	Ratón C57BL/6, MPTP o Rotenona	No se altera el equilibrio ^c	-	Evita la ↓ de células y axones TH(+) ^o , la ↓ DA ^f ↑ de MAO-B ^g
Hsieh et al., 2020	<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. rhamnosis</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	Ratón MitoPark	Evita deterioro en la marcha ^a	-	Evita la ↓ de células y axones TH(+) ^o
Sun et al., 2021	<i>C. butyricum</i>	Ratón C57BL/6, MPTP	↓ el tiempo de descenso ^e , el tiempo de cruce ^f , el número de errores ^f , el número de cruce de campo ⁱ . No restaura el número de erguidos ^l	↓ el tiempo de inmovilidad ^k , el número de cruce de campo ⁱ .	Restaura las células TH(+) ^o en la SNpc ^o y sinapsina I ^{o,q}
Ishii et al., 2021	<i>B. brave</i> cepa A1 [MCC1274]	Ratón C57BL/6, MPTP	-	Facilitó la extinción ^l	-
Alipour et al., 2021	<i>B. bifidum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. fermentum</i>	Rata Wistar, 6OHDA intraSNpc	↓ el número de giros ^a	Mejora la memoria espacial ^l	Evita la ↓ de células Nissl(+) ^o en la SN ^o
Xie et al., 2020	<i>L. rhamnosus</i> HA-114	RataSprague-Dawley, 6OHDA en intraestriatal bilateral	-	Restauró la memoria de reconocimiento ⁿ , pero no tiene efecto ansiolítico ^m	No evita la ↓ de células y axones TH(+) ^o
Nurrahma et al., 2021	<i>L. salivarius</i> subsp. <i>Salicinus</i> AP-322	RataSprague-Dawley, 6OHDA en MFB unilateral	↓ el número de giros ^a , restaura parámetros de la marcha y simetría motora ^d ; evita el deterioro muscular ^l	-	Restaura los axones y células TH(+) ^o en el estriado y la SNpc ^o

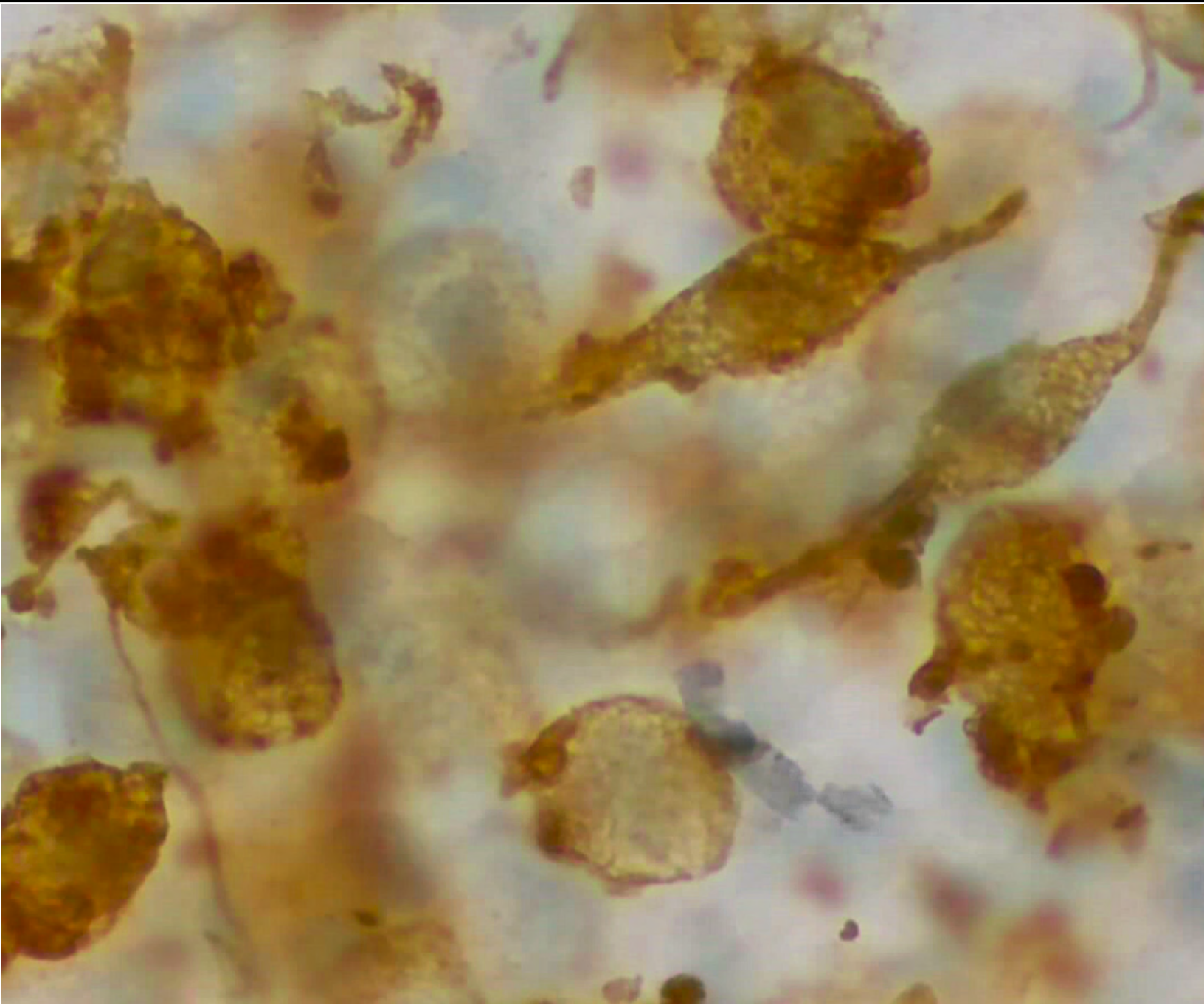
a: conducta de giro; b: modelo del cilindro; c: pasarela; d: CatWalk; e: prueba de la barra; f: viga; g: rotarode; h: retirada de cita adhesiva; i: campo abierto; j: evitación inhibitoria; k: nado forzado; l: laberinto acuático de Morris; m: lavado de cruz elevado; n: reconocimiento de lugar novedoso; o: inmunohistoquímica; p: inmunofluorescencia; q: western blot; r: ELISA; s: HPLC; t: ensayo de Malondialdehído; u: secuenciación ribosomal 16s v. qRT PCR; w: consumo de oxígeno total; x: tasa de acidificación extracelular; y: absorbometría de rayos X de energía dual (DXA). C: *Clostridium*; B: *Bifidobacterium*; L: *Lactobacillus*; S: *Streptococcus*

TABLA 2. EVIDENCIA PRECLÍNICA DE LOS PROBIÓTICOS EN EL CONTEXTO DE LA EP. CONTINUACIÓN.

Autores	Sistema inmune	Sistema antioxidante	Vías neurotróficas	Microbiota ^u
Wang et al., 2022	↓ TNF α , IL-6 ^c , caspasa-1 ^f , NLRP3 ^f e IL-1 β ^f ; ↑ IL-10 ^f - ↓ NLRP3 ^g , caspasa-1 ^g , HO-1 ^g , PGC-1 ^g , UCP2 ^g , MnSOD ^g en la SN	↑ SOD ^f , GSH-Px ^f , ROS ^f , MDA ^f ; Nrf2 ^g , HO-1 ^g , PGC-1 ^g , UCP2 ^g , MnSOD ^g en la SN	Restaura los niveles de ERK1/2 ^g , ERK1/2p ^g en la SN	↑ <i>Provatella</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Bacteroidetes</i> y <i>Lactobacillus</i>
Dwyer et al., 2021	↓ astrogliosis y microgliosis ^o ; ↓ lipocalina ^f en plasma	-	-	↑ Familia <i>Streptococcacea</i>
Perez-Visiñuk et al., 2020	↑ IL-10 ^f en cerebro y suero; evita TNF ^f y MCP1 ^f en cerebro y suero	-	-	-
Castelli et al., 2020	Evita microgliosis ^o y astrogliosis ^o en la SN, no incrementa el INFkB ^g y se trasloca el factor PPAR ^g al núcleo	Evita la ↓ de Nrf2 ^g en SN y estriado	Evita la ↓ de BDNF ^g , pTrk ^g en la SN y estriado	-
Srivastav et al., 2019	Previene microgliosis y astrogliosis intensa en la SN	-	Evita la ↓ de BDNF ^g y GDNF ^g en la SN y estriado	-
Hsieh et al., 2020	-	-	-	-
Sun et al., 2021	↓ las células CD11b ^o , ↑ producción de GLP-1 ^p y GPR41/43 intestinal ^q . ↑ expresión de GLP-1R cerebral ^{o,q}	-	-	-
Ishii et al., 2021	-	-	-	-
Alipour et al., 2021	-	Evita un ↑ aberrante de LPO ^t	-	-
Xie et al., 2020	-	-	-	-
Nurrahma et al., 2021	Restaura los niveles de AGCC ^s en las heces	Restaura la actividad de las SOD, GSH-Px en sangre y la función mitocondrial ^t y la eficacia de la glucólisis ^v ;	-	-

a: conducta de giro; b: modelo del cilindro; c: pasarela; d: CatWalk; e: prueba de la barra; f: viga; g: rotarode; h: retirada de cita adhesiva; i: campo abierto; j: evitación inhibitoria; k: nado forzado; l: laberinto acuático de Morris; m: laberinto de cruz elevado; n: reconocimiento de lugar novedoso; o: inmunohistoquímica; p: inmunofluorescencia; q: western blot; r: ELISA; s: HPLC; t: ensayo de Malondialdehído; u: secuenciación ribosomal 16s v: qRT PCR; w: consumo de oxígeno total; x: tasa de acidificación extracelular; y: absorbometría de rayos X de energía dual (DXA). C: *Clostridium*; B: *Bifidobacterium*; L: *Lactobacillus*; S: *Streptococcus*

3. JUSTIFICACIÓN



El intestino humano alberga una multitud de microorganismos comúnmente denominados como microbiota. La composición de esta se establece durante las primeras horas posparto y se desarrolla, según los hábitos de vida. Además, está formada, principalmente, por bacterias en donde el hospedero provee de un ambiente propicio para el desarrollo de estos microorganismos y, los componentes de la microbiota, contribuyen la correcta función del hospedero (Rea et al., 2016).

La evidencia experimental y bibliográfica ha puesto de manifiesto la íntima relación entre el cerebro, el intestino y la microbiota, así como de que la disbiosis es un factor importante para alterar el estado de salud. Por ello, las hipótesis actuales han colocado a la microbiota como un componente esencial en el desarrollo de los sistemas nervioso e inmunológico, así como en el mantenimiento y la recuperación de las funciones naturales de los organismos (Harsanyiiova et al., 2020; Rea et al., 2016).

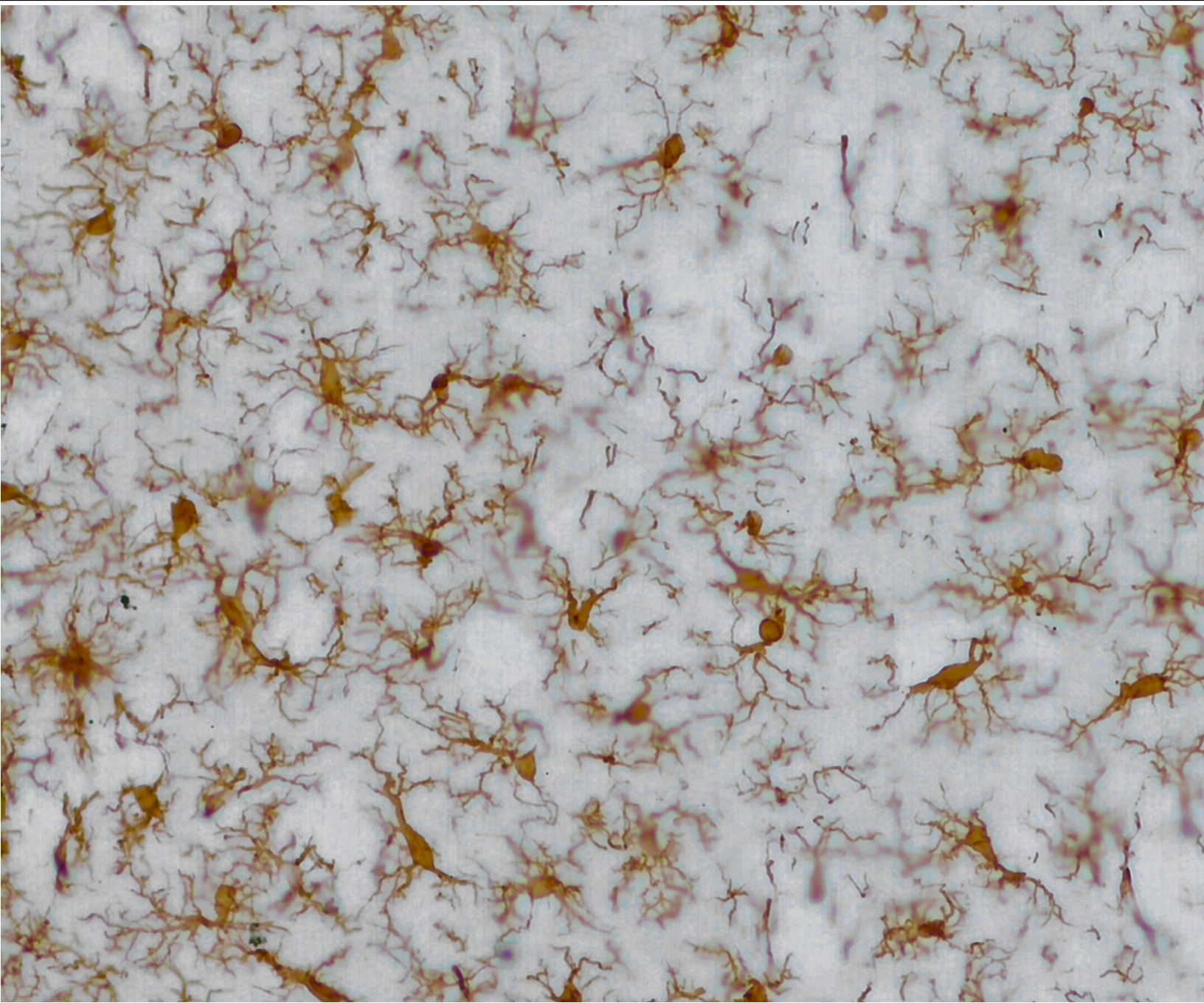
Además, evidencia reciente sugiere que el tracto gastrointestinal juega un papel relevante para el desarrollo de la EP, por lo cual, actualmente, el estreñimiento es uno de los marcadores más importantes en la detección de la EP prodrómica y problemas como la disbiosis gastrointestinal y la disminución en el vaciamiento gástrico aparecen como factores emergentes para la detección temprana de la EP (Jankovic & Tan, 2020). El hallazgo de que la patogenia primaria de la EP se produciría en tejidos periféricos algunos años antes de la aparición de los síntomas motores típicos sugiere que es extremadamente importante centrar la investigación de la EP en la detección temprana de la enfermedad, lo que podría brindar nuevas opciones de tratamiento a los pacientes en las primeras etapas de la EP y mejorar la calidad de vida de quienes la padecen. Por otro lado, cada vez toma más fuerza el argumento de que la enfermedad tiene una base epigenética sobresaliente, esto es: que el estilo de vida y factores ambientales son capaces de predisponer a los individuos a padecer la enfermedad (Harsanyiiova et al., 2020).

Finalmente, el estudio en animales ha dejado importantes bases en el modelamiento o caracterización de la patogénesis y fisiopatología de la EP, tales como la relación del estrés oxidativo y la inflamación con la neurodegeneración DAérgica de la vía nigrostriatal. No obstante, son pocos los estudios preclínicos que abordan modelos parkinsonianos en combinación con tratamientos probióticos tales que demuestren los beneficios de las estas bacterias para la salud animal, así como los mecanismos celulares que subyacen a estos. Además, la mayoría de los estudios están hechos en ratones administrados con MPTP y, de todos, un par de ellos utiliza a la 6-OHDA y uno, de ambos, utiliza ratas como sujeto de experimentación (Castelli et al., 2020; Hsieh et al., 2020; Perez Visñuk et al., 2020; Srivastav et al., 2019).

Por lo anterior, con el presente proyecto pretendemos conocer los efectos preventivos, que tendría la administración oral de dos microorganismos probióticos: *Bifidobacterium animalis* ssp lactis Bb12 y *Lactobacillus rhamnosus* GG, frente a un estímulo neurodegenerativo en el contexto de un modelo experimental para la EP generado por la administración del LPS intraestriatalmente. Y con ello evaluar los efectos neuroprotectores que podría causar la mezcla de bacterias probióticas.

4. HIPÓTESIS

5. OBJETIVOS



HIPÓTESIS

La administración del probiótico que contiene la mezcla de bacterias *Bifidobacterium animalis ssp lactis* Bb12 y *Lactobacillus rhamnosus* GG, previene la neurodegeneración dopaminérgica y las afectaciones motoras mediante la modulación del fenotipo tóxico de la microglía.

OBJETIVOS

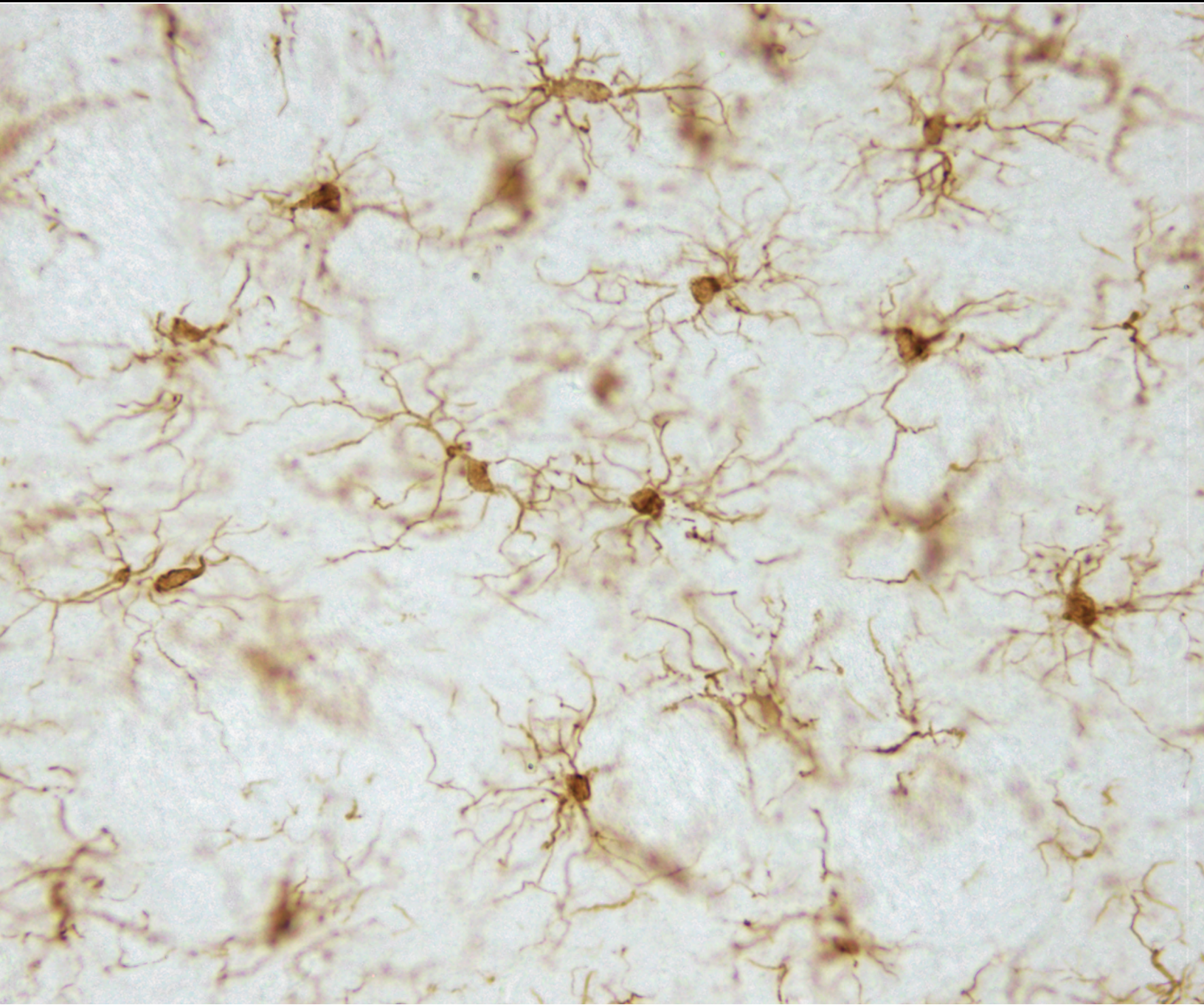
Objetivo general

Estudiar los efectos neuroprotectores y neuroinmunomoduladores del probiótico Microbiot® en ratas hemiparkinsonianas.

Objetivos particulares

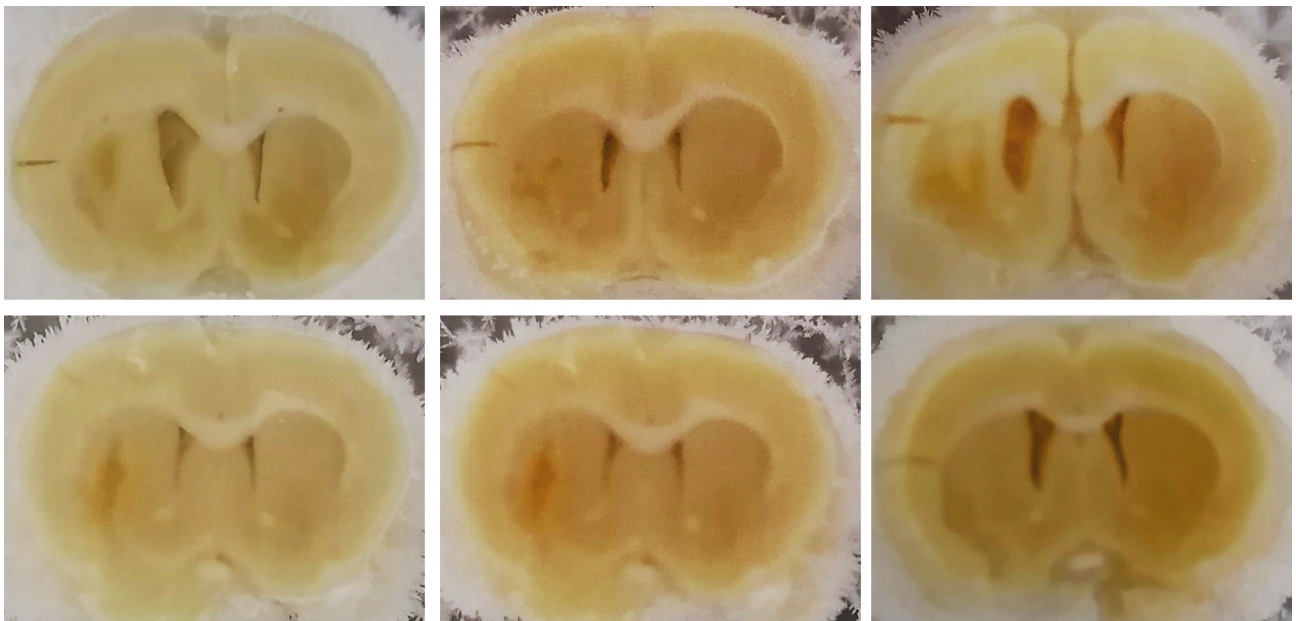
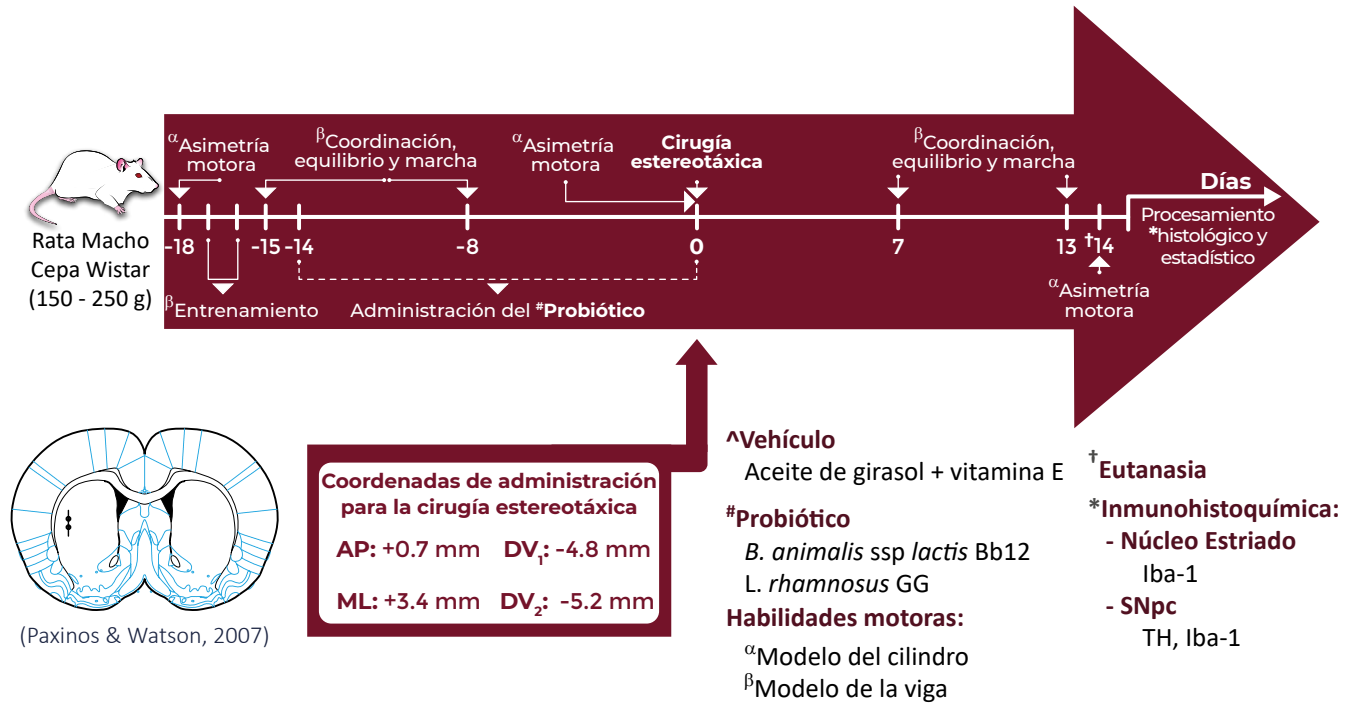
1. Evaluar el efecto neuroprotector de las bacterias probióticas mediante el análisis histopatológico de la región de la SNpc y de las habilidades motoras.
2. Evaluar el efecto neuroinmunomodulador de las bacterias probióticas a través del análisis morfométrico de las células Iba-1 positivas del núcleo estriado y la SNpc.

6. DIAGRAMA DE TRABAJO



Grupos	i. c.	2 μ L de SSI		2 μ L de LPS [16 μ g/ μ L]			n_T
	v. o.	300 μ L de ^Vehículo [1.6 mM]	2x10 ⁹ UFC de #Probiótico	NA	300 μ L de ^Vehículo [1.6 mM]	2x10 ⁹ UFC de #Probiótico	
†Eutanasia (dpi)		14	14	14	14	14	
n		6	6	6	9	11	38

dpi: día posterior a la inyección cerebral; **i.c.:** vía intracerebral; **NA:** no aplica; **UFC:** unidad formadora de colonia; **v. o.:** vía oral.



*Imágenes representativas del sitio de inyección.

7. METODOLOGÍA



Sujetos experimentales

Se trabajó con ratas macho de la cepa Wistar (150 - 250 g al iniciar los procedimientos experimentales; $n = 38$), las cuales fueron alojadas en el vivario del Laboratorio de Neurofisiología en cajas de acrílico transparente, con acceso libre a alimento y a agua; ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas; temperatura de 23 ± 2 °C. Los animales de experimentación fueron proporcionados por el Bioterio del Centro de Investigaciones Regionales de la Universidad Autónoma de Yucatán. Los animales fueron tratados de acuerdo con la norma (NOM-062-ZOO-1999). Los sujetos experimentales fueron manipulados todos los días para su habituación al estudiante y disminución del estrés.

Se formaron los siguientes grupos: Solución Salina Isotónica intracerebral (i.c.)/Aceite de Girasol + vitamina E v.o. (SSI + AGE; $n = 6$); SSI i.c./Probiótico v.o. (SSI + P; $n = 6$); Lipopolisacárido i.c./AGE v.o. (LPS + AGE; $n = 9$); LPS i. c./P v.o. (LPS + AGE; $n = 11$) y LPS i.c. (LPS; $n = 6$) (FIGURA 13).



FIGURA 13. SUJETOS EXPERIMENTALES.

Se muestra el vivario del laboratorio de Neurofisiología de la Universidad Autónoma de Yucatán y los sujetos experimentales utilizados para desarrollar el proyecto de tesis de maestría.

Cirugía estereotáxica

Los animales fueron anestesiados con la mezcla ketamina [115.2 mg/ml] y xilazina [20 mg/ml] (85:16 mg/kg; i.p; previo a la cirugía). Los animales fueron sometidos a la cirugía estereotáxica para inducir el modelo parkinsoniano mediante la inyección unilateral e intraestriatal de 2 μ L de LPS [16 μ g/ μ L] (de *Escherichia coli*, serotipo O26:B6; Sigma) (Parra et al., 2020) en el estriado dorsolateral (AP: +0.7 mm; ML: +3.4 mm; DV1: -4.8 mm y DV2: -5.2 mm) (Paxinos & Watson, 2007), además, como grupo control, se administró, en las mismas condiciones, SSI. Ambas sustancias fueron inyectadas a una velocidad de infusión de 0.2 μ L/min.

Los sujetos experimentales recibieron los cuidados postoperatorios requeridos, como mantenerlos en un lugar cálido, administrarles 1 mL de SSI (s.c.) cada hora a partir de que terminó el procedimiento quirúrgico hasta su recuperación ambulatoria. Además, se administró oralmente, durante la mañana y al medio día, 1 o 2 mL de SSI que contenía glucosa (5%) durante 3 o 4 días a partir del siguiente día a la cirugía y se manipularon diariamente por, al menos, tres minutos por la mañana y al medio día (FIGURA 14).

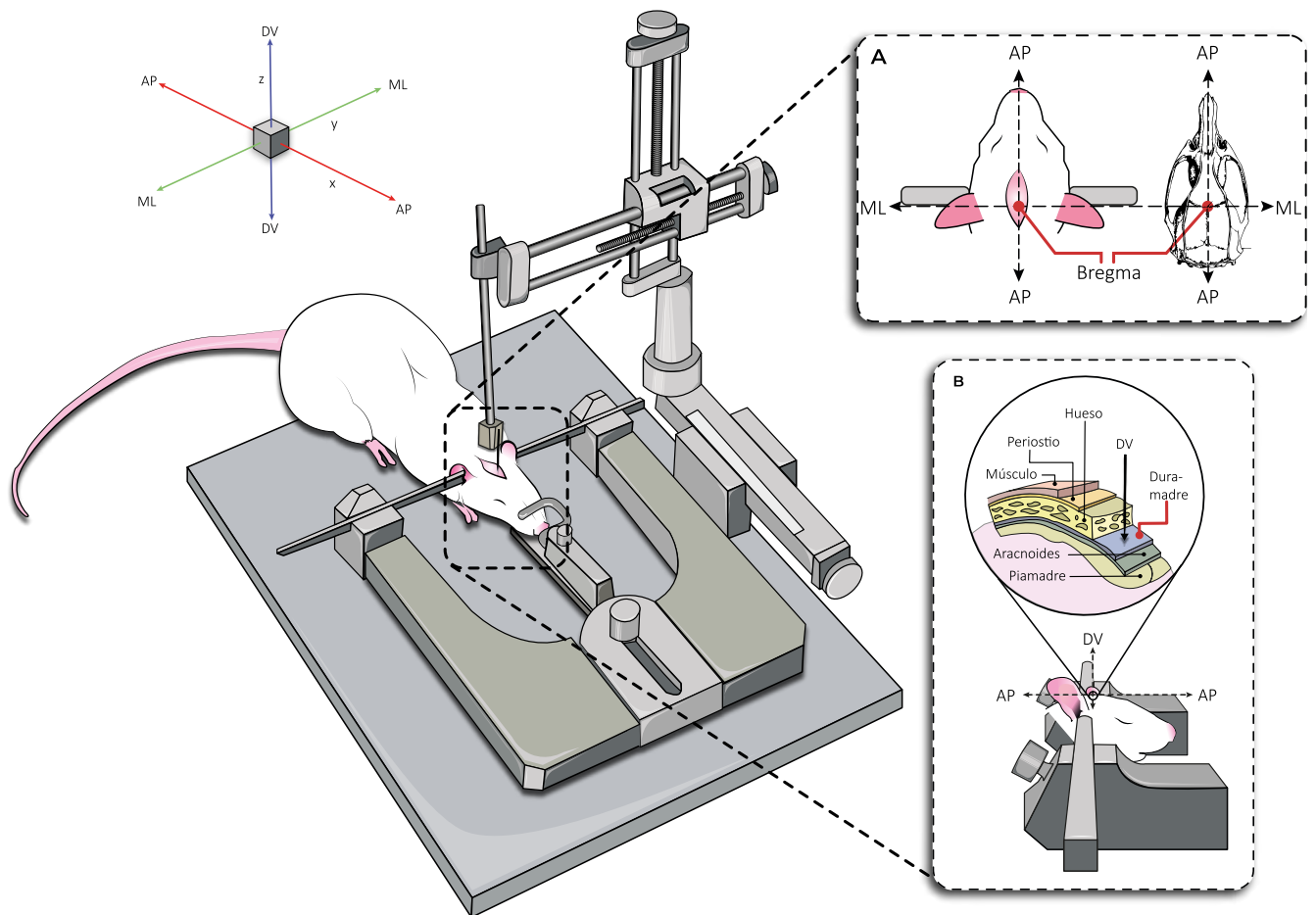


FIGURA 14. CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA.

Se muestra un sujeto experimental anestesiado e instalado en el aparato estereotáxico. De acuerdo con el plano cartesiano de tres dimensiones (A) en el plano x, z (o bien, ML, AP) se sitúa a Bregma como la coordenada de origen y habiendo localizado el sitio de inyección en ese plano, (B) se procede a trepanar hasta exponer la duramadre, que es la coordenada 'cero' del eje y (o DV), de esta manera, mediante el uso del atlas de coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (2007), es posible localizar espacialmente el núcleo cerebral deseado. ML: Medial-Lateral; AP: Antero-Posterior; DV: Dorsal-Ventral.

Tratamiento probiótico

Los sujetos sometidos a la cirugía recibieron un tratamiento profiláctico, mediante la vía oral (v.o.) 300 μ L que contiene aproximadamente 1×10^9 UFC de cada una de las bacterias *Bifidobacterium animalis* ssp *lactis* Bb12 y *Lactobacillus rhamnosus* GG. Se utilizó una formulación farmacéutica comercial llamada Microbiot[®], elaborada por los Laboratorio Columbia S.A. de C.V., CDMX, México; la formulación comercial contiene 74.55 mg añadidos de vitamina E (α -tocoferol) por cada 100 g de probiótico. Los grupos control recibieron 300 μ L de un placebo constituido por una mezcla de vitamina E (Gelpharma[®]; 100 mg/mL) en aceite de girasol [1.6 mM, v/v]. El tratamiento duró 15 días, esto es: 14 días previos a la cirugía y el día de la cirugía.

Modelo del cilindro

Los sujetos experimentales fueron sometidos a esta prueba 18 días previos a la cirugía estereotáxica, el día de la cirugía previo a esta y 14 días posteriores a la cirugía antes de darle muerte por eutanasia. Para la prueba fueron colocados, individualmente, en un cilindro de acrílico transparente (30 cm de alto y 20 cm de diámetro) durante 5 minutos, en ese lapso, se videograbaron para cuantificar el número de veces en que apoya la palma de la extremidad ipsilateral, contralateral a la lesión o ambas extremidades sobre las paredes del cilindro (**FIGURA 18**) (Schallert et al., 2000; Schallert & Tillerson, 2000; Tillerson et al., 2001). Los datos para el análisis fueron obtenidos mediante las siguientes fórmulas (Parra-Paz et al., 2021):

$$\begin{aligned} \text{\%Uso de la} \\ \text{extremidad ipsilateral} &= \left(\frac{\text{extremidad ipsilateral} + \frac{1}{2} \text{ambas extremidades}}{\text{ambas extremidades} + \text{extremidad ipsilateral} + \text{extremidad contralateral}} \right) 100 \\ \text{\%Uso de la} \\ \text{extremidad contralateral} &= \left(\frac{\text{extremidad contralateral} + \frac{1}{2} \text{ambas extremidades}}{\text{ambas extremidades} + \text{extremidad ipsilateral} + \text{extremidad contralateral}} \right) 100 \end{aligned}$$

Modelo de la viga elevada de equilibrio

Esta prueba tiene dos fases: la de entrenamiento y la prueba propiamente dicha. La *fase de entrenamiento* fue realizada durante los dos días previos a inicial la prueba en sí. La *prueba* se realizó en tres momentos: antes de iniciar el tratamiento probiótico, esto es: 15 días antes de la cirugía estereotáxica; durante el tratamiento, o sea: 8 días antes de la cirugía y, finalmente, posterior al tratamiento es decir: 7 y 13 días posteriores a la cirugía estereotáxica (Allbutt & Henderson, 2007; Carter et al., 2001; Glajch et al., 2012; Miyanishi et al., 2019; Sweis et al., 2016). El sujeto fue colocado lo más alejado de la línea de salida y cruzó la viga según sus capacidades motoras. La viga consta de una trabe de madera de 100 cm de longitud por 2 cm de ancho, una plataforma de salida de 20 cm de largo por 4 cm de ancho y una caja de escape oscura de 25 cm por lado las cuales están soportadas por un par de postes de 100 cm de altura (**FIGURA 15A**).

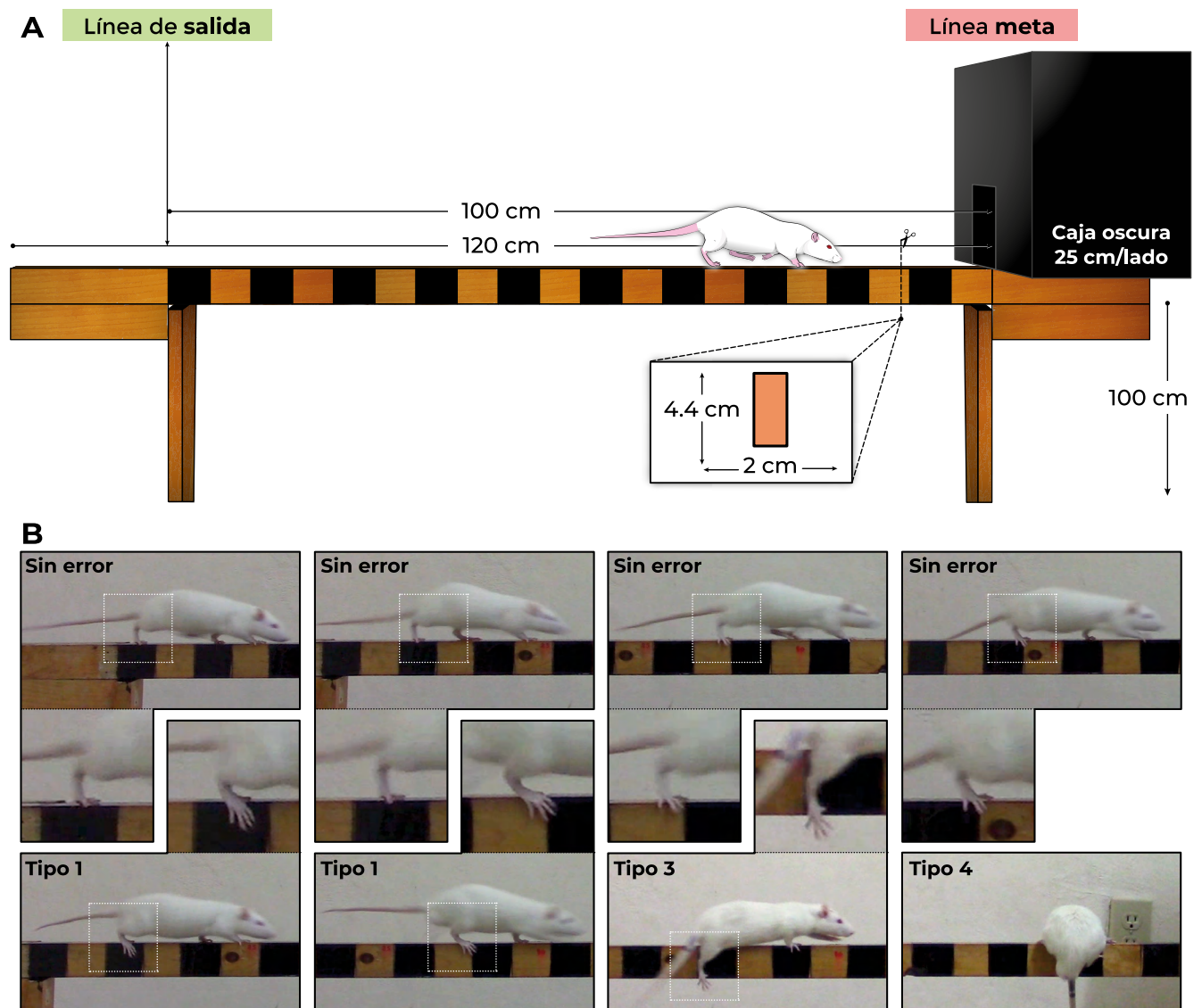


FIGURA 15. EL MODELO DE LA VIGA ELEVADA Y LOS PARÁMETROS EVALUADOS.

(A) La viga consta de una trabe de madera de 100 cm de longitud por 2 cm de ancho, una plataforma de salida de 20 cm de largo por 4 cm de ancho y una caja de escape oscura de 25 cm por lado las cuales están soportadas por un par de postes de 100 cm de altura. (B) La caracterización del tipo de error: se identificaron como tipos de errores (Tipo 1-4) Sin error: la pata fue colocada dentro de la viga o sobresalieron 3 dedos fuera de esta. Tipo 1: sobresalieron 4 dedos de la viga. Tipo 2: tomado como hipotonía, no se muestra. Tipo 3: la pata se deslizó fuera de la viga. Tipo 4: si el tren trasero se deslizó fuera de la viga o la pata objetivo fue arrastrada sobre la viga (Brailowsky et al., 1986).

Consideraciones

Los animales realizaron la tarea en 5 ocasiones. En las mediciones basales se consideraron como efectivos los cruces en los que el animal cruzó sin olfatear, detenerse o cambiar de dirección y se trató de que el animal tuviera el menor número de intentos posibles.

Todas las pruebas fueron videograbadas con una cámara *Canon Vixia HfR800* a una resolución de 1080p y a una velocidad de 60 fotogramas por segundo (fps) para el análisis posterior. Las variables que se midieron fueron: (1) la latencia de cruce, (2) la velocidad media de cruce, (3) el número de pasos, (4) la cadencia, (5) la función motora (el porcentaje de errores, el déficit motor y la caracterización del tipo de error), (6) el tiempo de soporte y (7) de balance, (8) el ciclo de paso, (9) la velocidad de balance, la longitud de la zancadas (10) posterior y (11) anterior y (12) las posiciones de impresión (Hamers et al., 2006; Hsieh et al., 2011; Koopmans et al., 2007). Los videos fueron analizados con los programas *Adobe Premier Pro-2018* y *FIJI*. Los parámetros 1, 3, 5, 6 y 7 fueron evaluados fotograma por fotograma con el programa *Adobe Premiere Pro*; las variables 10, 11 y 12 con el programa *FIJI* y el resto de las variables (2, 4, 8 y 9) son el resultado de la operación de algunos valores obtenidos preliminarmente.

Los valores obtenidos de los parámetros 1-5 son el resultado del promedio de los datos de los 5 cruces efectivos, mientras que los valores de 6-12 son los datos obtenidos por la medición de dos ciclos de paso continuos de la extremidad objetivo de cada uno de los 5 cruces efectivos en la fase constante de la marcha (que se encuentra entre los 20 y 80 cm de la viga); esto es: se obtuvo un valor para cada parámetro por cada sujeto experimental.

Parámetros por evaluar

Latencia de cruce: es el tiempo que la rata tarda en cruzar de la línea de salida hasta llegar a la meta, esto es: una vez que la rata coloca tres extremidades fuera de la línea de salida (primeros 15 cm) y, la pata que no esté dentro de la viga, se encuentra en la fase de despegue del paso, de inició la cuenta y terminó cuando, el animal, llegó a la caja oscura. *Velocidad media de cruce*: la razón entre la longitud de la viga y la latencia de cruce (dada en cm/s). *El número de pasos*: la cantidad de ocasiones en que el sujeto experimental posa la extremidad contralateral posterior sobre la viga. *La cadencia*: el número de pasos por segundo. *El porcentaje total de errores de paso*: es el número de errores que comete la extremidad contralateral posterior con relación al número de pasos de esa misma pata multiplicado por 100 ($[\text{errores}/\text{pasos}] \times 100$); la *caracterización del tipo de error en el paso*: se identificaron cuatro tipos de errores (Tipo 1-4) según su gravedad de acuerdo con Brailowsky et. Al (1986) luego se obtuvo la fracción porcentual de cada uno respecto al total de pasos ($[\text{Error tipo } x/\text{pasos}] \times 100$). *Sin error*: la pata no tiene déficit aparentemente y fue colocada dentro de la viga; *Tipo 1*: si el animal colocó la pata sobre la viga, pero sobresalieron 4 dedos de esta; *Tipo 2*: si la rata cojeó de la extremidad objetivo (tomado como hipotonía; fotografía no mostrada); *Tipo 3*: si la pata objetivo se deslizó fuera de la viga; *Tipo 4*: si el tren posterior se deslizó fuera de la viga o la pata objetivo fue arrastrada sobre la viga. *El déficit motor*: la viga fue dividida en dos partes iguales (50 cm cada una), se calificó en cada sección el error de mayor gravedad, y la puntuación final se obtuvo sumando los valores obtenidos en cada sección. Se puntuó como “*cero*”, si el animal no mostró algún déficit; se puntuó como “*1*” si la rata cometió errores *tipo 1*; se puntuó como “*2*”, si se cometieron errores *tipo 2*; se puntuó como “*3*” si se cometieron errores *tipo 3* menos de tres veces; se dio una puntuación de “*4*”, si se cometieron errores *tipo 3* tres o más veces y se calificó como “*5*” si se cometieron errores *tipo 4*. El mayor déficit se alcanza al obtener 10 puntos, es decir, si el animal deslizó el tren tracero al menos una vez en cada sección de la viga (error tipo 4) (**FIGURA 15B**).

El tiempo de soporte: la duración, en milisegundos, en que la extremidad contralateral posterior está en contacto con la viga en un ciclo de paso. *El tiempo de balanceo:* el tiempo en que la extremidad contralateral posterior no está en contacto con la viga en un ciclo de paso, está dado en milisegundos. *El ciclo de pasos:* el tiempo que dura la extremidad contralateral posterior en dar un paso, es la suma del tiempo de soporte y de balance (FIGURA 15C). *La velocidad de balanceo:* el cociente entre la longitud de la zancada y el tiempo de balance, está dado en cm/s. *La longitud de zancada:* distancia que hay entre dos toques continuos de la extremidad contralateral trasera o delantera, o bien, entre el inicio y el cierre de un ciclo de paso (FIGURA 15D, E). *Las posiciones de impresión:* la distancia entre la posición de la pata trasera respecto a la delantera en el mismo ciclo de pasos, si la pata posterior queda por detrás de la anterior se consideró como distancia positiva, si queda por delante se consideró como un valor de distancia negativo (FIGURA 15F) (Baker, 2013; Batka et al., 2014; Boix et al., 2018; Hamers et al., 2006; Koopmans et al., 2007).

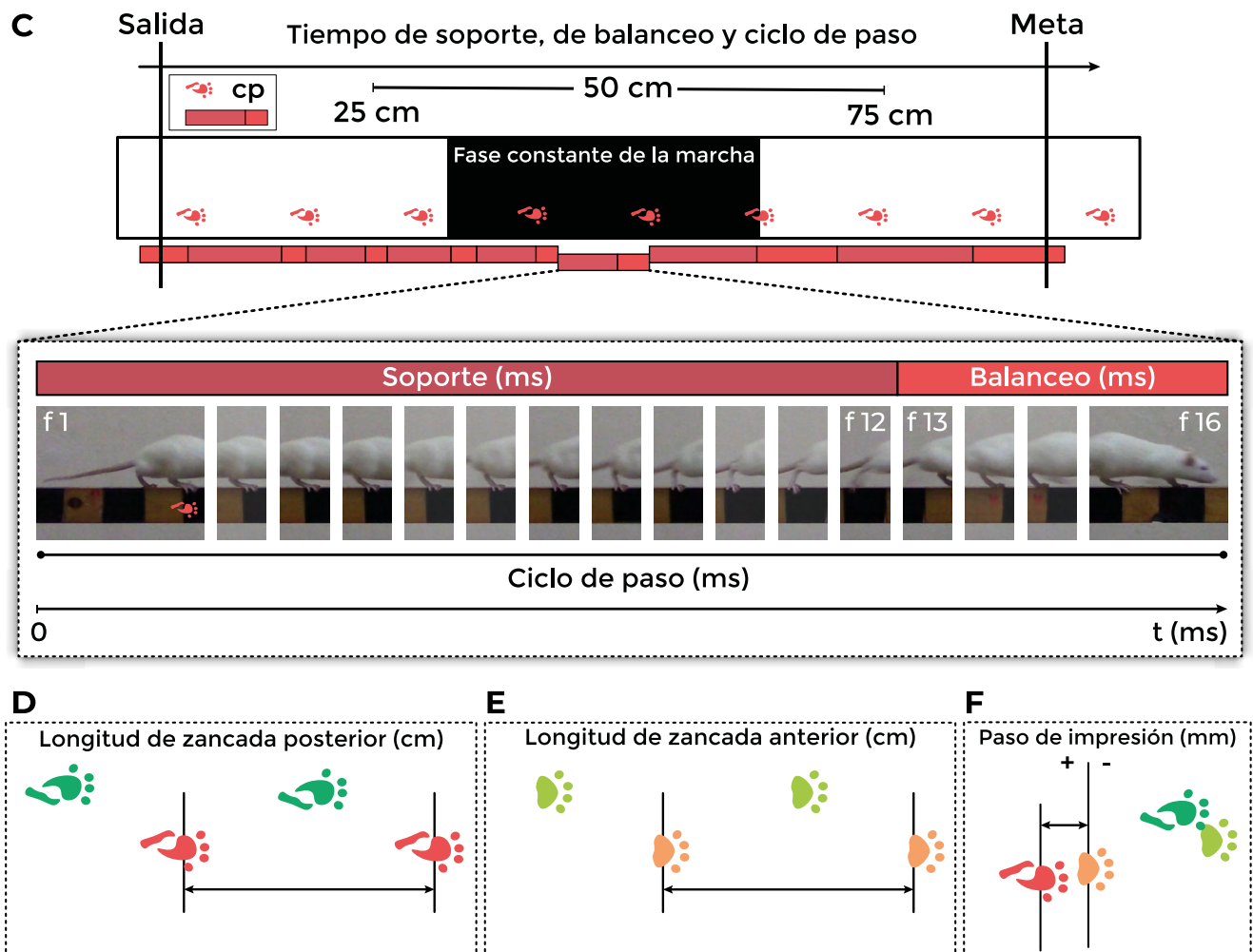


FIGURA 15. EL MODELO DE LA VIGA ELEVADA Y LOS PARÁMETROS EVALUADOS. CONTINUACIÓN.

El tiempo de soporte: la duración, en milisegundos, en que la extremidad contralateral posterior está en contacto con la viga en un ciclo de paso. (C) El tiempo de balanceo: la latencia en que la extremidad contralateral posterior no está en contacto con la viga en un ciclo de paso está dado en milisegundos. El ciclo de pasos: el tiempo que dura la extremidad contralateral posterior en dar un paso, es la suma del tiempo de soporte y de balance. (D, E) La longitud de zancada: distancia que hay entre dos toques continuos de la extremidad contralateral trasera o delantera. (F) Las posiciones de impresión: la distancia entre la posición de la pata trasera respecto a la delantera en el mismo ciclo de pasos, si la pata posterior queda por detrás de la anterior se considerará como distancia positiva, si queda por delante se consideró como un valor de distancia negativo (Hamers et al., 2006). cp: pata contralateral posterior; f: fotograma; ms: milisegundos.

Se ha descrito que diversas variables de la marcha en ratas y ratones tienen relación estadística con la velocidad, esto es: el ritmo, el tiempo de soporte, el tiempo de balanceo, el ciclo de paso, la longitud de zancada, la velocidad de balance y la posición de impresión dependen de la velocidad (Aceves et al., 2020; Batka et al., 2014; Clarke & Parker, 1986), por lo que, para evitar algún error estadístico por no considerar esta correlación, cada valor de cada cruce de la viga de los parámetros antedichos se multiplicó por un factor (F) de normalización según la propuesta de Boix et al (2018). El factor de normalización se obtuvo del siguiente modo (*) *el promedio de la velocidad media por grupo en un punto temporal específico*:

$$F = \frac{\text{Velocidad media de cada cruce}}{\text{Promedio de la velocidad media}^*}$$

Procesamiento de histológico

Los sujetos experimentales fueron sacrificados 14 días posteriores a la inyección del inflamógeno o del vehículo respectivo con pentobarbital sódico (65 mg/kg; i. p.). Se perfundieron intracardiamente con SSI, durante 10 minutos y paraformaldehído (PFA) al 4% disuelto en buffer de fosfato sódico (PBS; pH 7.4) por 15 minutos. Los cerebros fueron extraídos y colocados en un recipiente que contenía solución fijadora por 3 días y, posteriormente, se almacenaron en un recipiente con PBS hasta la fecha de su procesamiento.

Los cerebros fueron seccionados coronalmente (60 μm de grosor) con un microtomo (Leica SM 2010R) mediante la técnica de congelación con anhídrido carbónico sólido ($\text{CO}_{2(s)}$). Los cortes obtenidos fueron colocados en pocillos con PBS para su traslado (y conservación) y luego fueron sometidos a una técnica inmunohistoquímica. Se montaron en portaobjetos gelatinizados con grenetina al 3%; se deshidrataron con un tren de solución alcohólica en concentraciones ascendentes y xilol; se secaron a temperatura ambiente alrededor de 24 horas; se agregó resina de montaje y se cubrieron con un cubreobjetos. Finalmente, las estructuras fueron observadas en un microscopio óptico, se capturaron las micrografías y estas se procesaron según los objetivos (**FIGURA 16**).

Inmunohistoquímica

Secciones representativas de la (SNpc) (-4.8 mm, respecto a Bregma) y el núcleo estriado (0.8 mm, respecto a Bregma) fueron inmunoteñidas, por el método de peroxidasa, con anticuerpos primarios para localizar a las proteínas tirosina hidroxilasa (TH; Merck, 1:2000); y la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba-1; Wako, 1:1000). En flotación, los cortes del tejido cerebral fueron lavados con Tritón-100x (Tx-100 [0.2%]) disuelto en PBS (Tx-100/PBS) tras cada proceso. Se inhibió la peroxidasa endógena con H_2O_2 [3%] disuelta en Tx-100/PBS; se bloquearon los antígenos inespecíficos con suero de cabra normalizado (NGS [10%]; Vector S-100); e incubó con el anticuerpo primario durante una noche. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón (vector: BA-9200, 1:500), luego, con estreptavidina por 1 hora y se reveló con diaminobencidina (DAB; [1 mg/2 mL]). Los tejidos inmunoteñidos fueron montados en portaobjetos gelatinizados, deshidratados en un tren de alcoholes (70%, 96%, 100%, 100%) y xilol; y luego fueron cubiertos con resina y cubreobjetos para el procesamiento de imagen.

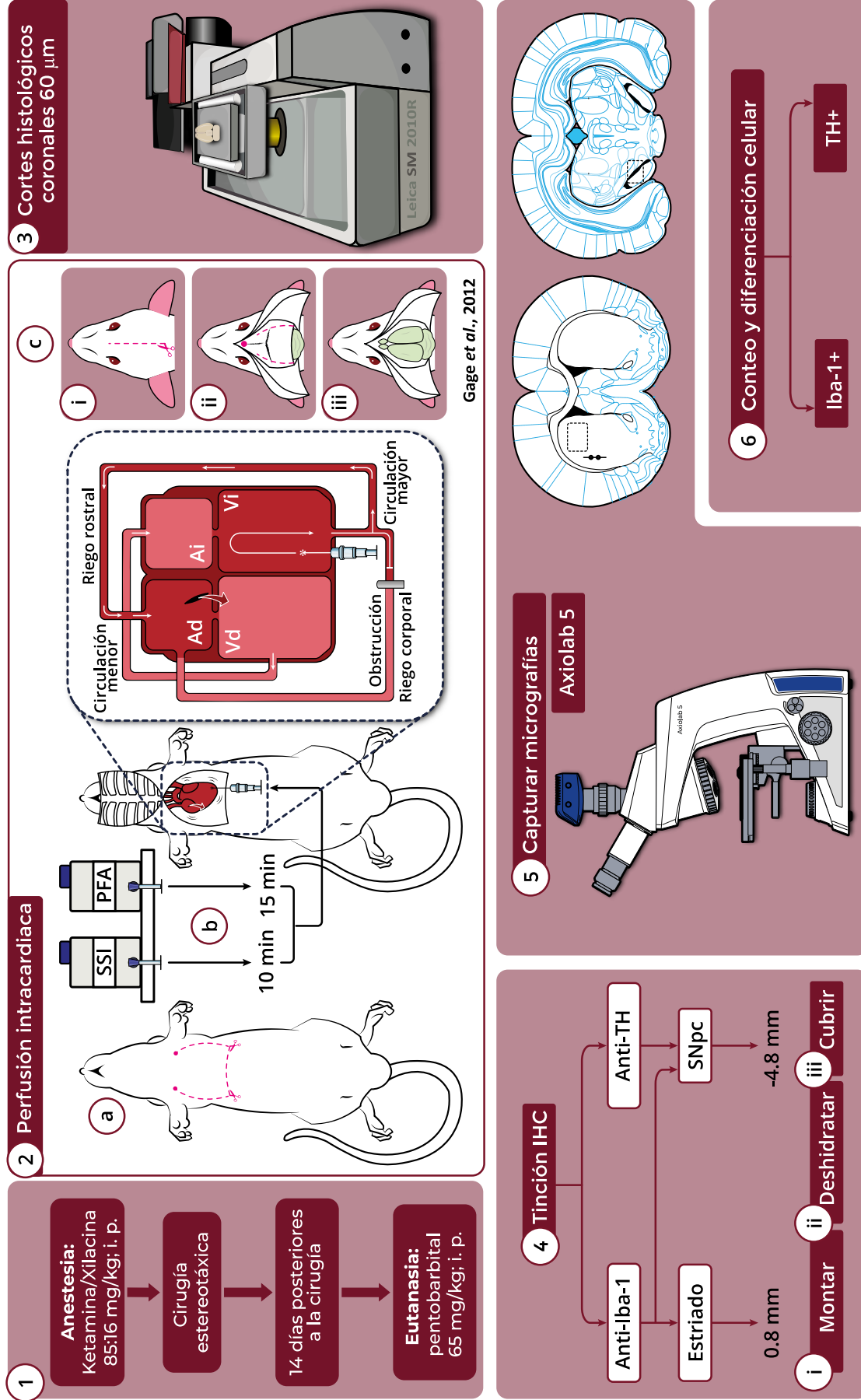


FIGURA 16. DESCRIPCIÓN GRÁFICA DEL PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO, INMUNOHISTOQUÍMICO Y DE IMAGEN.

(1) Luego de que transcurrieron los días posteriores a la cirugía, los sujetos experimentales fueron muertos, (2a) colocados sobre una plataforma de perfusión y se escindió la región de la caja torácica, (2b) se perfundieron soluciones limpiadora y fijadora, (2c) se decapitó al SE y se extrajo el cerebro. Tomado y modificado de Gage et al., 2012. (3) se realizaron cortes coronales por congelación. (4) se inmunotizó. (5) se capturaron micrografías de las regiones indicadas, (6) se realizó el conteo celular. Ad: aurícula derecha; Ai: aurícula izquierda; Vd: ventrículo derecho; Vi: ventrículo izquierdo.

Procesamiento de imagen

Una vez que los tejidos fueron procesados para inmunohistoquímica, se tomaron fotomicrografías del núcleo estriado ipsilateral a la lesión (20x) y en la SNpc ipsilateral a la lesión (10x) con un microscopio de campo claro (Zeiss® Axiolab 5). Con el software *FIJI*, se midió el porcentaje de área teñida para Iba-1. Los datos obtenidos fueron graficados y analizados estadísticamente con el software *GraphPad Prism 8*®.

Morfometría de subtipos microgliales

En la región del núcleo estriado que indica la figura y la SNpc, la microglía fue cuantificada y clasificada manualmente en cinco subtipos que relacionan el estado de activación de estas con la morfología que adquieren (**FIGURA 17**), según lo descrito por Torres-Platas et al., (2014), Lee et al., (2018) y Parra et al., (2020), así como en células tipo macrófago, en concordancia con lo mostrado por McGeer et al (1988): i. la *microglía ramificada* (o en reposo): dispone de un cuerpo celular pequeño y redondeado (~20-25 μm^2). Los procesos (expansiones membranales en forma de ramas arborizadas) primarios (que surgen del cuerpo celular), secundarios (que emanan de los procesos primarios), terciarios (que nacen de los procesos secundarios), cuaternarios y quinaros son largos y delgados y tienen un alto número de nodos (puntos de bifurcación de los procesos), ii. la *microglía preparada* (o *primed*): presenta un cuerpo celular alargado (~50-70 μm^2) más grande que el fenotipo ramificado. Los procesos primarios son más gruesos y cortos si se compara con el fenotipo en ramificado, pero mantiene el patrón de ramificación, iii. la *microglía activada*: muestra un cuerpo celular grande u oval o forma de huso (~50-70 μm^2). Muestra algunos procesos primarios no tan extensos y gruesos. iv. la *microglía ameboide*: en el cuerpo celular se aprecia dos, una o ninguna expansión de la membrana celular, pero no totalmente redondeado, sino con patrones ondulados o puntiagudos no ramificados. v. las *células tipo macrófago*: se muestran casi totalmente redondeadas y sin expansiones protoplasmáticas (**FIGURA 17**).

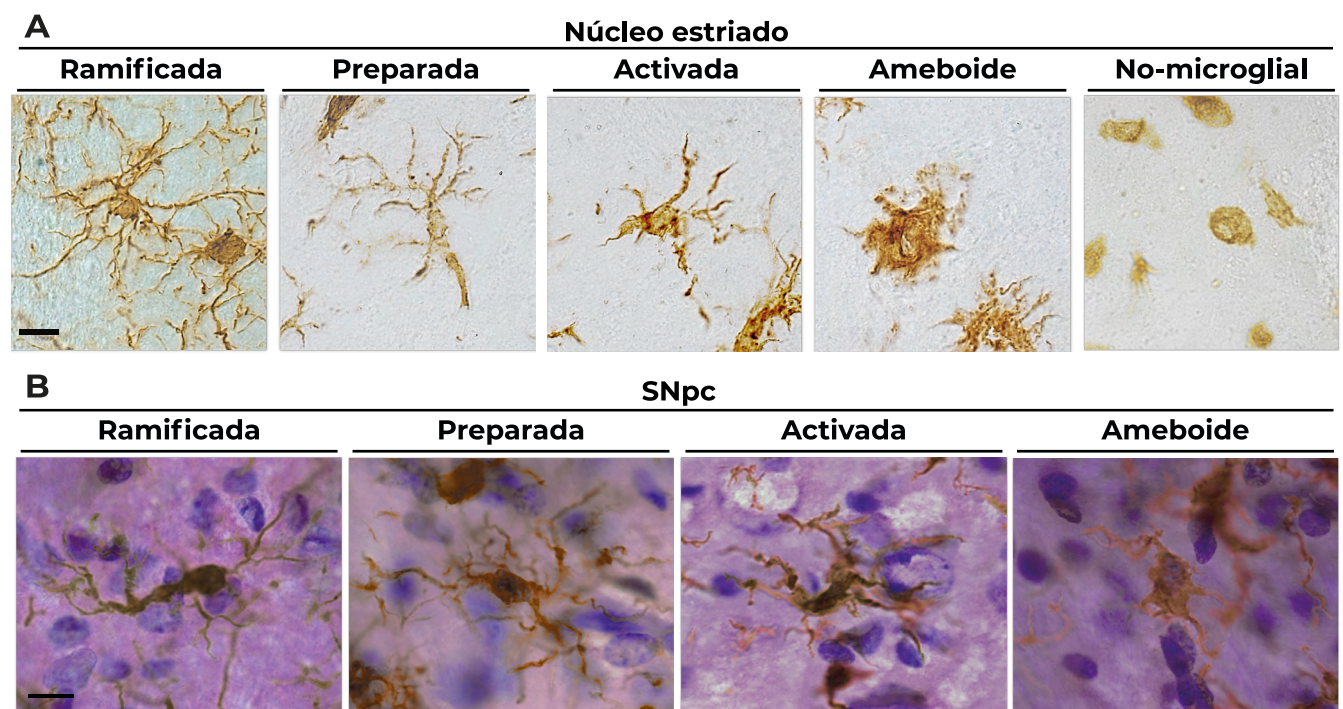


FIGURA 17. MORFOMETRÍA MICROGLIAL.

Se muestran los cinco tipos de poblaciones celulares (Iba-1+) presentes en el cerebro de rata planteado por el análisis morfométrico descrito por Torres-Platas et al. (2014). La barra indica 10 μm . Tomado de Parra et al., 2020.

Procesamiento estadístico

Las pruebas estadísticas se realizaron con el software GraphPad PRISM 8. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas si los valores obtenidos tenían una $p < 0.05$. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Se realizó la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnoff para probar la distribución normal de los datos. Si los datos cumplieron con la hipótesis de homogeneidad se realizó un análisis de varianza y una prueba poshoc de Tukey, si no la cumplieron, se realizó una prueba para datos no paramétricos. De forma específica para el modelo del cilindro y la morfometría de los subtipos microgliales se analizaron con un ANOVA de dos vías. Para el análisis de masa corporal y los parámetros de la marcha se evaluó un modelo de efectos mixtos para datos de medidas repetidas y únicamente se comparó entre grupos y no a través entre puntos temporales. Para el número de células TH+ e Iba-1+ se analizó con un ANOVA de una vía. En todos los casos se realizó una prueba de Tukey para el análisis de múltiples comparaciones.

8. RESULTADOS



El tratamiento profiláctico con el probiótico no modifica la asimetría motora inducida por LPS

La asimetría motora fue evaluada mediante el modelo del cilindro (**FIGURA 18A**). Las gráficas muestran que los sujetos experimentales administrados con LPS, así como sus controles de SSI antes de ser sometidas a la cirugía usan de manera indistinta las extremidades ipsi (**B**) y contralateral (**C**). Además, se muestra que, al comparar los puntos temporales 14 dpc y 18 previos a la cirugía, los tres grupos administrados con LPS disminuyen e incrementan, respectivamente, de manera significativa el uso de la extremidad contralateral ($p < 0.0001$) e ipsilateral ($p < 0.0001$). Es notable resaltar que, los grupos LPS (vs LPS + AGE; $p = 0.0431$; vs LPS + P; $p = 0.0844$) y LPS + P ($p = 0.0225$), 14 dpc, se mantuvieron asimétricas, sin embargo, el grupo LPS + AGE ($p = 0.1791$) no muestra diferencias respecto a su control salino.

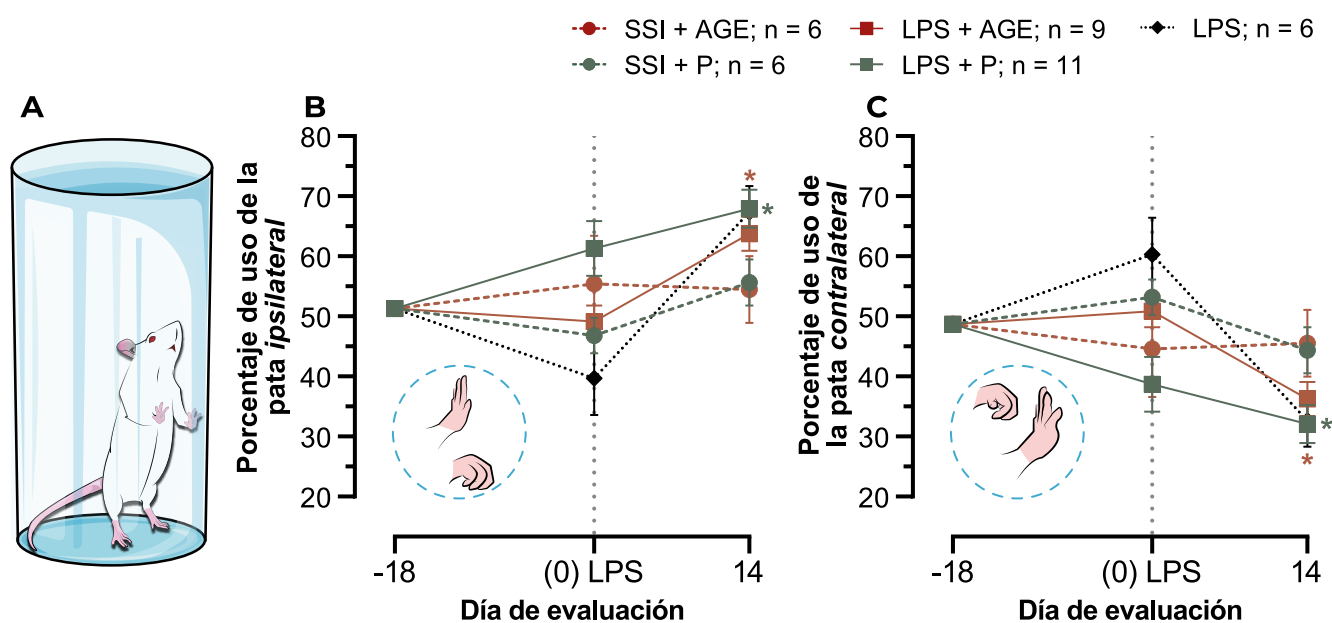


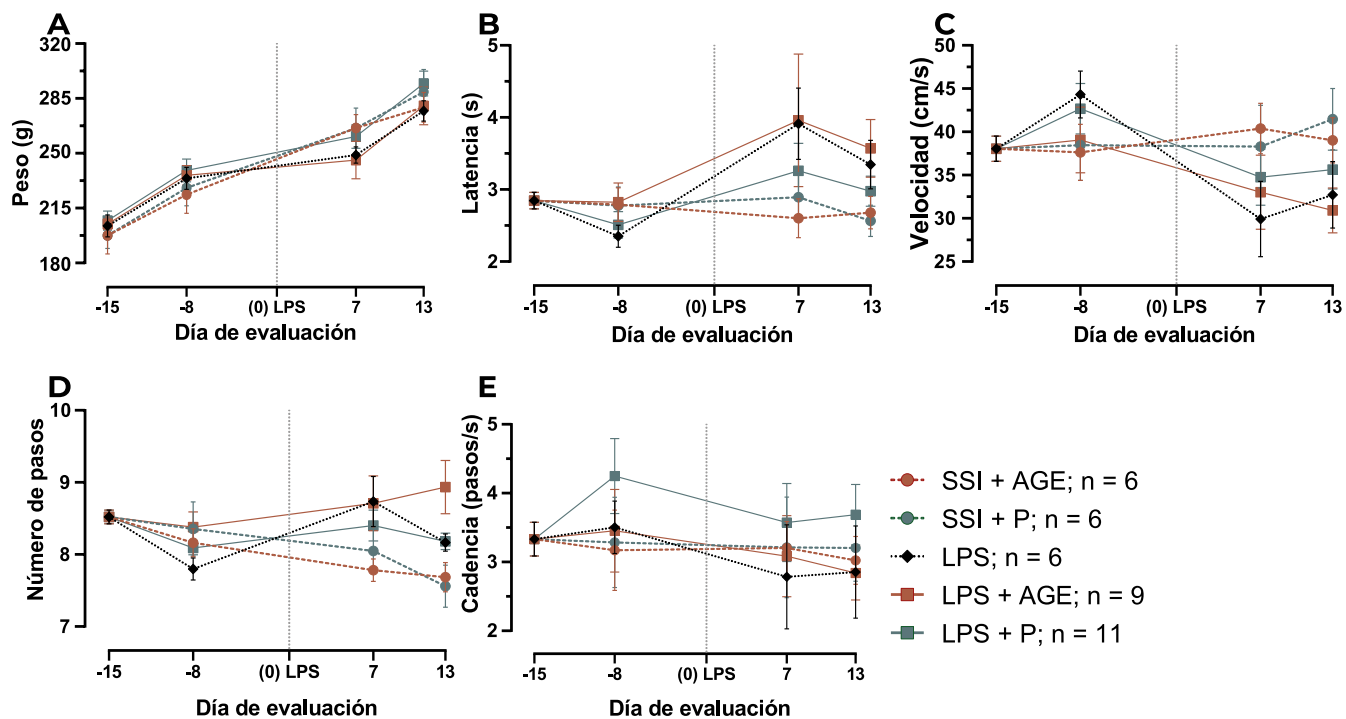
FIGURA 18. EL TRATAMIENTO CON EL PROBIÓTICO NO MODIFICA LA ASIMETRÍA MOTORA INDUCIDA POR LPS

(A) Diagrama del modelo del cilindro y ejemplos de los tipos de exploración de las extremidades anteriores en el modelo de cilindro. Se muestran las puntuaciones del porcentaje de uso de las extremidades anteriores ipsilateral (B) y contralateral (C) evaluadas 18 días antes de la inyección, el día de la inyección y 14 días después de la inyección de LPS. En las gráficas, la línea punteada vertical indica el día de la cirugía estereotáxica que coincide con la prueba conductual, aunque se realizó unas horas antes. AGE: aceite de girasol + vitamina E; P: probiótico. SSI + AGE, $n = 6$; SSI + P, $n = 6$; LPS, $n = 6$; LPS + AGE, $n = 9$; LPS + P, $n = 11$. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de dos vías y una post-Tukey. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). * < 0.05 . * LPS vs SSI+ AGE, * vs SSI + P.

El tratamiento profiláctico con el probiótico no modifica el crecimiento normal de los animales ni la coordinación motora

En la **FIGURA 19** se observa que los animales evaluados en cada punto temporal tienen un peso semejante sin diferencias significativas entre grupos y que ni la cirugía o el probiótico alteraron sustancialmente el crecimiento normal de los animales (**A**).

La *coordinación motora* fue evaluada con el modelo de la viga elevada de equilibrio. En la **FIGURA 19** se indica que los animales recorren la viga de forma basal cerca de los 3 s y que 7 días de tratamiento con el probiótico no modifican de manera significativa el tiempo en que los animales recorren la viga puesto que el tiempo de recorrido se mantiene entre los 2 y 3 s. Sin embargo, 7 y 13 días posteriores a la cirugía (dpc) la media de las latencias se muestra mucho más diversas y, aunque la dispersión de los datos en los grupos administrados con SSI es menor que los administrados con LPS, no hay diferencias significativas entre grupos (**B**). También se aprecia que antes de iniciar el tratamiento probiótico, los sujetos experimentales, cruzan la viga alrededor de 37 cm/s. Tras 7 días de tratamiento probiótico los animales recorren la viga entre 30 y 45 cm/s. Asimismo, aunque las medias de la velocidad media de grupos administrados con LPS se aprecian tender hacia la disminución, en realidad no hay diferencias relevantes (**C**). Además, se ve que los animales dan entre 7 y 9 pasos para llegar de un lado al otro de la viga apreciándose, nuevamente, la tendencia a disminuir el número de pasos dados por los animales administrados con SSI, respecto a los administrados con LPS, sin embargo, únicamente existe una diferencia significativa entre los grupos LPS + AGE vs SSI + AGE (**D**). Finalmente, dado que la cadencia es una función de la latencia de cruce y del número de pasos no se muestran diferencias significativas en este parámetro (**E**).



El tratamiento profiláctico con el probiótico previene el empeoramiento de las afectaciones motoras causadas por el LPS

En la **FIGURA 20** se muestra la evaluación de la *función motora* en el modelo de la viga. Se muestra que los sujetos experimentales tienen un porcentaje basal de errores (**A**) y, por tanto, de déficit (**B**) y que el tipo de errores más común en estas circunstancias es el Tipo 1, es decir: el de posar la pata dentro de la viga, pero exponiendo, fuera de esta, 4 dedos (**C**). Esta afectación basal de la función motora se aprecia 15 y 8 días antes de ingresar a la cirugía estereotáxica y se mantiene 7 y 13 días después de esta en los animales administrados con SSI. Por su parte, los sujetos experimentales de los grupos LPS ($p < 0.0001$) sufren un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de errores respecto a los administrados con SSI + AGE y LPS + P 7dpc. Así mismo el grupo LPS + AGE incrementa significativamente del porcentaje de errores respecto su control SSI + AGE durante 7 dpc ($p = 0.0018$) y 13 dpc ($p = 0.0158$). No obstante, las ratas lesionadas con LPS y administradas oralmente con la mezcla de probióticos no muestran diferencias estadísticas ni comparándolo contra la media del grupo LPS, ni respecto al grupo control SSI + P (**A**). En ese sentido, la gráfica de déficit motor se aprecia semejante a la de los porcentajes de error (LPS vs SSI + AGE: ($p = 0.0009$); LPS vs SSI + P: ($p = 0.0008$); LPS +AGE vs SSI + AGE: ($p = 0.0184$) (**B**).

Por otra parte, la gráfica muestra la caracterización de los tipos de errors (**C**) y la tabla las significancias estadísticas (**C'**). Se aprecia que el LPS incrementa el porcentaje de error tipo 1 respecto a los dos grupos administrados con SSI durante el séptimo día poscirugía ($p < 0.0001$), así como contra el grupo SSI + AGE 13 dpc ($p = 0.0062$). Además, el grupo LPS + AGE incrementó significativamente los errores tipo 1 ($p = 0.0337$) y 3 ($p = 0.0012$) respecto al grupo control de SSI + AGE 7 dpc e incrementó el error tipo 2 respecto al mismo grupo, pero 13 dpc. Por su parte el grupo LPS + P, de manera análoga al grupo LPS + AGE, incrementó el porcentaje de error Tipo 1 respecto al grupo control de SSI + P 7 dpc. Finalmente, la diferencia más notable se encuentra al comparar a los grupos LPS + P vs LPS + AGE durante el séptimo día poscirugía en donde se muestra una diferencia estadísticamente significativa en el error tipo 3 ($p = 0.0135$), esto es: el segundo desliza la pata fuera de la viga más veces que el primero o dicho de otro modo, el probiótico causa que las ratas de este grupo deslicen en menos ocasiones la pata que las ratas del grupo administrado con AGE (**C**).

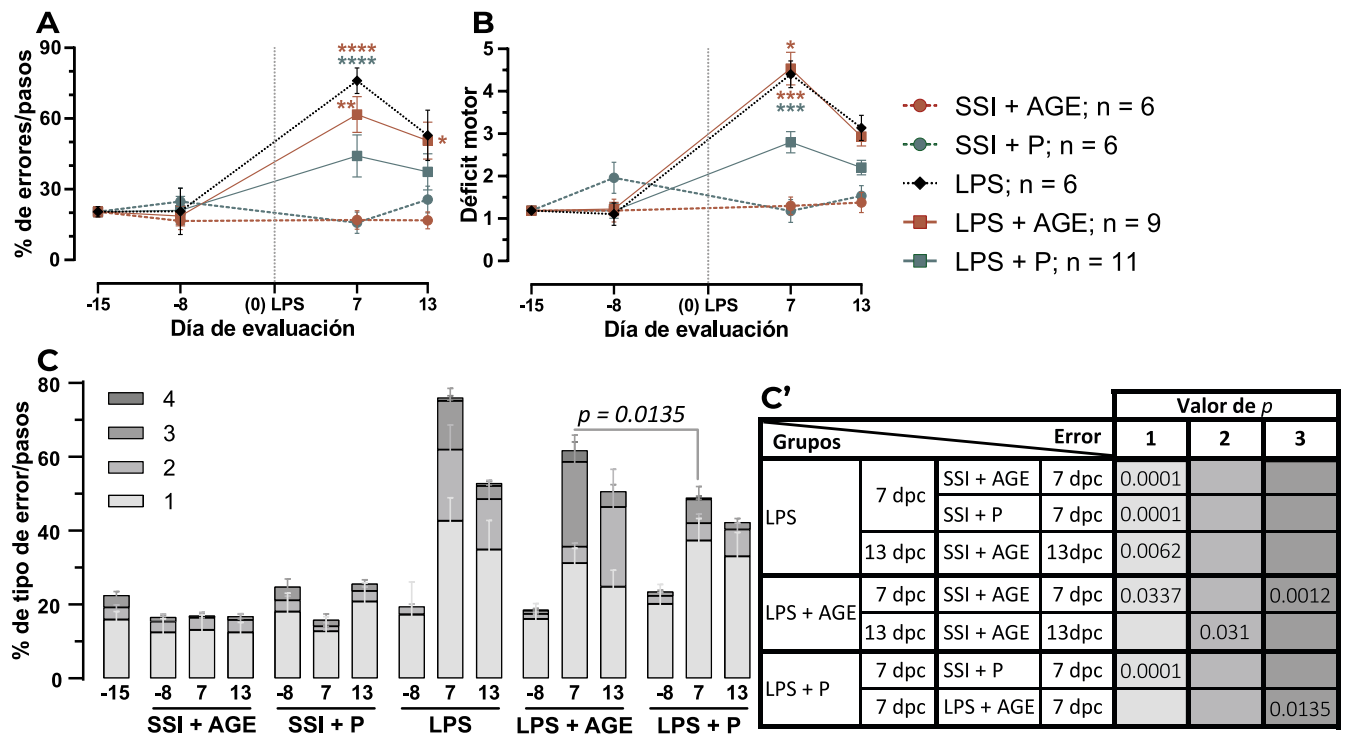


FIGURA 20. EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO CON EL PROBIÓTICO PREVIENE EL EMPEORAMIENTO DE LAS AFECTACIONES MOTORAS CAUSADAS POR EL LPS.

El tratamiento profiláctico con el probiótico no modifica el porcentaje de errores (A) ni el déficit motor de Brailovsky (B), pero el tratamiento probiótico evita el aumento de los errores tipo 3 (C y C'). En las gráficas A y B, la línea punteada vertical indica el día de la cirugía estereotáxica. AGE: aceite de girasol + vitamina E; dpc: día poscirugía P: probiótico. SSI + AGE, n = 6; SSI + P, n = 6; LPS, n = 6; LPS + AGE, n = 9; LPS + P, n = 11. Para A y B para el análisis estadístico se realizó un modelo de efectos mixtos para datos de medidas repetidas y una post-Tukey y para C un ANOVA de tres vías y una post-Tukey. Los valores se expresan como la media ± el error estándar de la media (SEM). * = p < 0.05, ** = p < 0.01, *** = p < 0.001, **** = p < 0.0001. * vs SSI+AGE, * vs SSI + P.

El tratamiento profiláctico con el probiótico previene el empeoramiento del ciclo de paso en el cruce de la viga

La marcha fue evaluada en el modelo de la viga. En la **FIGURA 21** se aprecia que de manera basal los animales, en un ciclo de paso, mantienen la extremidad contralateral posterior en contacto con la viga durante 140 ms (A), fuera del contacto de esta durante 90 ms (B) y, en suma, el ciclo de paso dura alrededor de 240 ms (C). Más adelante en el tiempo se aprecia una ligera tendencia a disminuirse las medias en los tres parámetros en todos los grupos. 7 dpc el tiempo de soporte, de balanceo y el ciclo de paso de los tres grupos lesionados con LPS se incrementó, aunque, únicamente el grupo LPS sin tratamiento muestra diferencias significativas respecto a los animales inyectados con SSI y administrados oralmente con el AGE ($p = 0.0406$) o el P ($p = 0.0494$). Curiosamente, el tiempo de soporte obtenido por el grupo LPS + AGE continúa incrementando, de forma análoga al grupo SSI + AGE, y el tiempo de soporte de los grupos administrados con el P decrece en 13 dpc, de tal forma que existe una diferencia significativa entre los grupos LPS + AGE y LPS + P ($p = 0.0141$). Finalmente, aunque la tendencia a incrementarse el ciclo de paso comparando a los grupos SSI + AGE vs LPS + AGE ($p = 0.0548$), únicamente existe una diferencia significativa entre los grupos LPS y LPS + AGE ($p = 0.0211$) durante 7 dpc.

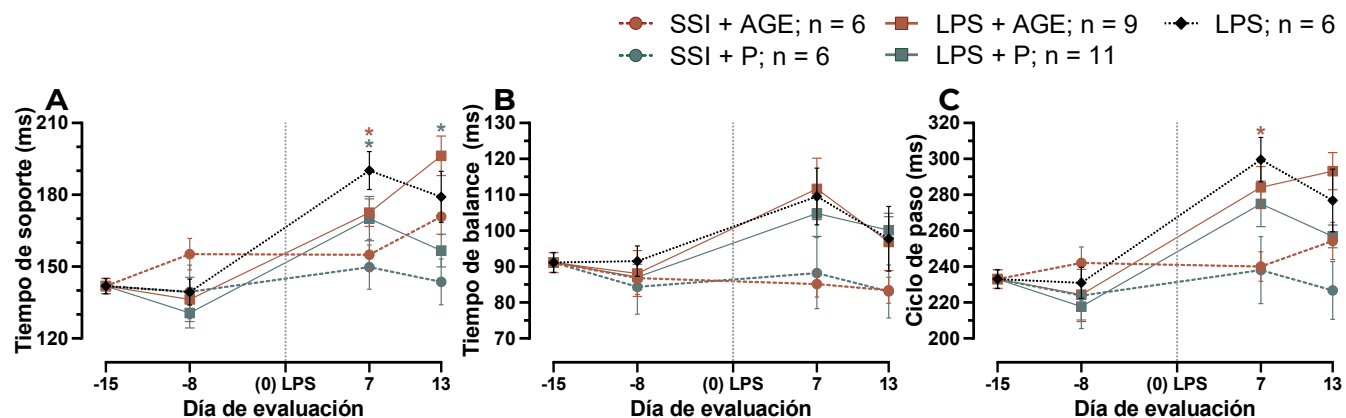


FIGURA 21. EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO CON EL PROBIÓTICO PREVIENE EL EMPEORAMIENTO EN EL CICLO DE PASO. El tratamiento profiláctico con el probiótico modifica (A) la fase de soporte 13 días después de la inyección, pero no modifica (B) la fase de balanceo o (C) el ciclo de pasos. En las gráficas A y B, la línea punteada vertical indica el día de la cirugía estereotáxica. AGE: aceite de girasol + vitamina E; P: probiótico. SSI + AGE, n = 6; SSI + P, n = 6; LPS, n = 6; LPS + AGE, n = 9; LPS + P, n = 11. El análisis estadístico se realizó un modelo de efectos mixtos para datos de medidas repetidas y una post-Tukey. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). * = $p < 0.05$. * vs SSI+ AGE, * vs SSI + P.

El LPS no modifica la longitud de las zancadas contra-laterales entre grupos, pero incrementa positivamente el paso de impresión

La longitud de las zancadas y la posición de impresión fueron evaluadas con el modelo de la viga. Las zancadas, a lo largo del estudio, varían entre los 12 y 18 cm como se muestra en la **FIGURA 22** y, aunque las medias de cada grupo muestran una tendencia clara a bifurcarse entre grupos lesionados o controles, especialmente en el punto temporal 13, lo cierto es que no existen diferencias significativas (**A** y **B**). Por otra parte, la posición de impresión se coloca entre +10 y -10 mm, esto es: la extremidad posterior fue colocada a 10 mm por detrás o por delante, respectivamente, de la posición en que fue colocada la extremidad delantera con antelación en los tres primeros puntos temporales evaluados (**C**). Sin embargo, durante el décimo tercer día poscirugía, los grupos lesionados con LPS más alguna solución oral incrementan positivamente la posición de impresión respecto a los controles de SSI aunque, únicamente, existe una diferencias estadísticamente significativa entre los grupos LPS + AGE y el control SSI + AGE ($p = 0.0341$). Finalmente, no existen diferencias significativas en la gráfica de velocidad de balance a pesar de que se aprecia una bifurcación entre los grupos administrados i.c. con LPS y SSI en 7 y 13 dpc (**D**).

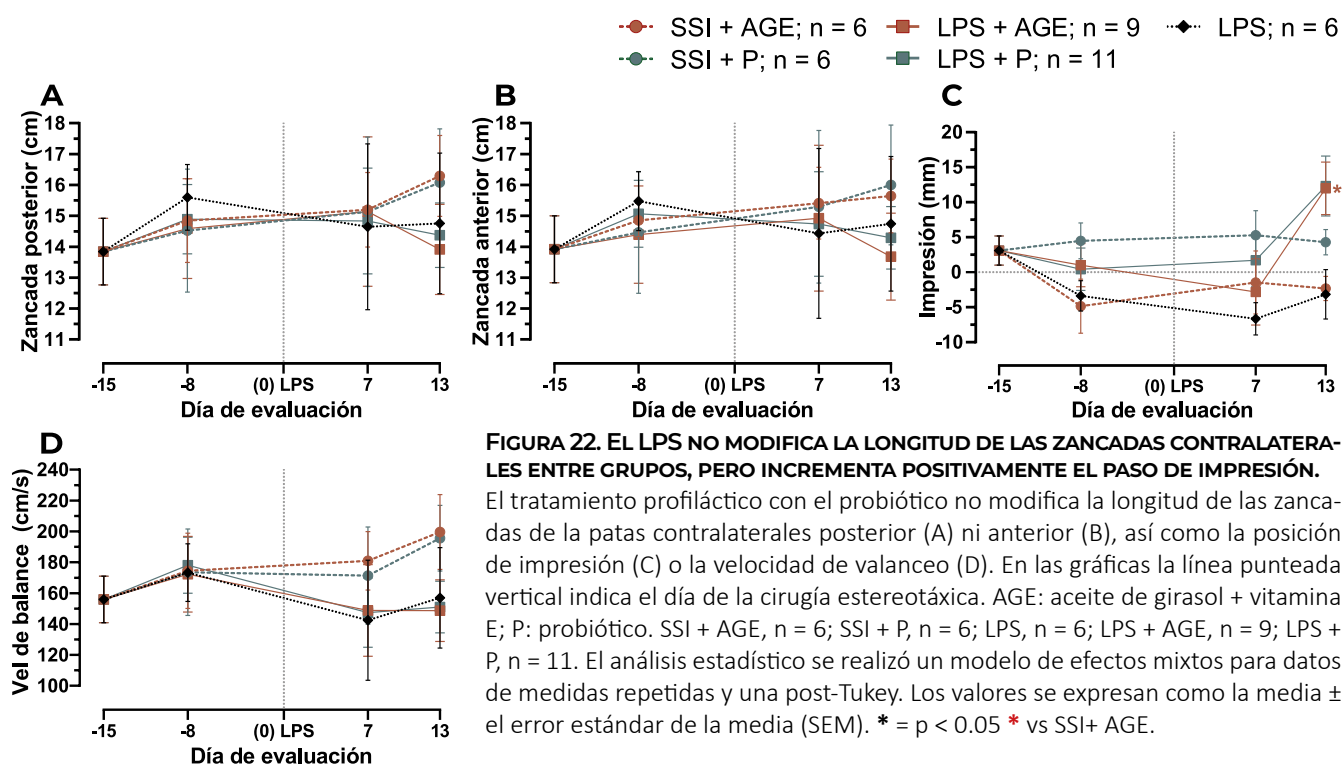


FIGURA 22. EL LPS NO MODIFICA LA LONGITUD DE LAS ZANCADAS CONTRALATERALES ENTRE GRUPOS, PERO INCREMENTA POSITIVAMENTE EL PASO DE IMPRESIÓN.

El tratamiento profiláctico con el probiótico no modifica la longitud de las zancadas de la patas contralaterales posterior (A) ni anterior (B), así como la posición de impresión (C) o la velocidad de valanceo (D). En las gráficas la línea punteada vertical indica el día de la cirugía estereotáxica. AGE: aceite de girasol + vitamina E; P: probiótico. SSI + AGE, n = 6; SSI + P, n = 6; LPS, n = 6; LPS + AGE, n = 9; LPS + P, n = 11. El análisis estadístico se realizó un modelo de efectos mixtos para datos de medidas repetidas y una post-Tukey. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). * = $p < 0.05$ vs SSI+ AGE.

El tratamiento profiláctico con el probiótico no previene la degeneración dopaminérgica en la SNpc

La neurodegeneración dopaminérgica fue evaluada mediante el conteo de células TH⁺ en la SNpc. En la **FIGURA 23** se aprecia el esquema representativo anteroposterior del sitio del análisis (**A**) y el panel micrográfico de cortes representativos de la SNpc ipsilateral con una la magnificación de las células dopaminérgicas (**B-F**). La gráfica (**G**) muestra que el LPS causa una degeneración DAérgica de alrededor del 0.3 veces respecto a la SNpc contralateral y una diferencia significativa ($p = 0.0008$) respecto al grupo SSI + AGE. Además, se aprecia que la mezcla de probióticos no protege a las células DANérgicas de los efectos tóxicos del inflamógeno ya que, como en el grupo LPS sin tratamiento oral, las neuronas TH⁺ disminuyen 0.4 veces respecto a los grupos de falsa lesión ($p < 0.001$).

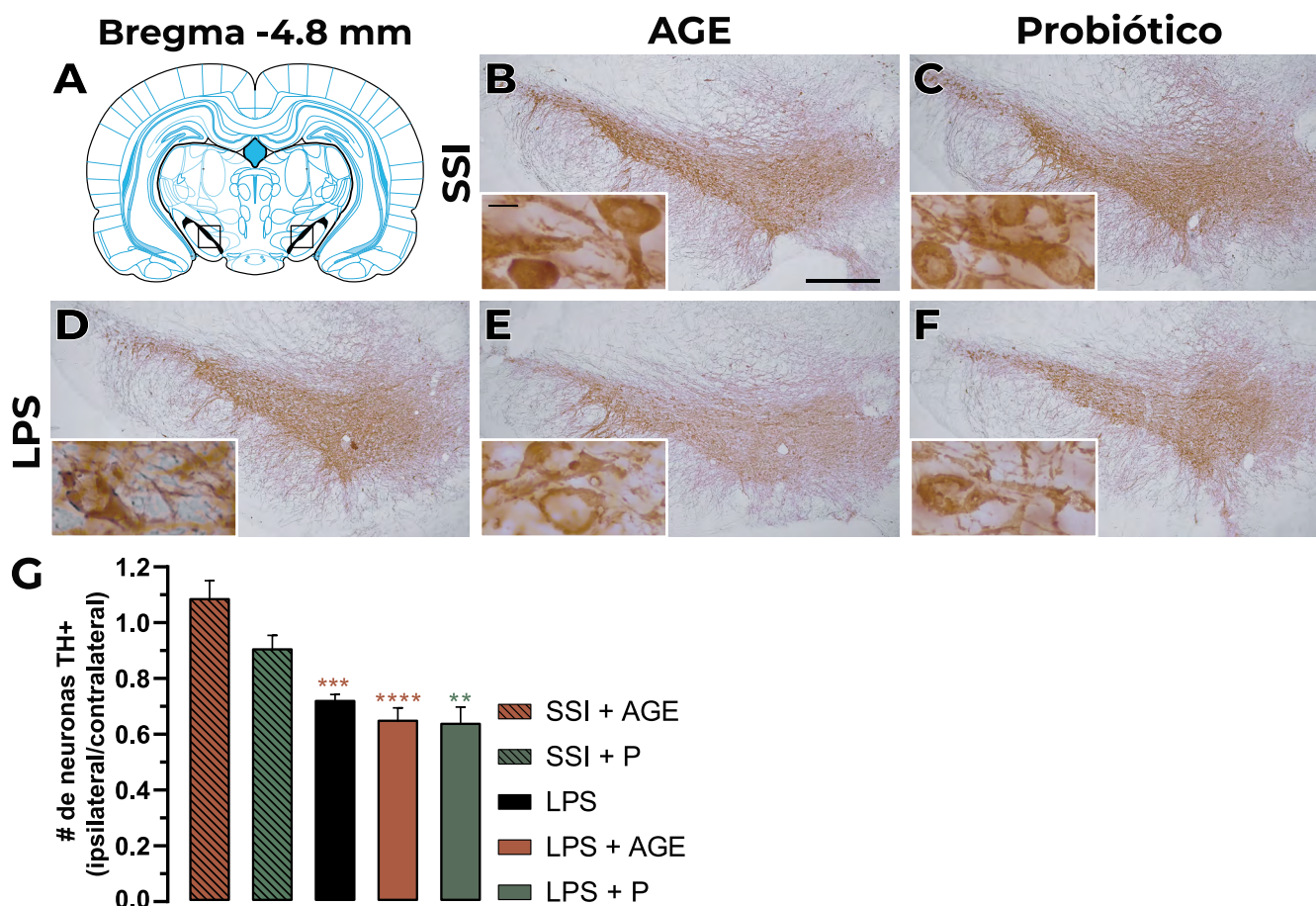


FIGURA 23. EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO CON EL PROBIÓTICO NO PREVIENE LA DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA EN LA SNPC

El tratamiento profiláctico con el probiótico no previene la degeneración dopaminérgica en la SNpc. (A) Un esquema representativo del sitio de evaluación. (B-F) fotomicrografías de secciones nigrales teñidas para TH. (G) El número de neuronas TH⁺ nigral del hemisferio ipsilateral con relación al contralateral. AGE: aceite de girasol + vitamina E; P: probiótico. SSI + AGE, n = 6; SSI + P, n = 6; LPS, n = 6; LPS + AGE, n = 9; LPS + P, n = 11. La línea en la fotografía de menor magnificación (5x) indica 500 micras. La línea en la micrografía de mayor aumento (100x) indica 50 micras. El análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía y una post-Tukey. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$. * vs SSI + AGE, * vs SSI + P.

El el probiótico y aceite de girasol previenen la microgliosis estriatal

La microgliosis se evaluó mediante el conteo de células Iba-1+ en el núcleo estriado. En la **FIGURA 24** se muestra el diagrama de un corte coronal del sitio de evaluación (**A**), así como el panel de microfotografías (**B-F**) del núcleo estriado ipsilateral a 0.84 mm de distancia de bregma. La gráfica (**G**) muestra que el LPS incrementa, al menos, 3 veces el número de células iba-1+ respecto a los grupos control de falsa lesión ($p < 0.0001$). Además, interesantemente los grupos lesionados con LPS, pero administrados oralmente con AGE o P, incrementan alrededor de 2 veces respecto a los controles de SSI (AGE: $p = 0.0006$; P: $p < 0.0001$), esto es: aunque hubo un incremento notable respecto a los controles salinos, la microgliosis no incrementó hasta el nivel en que incrementó en el grupo control lesionado con LPS (LPS vs LPS + AGE: $p = 0.0284$; LPS vs LPS + P: $p = 0.0456$).

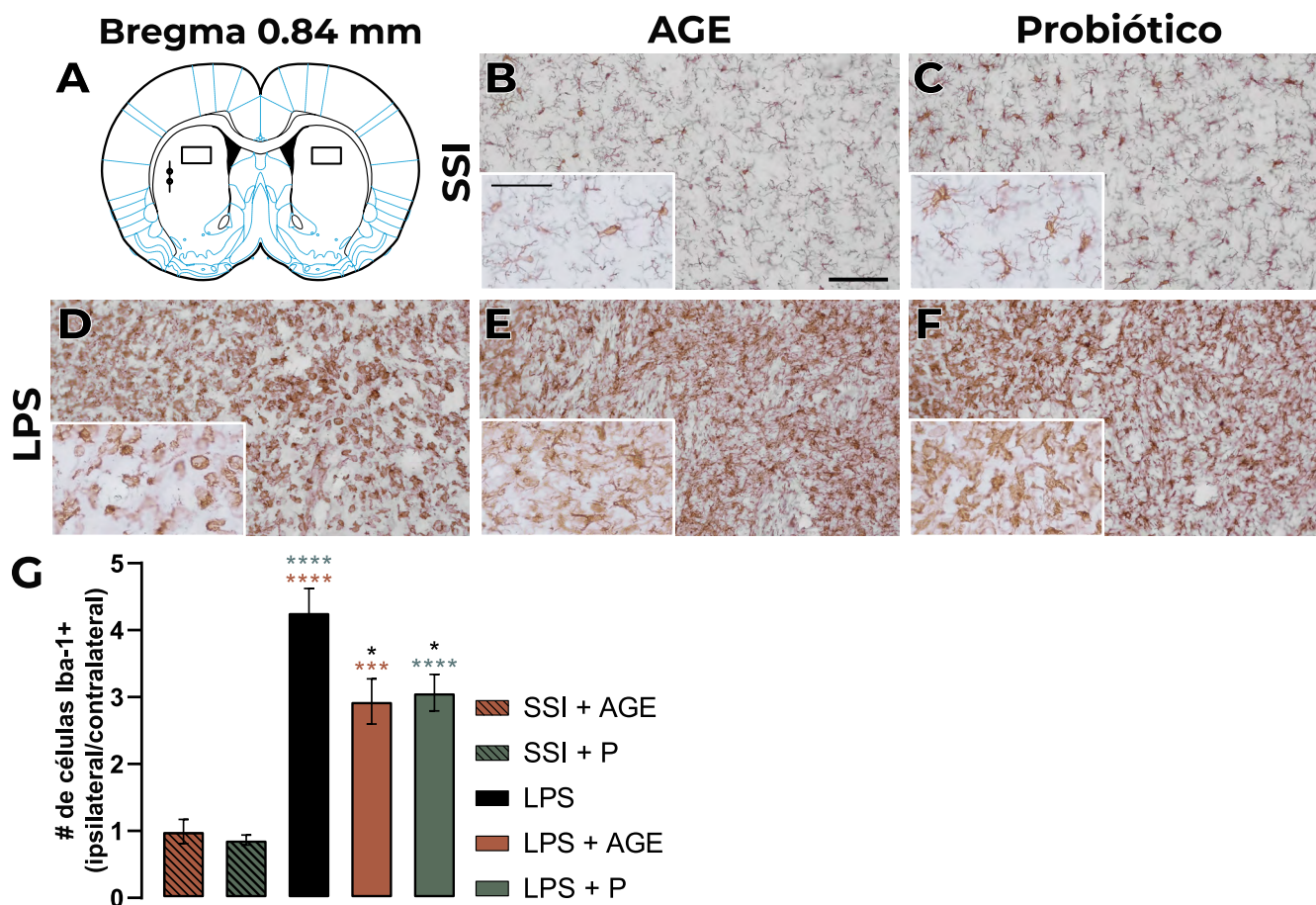


FIGURA 24. EL PROBIÓTICO Y EL ACEITE DE GIRASOL PREVIENEN LA MICROGLIOSIS ESTRIATAL.

(A) Un esquema representativo del sitio de inyección en el cuerpo estriado y el sitio de evaluación. (B-F) fotomicrografías de secciones del cuerpo estriado teñidas para iba-1+. (G) El número de células estriatales iba-1+ del hemisferio ipsilateral con relación al contralateral. AGE: aceite de girasol + vitamina E; P: probiótico. SSI + AGE, $n = 6$; SSI + P, $n = 6$; LPS, $n = 6$; LPS + AGE, $n = 9$; LPS + P, $n = 11$. La línea en la fotografía de menor magnificación (20x) indica 100 micras. La línea en la microfotografía de mayor aumento (40x) indica 50 micras. El análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía y una post-Tukey. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$. * vs LPS * vs SSI + AGE, * vs SSI + P.

El probiótico no modifica la microgliosis en la SNpc

La microgliosis se evaluó mediante el conteo de células Iba1+ en la SNpc. En la **FIGURA 25** se muestra el diagrama del sitio de dicho núcleo cerebral en que se realizó evaluación de la microgliosis en la SNpc ipsilateral -4.8 mm de distancia de bregma (**A**) y el panel de microfotografías de la región de evaluación para la microgliosis (**B-F**). La gráfica (**G**) muestra que el LPS incrementa, al menos, 1 vez el número de células iba-1+ sin importar si se dieron tratamientos con AGE. No obstante, este incremento no es significativo respecto a los grupos controles administrados intracranealmente con SSI.

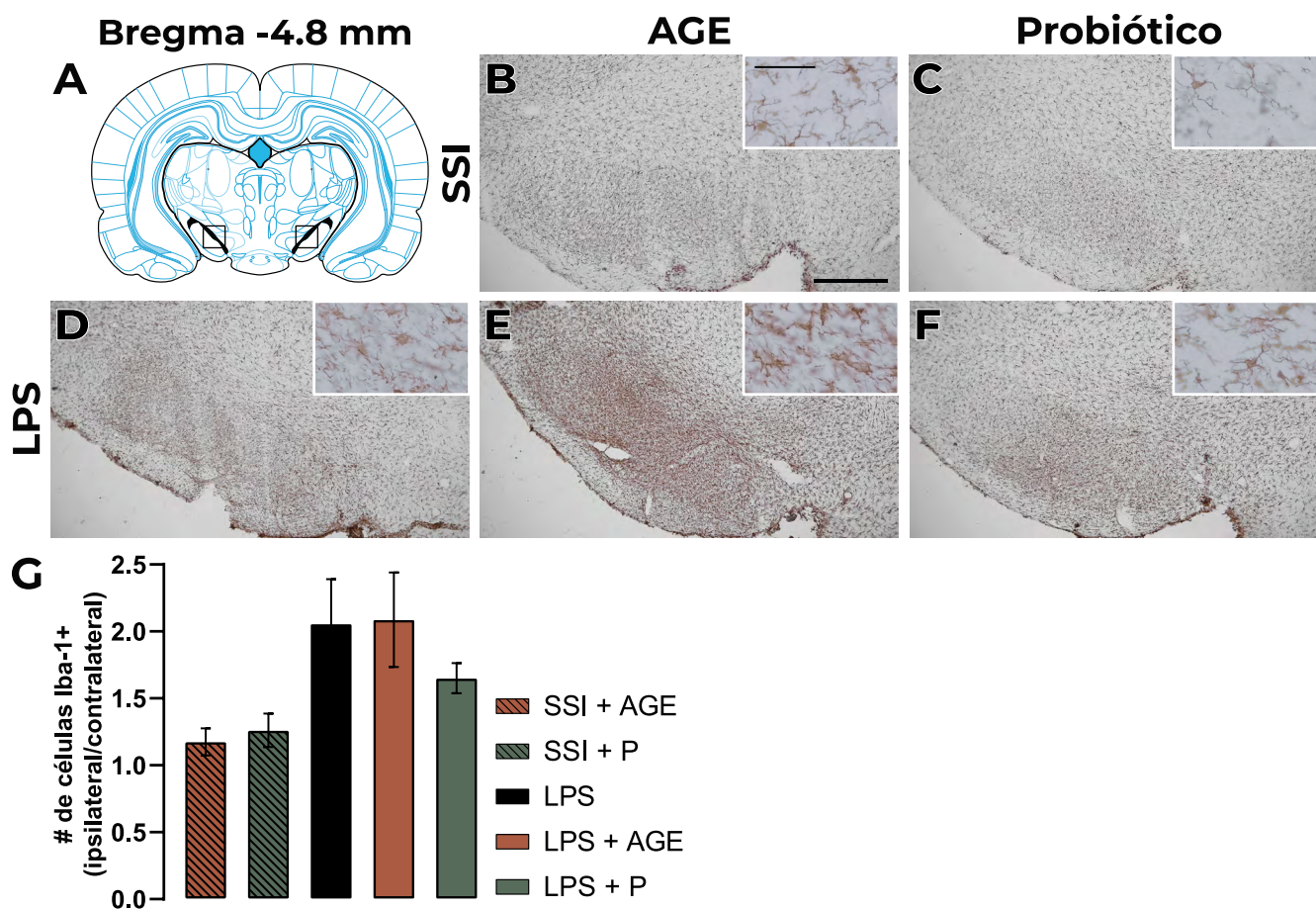


FIGURA 25. EL PROBIÓTICO NI EL ACEITE DE GIRASOL PREVIENEN LA MICROGLIOSIS NIGRAL.

(A) Un esquema representativo del sitio de evaluación en la SNpc. (B-F) fotomicrografías de secciones de la SNpc ipsilateral teñidas para iba-1+. (G) El número de células estriatales iba-1+ del hemisferio ipsilateral con relación al contralateral. AGE: aceite de girasol + vitamina E; P: probiótico. SSI + AGE, n = 6; SSI + P, n = 6; LPS, n = 6; LPS + AGE, n = 9; LPS + P, n = 11. La línea en la fotografía de menor magnificación (5x) indica 500 micras. La línea en la microfotografía de mayor aumento (40x) indica 50 micras. El análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía y una post-Tukey. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM).

El probiótico causa la disminución de las células en estado ameboide y activado en el estriado

En la **FIGURA 26** se muestran las formas que la microglía adopta típicamente en reposo y luego de la activación por diversos estímulos, a saber: ramificada, preparada, activada, ameboide y tipo macrófago (**A**). En las gráficas se obviaron los decrementos de las células ramificadas y preparadas e incrementos de células activadas y ameboides entre los grupos administrados intracranealmente con SSI y LPS ya que el cambio es evidente y, en todos los casos existe una confianza de $p < 0.0001$.

Se muestra que, al analizarse la fracción porcentual de cada morfología, el porcentaje es similar entre controles y entre grupos lesionados con LPS (**B**) y no muestran diferencias estadísticamente significativas. Así mismo, se aprecia que las formas que comúnmente se encuentran en el hemisferio contralateral son las células ramificadas y preparadas patrón que se conserva en los hemisferios ipsilaterales de los grupos a los que se les administró intracranealmente SSI y, además, la relación entre las formas ramificadas o preparadas en ambos hemisferios es cercana a 1 (**C** y **D**). Por otro lado, se observa que el LPS activa fuertemente a las células microgliales tornándolas hacia formas activadas, ameboides y tipo macrófago. Así mismo, como se mostró en la figura anterior, el número de células Iba-1+ disminuyó en los grupos LPS + AGE y LPS + P, en ese sentido, los análisis morfométrico y estadístico indican que el número de células ameboides (**C**: LPS vs LPS + AGE: $p = 0.0291$; LPS vs LPS + P: $p = 0.0002$; **D**: LPS vs LPS + P: $p = 0.0051$) y activadas (**D**: LPS vs LPS + AGE: $p < 0.0001$; LPS vs LPS + P: $p < 0.0001$) son aquellas que disminuyeron en ambos grupos respecto a la cantidad de células Iba-1+ en el grupo LPS. Finalmente, aunque en el análisis morfométrico se encontraron células tipo macrófago, con el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre ningún grupo.

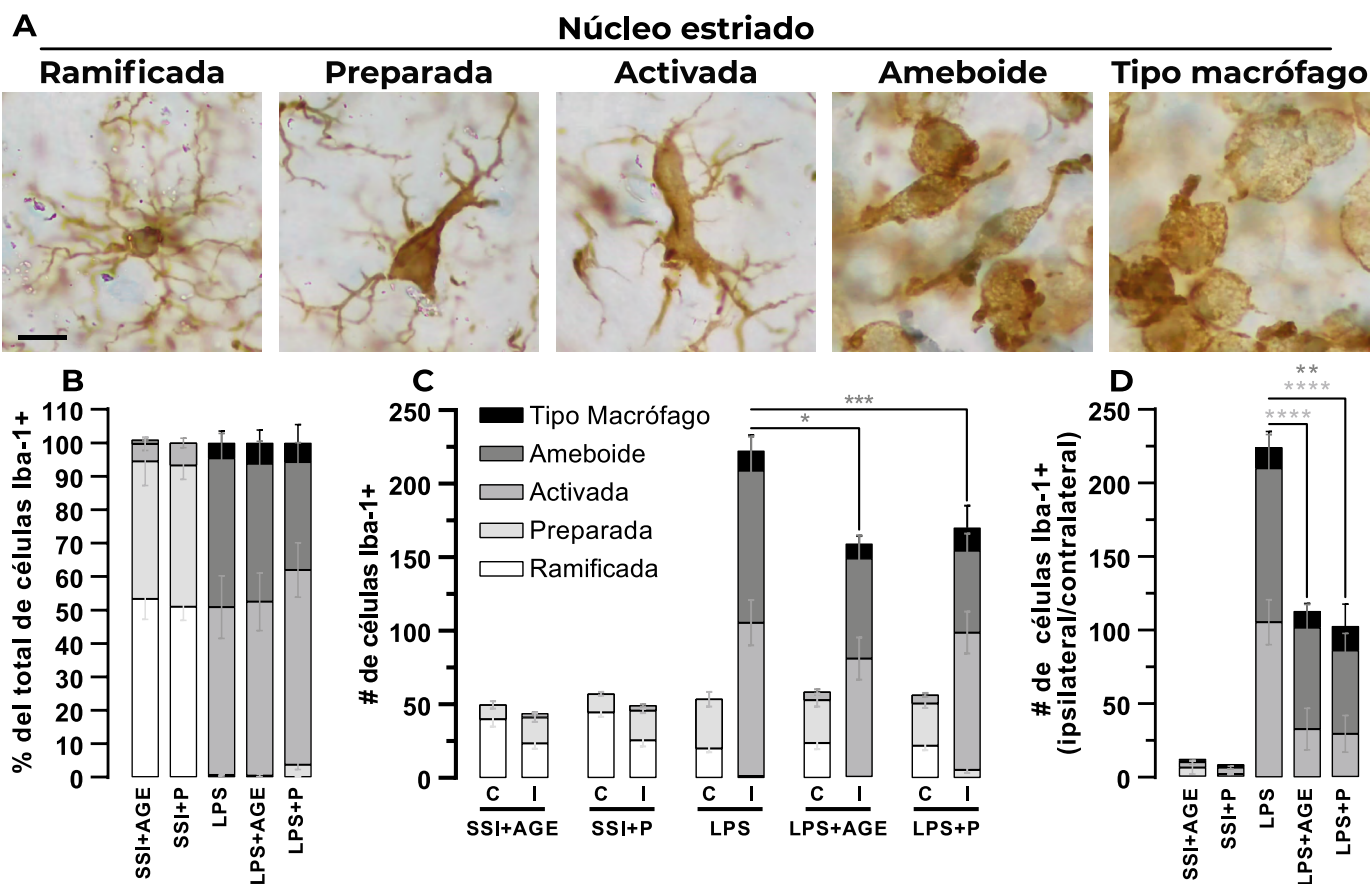


FIGURA 26. PROBIÓTICO CAUSA LA DISMINUCIÓN DE CÉLULAS EN ESTADO AMEBOIDE Y ACTIVADO Y EL ACEITE DE GIRASOL ÚNICAMENTE DE CÉLULAS EN ESTADO ACTIVADO EN EL NÚCLEO ESTRIADO.

El tratamiento profiláctico con el probiótico previene una activación aberrante de la microglía en el cuerpo estriado. (A) Fotomicrografías de la morfología microglial y su clasificación como células ramificadas, preparadas, activadas, ameboides y tipo macrófago en el cuerpo estriado. (B) La fracción porcentual del tipo de morfología celular en el estriado inyectado; el LPS causa una modificación completa de los tipos encontrados en reposo hacia morfologías reactivas. (C) Número total de células Iba-1+ en el cuerpo estriado contralateral e ipsilateral; el AGE y el P previenen el incremento aberrante de células ameboides. (D) Proporción ipsilateral/contralateral del número de células Iba-1+ totales en cuerpo estriado; el probiotico previene el incremento aberrante de morfologías activadas y ameboides, en cambio el AGE, únicamente de las activadas). AGE: Aceite de girasol + vitamina E; C: contralateral; I: ipsilateral. P: probiótico. SSI + AGE, n = 6; SSI + P, n = 6; LPS, n = 6; LPS + AGE, n = 9; LPS + P, n = 11. La línea en la micrografía 10 micras. El análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías y una post-Tukey. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$. * vs ameboide. * vs activada.

El probiótico ni el aceite de girasol modifican los estados de activación generados por el LPS en la SNpc

En la **FIGURA 27** se muestran las formas que la microglía adopta típicamente en reposo y luego de la activación por diversos estímulos, a saber: ramificada, preparada, activada, ameboide y tipo macrófago (**A**). En las gráficas de la fracción porcentual (**B**) entre los grupos administrados intracranalmente con SSI y LPS se aprecian los decrementos de las células ramificadas e incrementos de células activadas con valores de $p < 0.0001$.

Además, las formas que comúnmente se encuentran en el hemisferio contralateral son las células ramificadas y preparadas patrón que se conserva en los hemisferios ipsilaterales de los grupos a los que se les administró intracranalmente SSI y, además, la relación entre las formas ramificadas o preparadas en ambos hemisferios es cercana a 1 (**C** y **D**). Por otro lado, se observa que el LPS activa fuertemente a las células microgliales tornándolas hacia formas activadas y ameboides, aunque el análisis estadístico solo encontró diferencias en el tipo activado. En C las diferencias entre los grupos inyectados con SSI o LPS es evidente y tienen un valor de $p < 0.0001$, por su parte, en D, tiene los valores como sigue: LPS vs SSI + AGE: $p = 0.0195$; LPS vs SSI + P: $p = 0.0153$; SSI + AGE vs LPS + AGE: $p < 0.0001$; SSI + P vs LPS vs P: $p = 0.034$. Finalmente, la activación inflamatoria en la SNpc es menor que en el estriado, ya que, se aprecian células ramificadas y preparadas en las zonas evaluadas de la SNpc ipsilateral de los cerebros de los animales que fueron lesionados con LPS y no se encontraron diferencias entre los grupos a los que se les inyectó LPS .

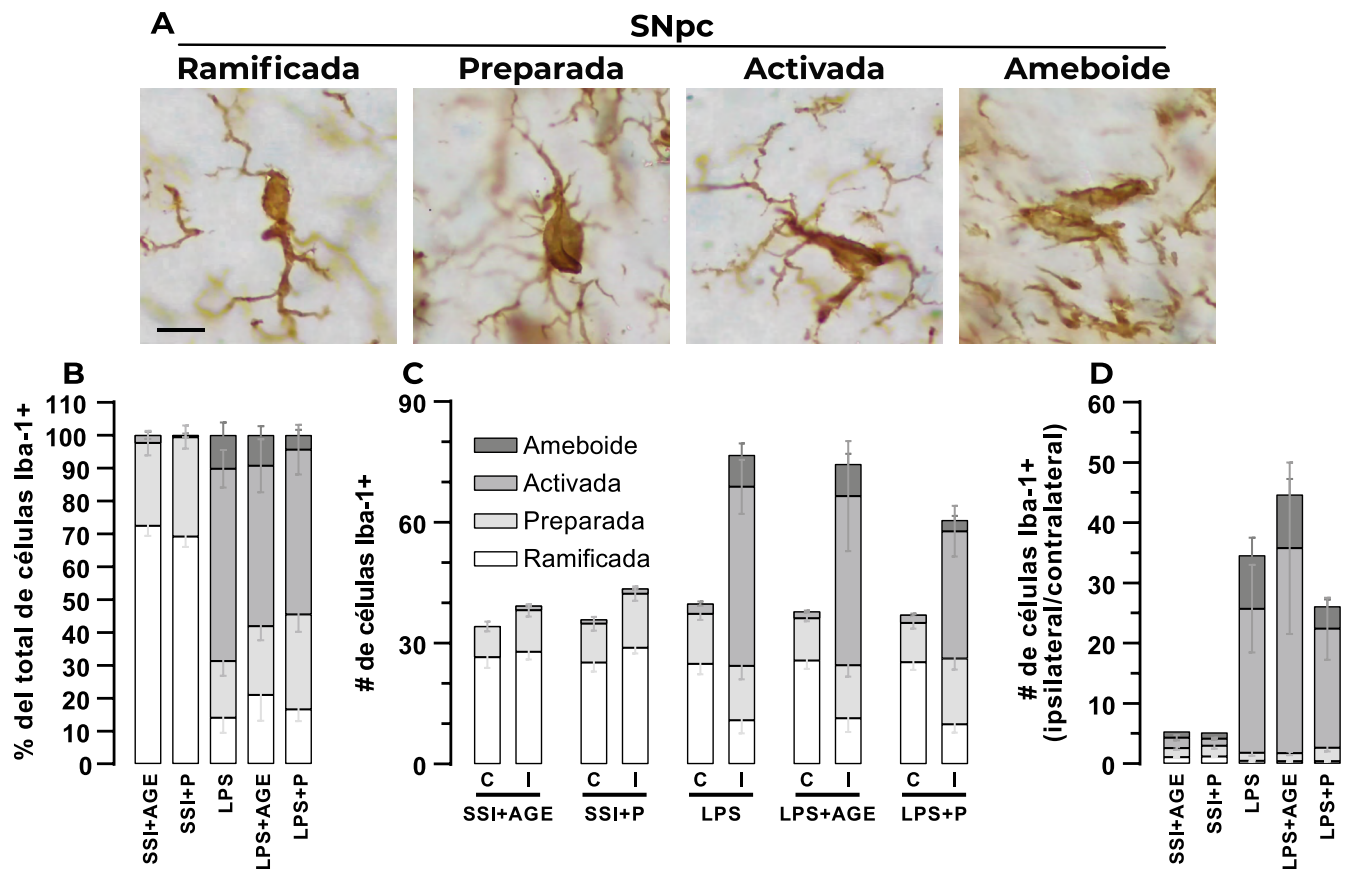
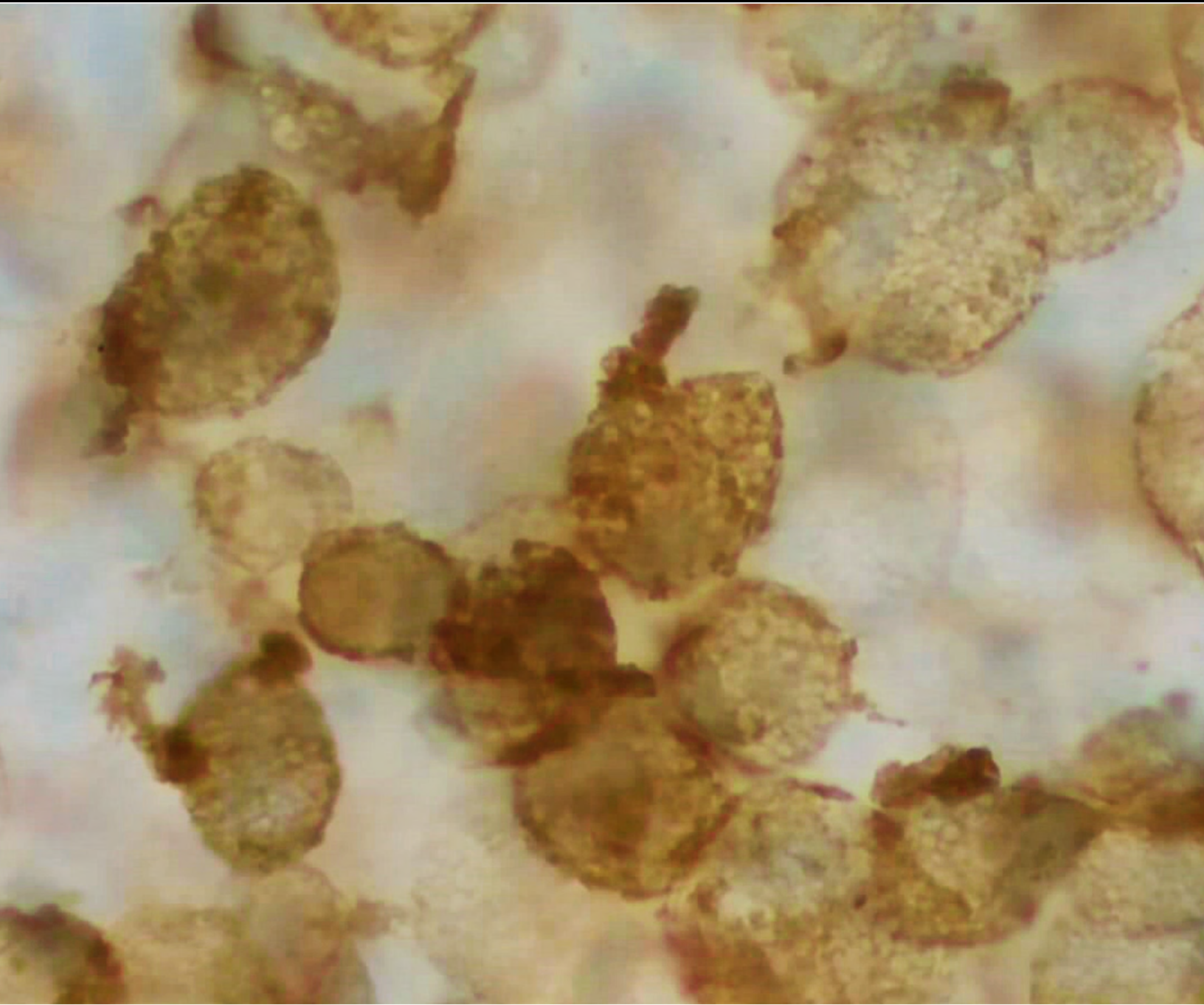


FIGURA 27. EL PROBIÓTICO O EL ACEITE DE GIRASOL NO MODIFICAN LOS ESTADOS DE ACTIVACIÓN GENERADOS POR EL LPS. El tratamiento profiláctico con el probiótico no previene una activación aberrante de la microglía en la SNpc. (A) Fotomicrográficas de la morfología microglial y su clasificación como células ramificadas, preparadas, activadas, ameboides y tipo macrófago en la SNpc. (B) La fracción porcentual del tipo de morfología celular en la SNpc ipsilateral; el LPS causa una modificación completa de los tipos encontrados en reposo hacia morfologías reactivas. (C) Número total de células Iba-1+ en la SNpc contralateral e ipsilateral. (D) Proporción ipsilateral/contralateral del número de células Iba-1+ totales en la SNpc. AGE: Aceite de girasol + vitamina E; C: contralateral; I: ipsilateral. P: probiótico. SSI + AGE, n = 6; SSI + P, n = 6; LPS, n = 6; LPS + AGE, n = 9; LPS + P, n = 11. La línea en la micrografía 10 micras. El análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías y una post-Tukey. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM).

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS



El laboratorio de Neuroquímica ha contribuido con un estudio en la caracterización del modelo experimental parkinsoniano inducido con LPS y a describir la sucesión de eventos celulares luego de la administración de la endotoxina, especialmente sobre el grado de asimetría motora, la pérdida de neuronas positivas a TH en la SNpc y sobre los cambios morfológicos microgliales en la región del núcleo estriado dorsolateral y la SNpc (Parra et al., 2020).

En dicho estudio encontramos que el LPS volvió asimétricos a los animales, esto es: tuvieron un incremento en el uso de la pata ipsilateral 14 dpc. El deterioro motor se asoció a la pérdida de neuronas TH+ en SNpc y parece que el deterioro inicia desde las primeras 24 horas de haber comenzado el proceso neuroinflamatorio. La muerte celular es progresiva y lenta: los animales perdieron el 77% de células 14 dpc. Es probable que la degeneración continúe incluso un mes después de la administración de LPS como se muestra en (Choi et al., 2009) en un modelo semejante al nuestro. Además, mostramos que, si bien, el proceso inflamatorio es severo al inicio, al término del estudio (14 dpc) las células microgliales se van desactivando progresivamente, no obstante, no hay estudios que muestren si esta hipótesis es acertada.

En este contexto se encuentra el modelo inducido con el inflamógeno. En efecto, el LPS causó una franca asimetría motora a los grupos administrados oralmente con AGE y P, de manera semejante al grupo al que se le administró únicamente LPS i.c. (**FIGURA 18**); es decir: *el probiótico no previno la disfunción de la extremidad contralateral a la lesión*. Se pensó, en congruencia con el estudio publicado en 2020 por nuestro laboratorio, que la asimetría generada por el inflamógeno estuviera relacionada con la disminución de las células TH+. **LA FIGURA 23** muestra que es así, el LPS causó una disminución de alrededor del 30% respecto a los grupos controles de falsa lesión. Además, dado que el probiótico no previno la disfunción motora, el resultado obtenido con el conteo de las células TH+ es congruente con el análisis de la simetría motora.

A ese respecto, únicamente existen tres estudios que utilizan modelos parkinsonianos unilaterales, pero son inducidos con 6-OHDA solo que, a diferencia de los resultados que se obtuvieron con este estudio, los animales usan la pata contralateral de manera idéntica a los controles (Castelli et al., 2020), o bien, disminuye el número de rotaciones (Alipour Nosrani et al., 2021; Castelli et al., 2020; Nurrahma et al., 2021). Esta diferencia entre el resultado de estos reportes y el que obtuvimos puede deberse, quizá, a que en ninguno de los estudios se usó ni *L. rhamnosus* ni *Bifidobacterium animales*, aunque sí otras cepas de esas especies. En ese sentido, la única coincidencia que tienen estos estudios es que administran, entre la mezcla de probióticos que cada autor propone, alguna especie de lactobacilo. Independientemente de esta coincidencia y la de disminuir la asimetría motora; la especie animal utilizada, el sitio de inyección del neurotóxico y el régimen de tratamiento son totalmente distintas, por lo que sería válido pensar que el LPS causa más eventos bioquímicos simultáneos en el cerebro y, por tanto, un microambiente más complejo y complicado de proteger como la inducción de muerte de células microgliales por piroptosis y neuronal por necrosis o necroptosis (Parra et al., 2020) que causa que se liberen más inductores inflamatorios en comparación a la 6-OHDA que causa, principalmente muerte celular por apoptosis, o bien, un mayor incremento de células Iba-1+.

Además, dada la diversidad de las mezclas probióticas, sería interesante incluir las especies más utilizadas, a saber: al *L. plantarum*, usado en 5 estudios; al *L. rhamnosus*, administrado en 4 estudios y a la especie *L. acidophilus*, individualmente y en conjunto, ya que se sabe que algunos ácidos grasos de cadena larga, como DHA y el EPA, omega 3 y 6, respectivamente, tienen efectos inhibitorios sobre la producción de citoquinas y se han reportado efectos antiinflamatorios. Asimismo, el KetoC y el HAY, que son ácidos grasos de cadena larga generados por el *L. plantarum*, y se ha reportado que tienen actividad antiinflamatoria en el intestino y cerebro (Ikeguchi et al., 2018). Dirigirse a la **TABLA 2**.

Continuando con esta línea de reflexión, otro par de grupos de investigadores (Hsieh et al., 2020; Srivastav et al., 2019) utilizaron modelos de ratones con parkinsonismo genético o inducido con tóxicos (MPTP y rotenona). Administraron, entre una amplia mezcla de bacterias probióticas, *L. rhamnosus*, por un lado, y *L. rhamnosus* y *B. animalis*, por el otro. Estos modelos desafortunadamente no generan modelos hemiparkinsonianos, por lo que es imposible evaluar la simetría, no obstante, en ambos estudios, la prevención y la protección de las células TH+ en la SNpc es evidente. Además, Srivastav, et al., evaluaron algunos parámetros con cada una de las cepas por separado y los resultados indicaron que el *L. rhamnosus* es la cepa que tiene el papel más relevante en los efectos neuroprotectores en el cerebro, ya que fue el único probiótico que condujo a la regulación positiva de los factores neurotróficos y la DA, aunque no muestran resultados relacionados con las células dopaminérgicas ni conductuales. Finalmente, en ambos estudios, el tratamiento probiótico es superior a las dos semanas que en el presente trabajo propusimos; incluso, el tratamiento continúa luego de la administración de los tóxicos, por lo que, futuros estudios podrían considerar un tratamiento crónico iniciando antes de realizar la cirugía y continuar con este hasta el día de la eutanasia.

Además de estos dos estudios que muestran que la administración de probióticos previene la degeneración dopaminérgica evitando que las células TH+ de la SNpc mueran y que la DA disminuya de la región sináptica, en un par de estudios (Dwyer et al., 2021; Xie & Prasad, 2020) el probiótico no fue capaz de evitar la muerte de las células DAérgicas análogamente a los resultados de esta tesis. La protección neuronal se ve evidenciada a nivel conductual al reducir la asimetría motora en los modelos hemiparkinsonianos y al mejorar la conducta motora como la marcha o la coordinación, incluso, mejorando los movimientos finos como la capacidad para remover cinta adhesiva de la nariz (Castelli et al., 2020; Dwyer et al., 2021; Hsieh et al., 2020; Nurrahma et al., 2021; Perez Visñuk et al., 2020; Srivastav et al., 2019; Sun et al., 2021). Los beneficios también se observan a nivel no motor como se muestra en (Alipour Nosrani et al., 2021; Ishii et al., 2021; Sun et al., 2021; Xie & Prasad, 2020) en donde se pone a prueba a los probióticos frente a procesos de aprendizaje, memoria, ansiedad y depresión (**TABLA 2**).

Es interesante que en el estudio realizado en ratas Sprague-Dawley y lesionado unilateralmente en el MFB en donde se evaluó la ansiedad mediante el laberinto en cruz elevado que tenía 50 cm de altura (Xie & Prasad, 2020), los resultados mostraron que el probiótico, *L. rhamnosus* HA-114, no tiene efectos ansiolíticos ni protege contra la neurodegeneración DAérgica (hecho contradictorio con lo encontrado por (Srivastav et al., 2019) sobre sus hallazgos con el probiótico *L. rhamnosus*, aunque tomando las reservas pertinentes debido a las diferencias entre los protocolos experimentales). Comparando el experimento de Xie & Prasad con lo realizado en esta tesis, en primer lugar usamos un modelo de lesión parcial y progresiva, no completa y aguda, generado con LPS, pero no con 6-OHDA, y tratamos a los sujetos experimentales con una mezcla de dos probióticos que contiene a *L. rhamnosus*. Finalmente y especialmente, aunque no evaluamos la ansiedad, sí se colocó a los animales en una viga que

tiene 100 cm de altura, es posible pensar (teniendo en mente las consideraciones experimentales antedichas) que la altura de la viga podría generar ansiedad en los animales y la lesión con LPS la podría exacerbar y, esto, a su vez, causar afectaciones en el desempeño de la viga, bien, incrementando la intención de cruce para llegar a la caja oscura, un estímulo de seguridad y resguardo, o bien, disminuyendo el empuje de cruce. Sería, pues, interesante evaluar si la mezcla de probióticos utilizada en nuestro estudio tiene capacidades ansiolíticas y, con ello, conocer si tendría alguna relación con algún parámetro evaluado en la viga.

Los trastornos de la marcha son uno de los problemas motores más comunes en la EP que se manifiesta mediante una postura encorvada, un andar de pies pesados y mediante la disminución de la longitud de la zancada y la velocidad general (Berg et al., 2015; Boix et al., 2018; Postuma et al., 2015). Por lo cual, se evaluó, en el modelo de viga elevada, la coordinación, la función motora y la marcha.

Como se trató, trabajar con ciertos parámetros de la marcha resulta ser complicado debido a que las variables pueden verse afectada por diversos factores relacionados con las características físicas de los individuos (edad, peso, altura, longitud de las piernas, etc.) con los que se trabaja. Por ello es relevante que los animales, durante los días de evaluación en la viga, tengan pesos semejantes, con lo cual, se hace innecesaria una normalización de los datos según el peso y, por extensión, el tamaño y edad de los animales (Baker, 2013). Así, al no encontrar diferencias significativas intra grupos en el mismo punto temporal (por ejemplo: LPS + AGE 7 dpc vs LPS + P 7 dpc) el análisis estadístico, únicamente, toma en cuenta los parámetros relacionados con la marcha y su relación con la velocidad (**FIGURA 19A**).

Por otra parte, los animales recorren la viga, en 2 - 4 segundos (**FIGURA 19B**), a una velocidad media que va de los 30 a los 45 cm/s (**FIGURA 19C**) y que, para llegar de un lado a otro, dan entre 7 y 9 zancadas (**FIGURA 19D**) con una longitud entre los 13 y los 16 cm (**FIGURA 22A, B**). Es interesante que, aunque, las medias obtenidas para cada grupo en los diversos parámetros de la marcha se posicionan según el sentido común, es decir, que los animales lesionados tiendan a disminuir la latencia, la velocidad, el número de pasos y a disminuir la longitud de zancadas serían resultados esperados, como aprecian Batka et al., 2014: «la principal desventaja de los análisis no forzados es la incapacidad de garantizar que los sujetos se muevan exactamente a la misma velocidad, además, las variaciones en la velocidad son problemáticas para estandarizar los datos y los rangos intraindividuales e interindividuales suelen ser extremadamente amplios y, dado que diversos parámetros de la marcha dependen de la velocidad, dichos parámetros también muestran una distribución sumamente vasta». Razón por la cual fue muy complicado obtener diferencias estadísticas entre grupos.

La coordinación puede evaluarse mediante el porcentaje de errores de paso, así como la función motora a través de la calificación de los tipos de errores cometidos a lo largo de la viga. En este sentido se aprecia que los animales que cometen más errores son los lesionados con LPS durante el séptimo día de evaluación (**FIGURA 20**). Curiosamente en ese punto temporal el cerebro de los roedores se encuentra en el punto de inflamación más alto, es decir: con un número de células microgliales muy elevado y con el mayor número de células en estado ameboides de todo el curso temporal, como lo demostramos en el estudio publicado en 2020 por el laboratorio de Neuroquímica-BUAP (Parra et al., 2020).

Asimismo, parece natural que los animales a los que se les inyectó SSI tengan valores de la posición de impresión cercanos al cero (**FIGURA 22C**) o que no varíe sobremanera en el transcurso de los días e incluso después de la cirugía ya que no se encuentran lesionados y no modifican su forma de andar (demostrado con la tinción

IHC, el cilindro y la viga (**FIGURA 18, 19, 23**). Por otro lado, parece coherente que los animales lesionados con LPS sin tratamiento oral muestren valores negativos en la evaluación del paso de impresión (**FIGURA 22C**), ya que, esto indicaría una falta de coordinación, es decir, estos animales dan un paso con la extremidad posterior antes de que la anterior haya despegado para dar el siguiente paso, lo cual, causa que el animal se tropiece y cometa más errores. Sin embargo, es interesante que los animales administrados con LPS + AGE y LPS + P incrementen positivamente los valores de la posición de impresión. Este dato se relaciona con la aparente tendencia de disminuirse la longitud de las zancadas y podría mostrar de algún modo que las sustancias administradas oralmente (incluso el AGE) estarían suscitando efectos protectores, principalmente en cuanto al porcentaje de errores que, aunque ligeramente, el AGE causa que la lesión con LPS sea menos agresiva.

Esta protección podría relacionarse con los resultados obtenidos en la microgliosis y la morfometría, ya que, ambos, el AGE y el probiótico disminuyen las células reactivas en el núcleo estriado. Estos resultados son interesantes debido a que el AGE está compuesto por los ácidos oléico y linoléico, ácidos grasos omega 9 y 6, respectivamente que, aunque el primero no puede ser convertido a omega 6 o 3 (porque solo ocurre en plantas), el ácido oleico ha mostrado promover la recuperación de la función motora de las patas traseras y de tener efectos anti-nociceptivos y ansiolíticos después de una lesión en médula ósea (Galán-Arriero et al., 2017) y, por otra parte, el ácido linoléico es un precursor del ácido araquidónico que podrían haberse metabolizado a lipoxinas, moléculas lipídicas que participan fundamentalmente en la resolución de la inflamación, y a prostaglandinas antiinflamatorias (**FIGURA 5**). Además, es bien sabido que las grasas son el componente principal del cerebro y que, en condiciones de exigencia, como al realizar tareas complejas que requieran atención y el uso de la memoria o durante la inflamación, el metabolismo celular incrementa. Asimismo, también es relevante que la microglía en un estado fenotípico antiinflamatorio usa predominantemente a los lípidos para cubrir sus exigencias metabólicas y que los ácidos grasos insaturados (como el oléico y linoléico), inducen el fenotipo antiinflamatorio y probablemente prorresolutivo en la microglía con altas capacidades fagocíticas (Desale & Chinnathambi, 2020; Fumagalli et al., 2018; Kourtzelis et al., 2020). Así, si al efecto causado por el AGE se suman los efectos causados por los probióticos, es posible notar claramente los efectos diferenciales entre los tres grupos lesionados con LPS sobre la coordinación y la diferenciación morfológica de la microglía.

Siguiendo las líneas anteriores, Aono et al., 2017 mostró que la microglía es capaz de compensar la disminución de DA mediante la fagocitosis de sinapsis glutamatérgicas en la SNpr presumiblemente procedentes del núcleo subtalámico que conduciría supresión de neuronas GABAérgicas que, a su vez, aliviarían la sintomatología motora de los animales parkinsonianos, por lo que, estudiar la vía indirecta de la regulación de los ganglios basales, sería una línea interesante por abordar para conocer si los probióticos o el AGE potencian este fenotipo fagocítico prorresolutivo en la SNpr en la que, en el modelo de LPS, la microglía está muy activa (**FIGURA 25**).

Por otra parte, debido a que un estudio mostró que la neurotoxicidad generada por la 6-OHDA puede atrofiar los músculos (y ser restaurado, a su vez, por bacterias probióticas) (Nurrahma et al., 2021), es natural pensar que las unidades motoras no estén funcionando correctamente, es decir, podría pensarse que, por un lado, los ganglios basales están afectados y están afectadas las vías de planeación del movimiento voluntario, pero, a esa afectación, debería aunarse que si los músculos, que es la estructura fundamental en la generación de la fuerza de contracción para iniciar el movimiento, están afectados; así, la marcha, por consecuencia, se verá mermada. Sin embargo, como la ejecución de la marcha no es únicamente un proceso automático y requiere de mecanismo

cognitivos y se ve influenciada por las emociones también es posible que las afectaciones en la marcha como los errores, o bien, la disminución de estos (en el caso de los animales tratados oralmente) sea causada por la protección preventiva a los mecanismos corticales en el desarrollo de la marcha, por ejemplo: los que modulan la atención, o bien, relacionados con las emociones como la ansiedad. El estudio realizado por nosotros, desde luego, está fuera de los alcances de estas especulaciones, pero estas pueden ser el motor para evaluar distintas pruebas conductuales y bioquímicas que evidencien la alteración o protección de estas vías en el modelo utilizado.

Finalmente, se observaron modificaciones significativas en cuanto al ciclo de paso (**FIGURA 21**). En este parámetro se aprecia que los animales lesionados con LPS y que no recibieron tratamiento oral incrementaron el tiempo de soporte respecto a los inyectados con SSI durante 7 dpc, nuevamente, coincidiendo con el punto de inflamación más alto. Esto cobra sentido, ya que, en un ciclo de paso, los cambios más notables al incrementar o disminuir la velocidad es el tiempo de soporte y el tiempo de balanceo tiende a mantenerse relativamente constante en diversos rangos de velocidades (Purves et al., 2018). Es notable, sin embargo, la aparente acción del AGE sobre la modificación del tiempo de soporte en donde se aprecia que, en ambos grupos: LPS + AGE y SSI + AGE, 13 dpc, incrementa el tiempo de soporte, ya que parece que la conducta natural, incluso en los animales lesionados sin tratamiento oral, es disminuir el tiempo de soporte y, debido a que en los grupos referidos, incrementa, el efecto podría ser atribuido al AGE y es esto lo que causa la diferencia estadística entre los grupos LPS + AGE y LPS + P.

Un par de estudios, que giran en torno al modelo de hemiparkinsonismo inducido con 6-OHDA en rata (Boix et al., 2018; Lee et al., 2012), evaluaron los parámetros de la marcha. Son realmente interesantes ya que, en conjunto, se comparan los tres sitios de inyección intracraneal más recurrentes en este tipo de estudios, a saber: estriatal, nigral y MFB. En los modelos de lesión completa, es decir, en los que se inyectó en la SNpc o en el MFB la velocidad, la longitud de zancada y el tiempo de balanceo disminuyeron significativamente y el tiempo de soporte incrementó. En comparación con el modelo de lesión parcial estriatal en el que ningún parámetro se vio modificado incluso 42 días después de la administración del tóxico. En contraste con el estudio de lesión con LPS de esta tesis, el inflamógeno causó modificaciones en la función motora, especialmente en la extremidad ipsilateral posterior, así como un incremento en el tiempo de soporte y, de forma general el ciclo de paso durante el punto temporal 7 dpc. Lo cual muestra la utilidad del modelo de toxicidad y de análisis motor que proponemos visto desde la perspectiva inflamatoria.

Por otra parte, diversos parámetros de la marcha fueron evaluados en tres estudios que usaron al ratón como modelo experimental, bien, administrado con MPTP (Hsieh et al., 2020; Perez Visňuk et al., 2020; Srivastav et al., 2019) o rotenona (Srivastav et al., 2019), o bien, en el modelo transgénico MitoPark. Perez Visňuk et al., 2020 aplicaron un tratamiento de 22 días a partir de la primera administración (de 5 inyecciones) de MPTP y probenecida con una mezcla de *L. plantarum* y dos subespecies de *Streptococcus thermophilus*. Srivastav ofreció un tratamiento profiláctico de 30 días con una mezcla de *L. rhamnosus* GG, *B. animalis* (bacterias utilizadas en este estudio) y *L. acidophilus*. En los modelos inducidos con MPTP o rotenona, el tratamiento profiláctico previno las afectaciones en la longitud de la zancada. Hsieh et al., 2020, por su parte, dio un tratamiento de 16 semanas, a partir de las 8 semanas de vida de los ratones transgénicos, y una mezcla de 7 bacterias probióticas de las especies *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, entre las que incluye a la cepa *rhamnosus*. Los resultados mostraron que la administración diaria de los probióticos evitó los problemas de equilibrio, coordinación y marcha.

Aunque la comparación parece excesiva, en realidad, existe poca bibliografía que haya evaluado la marcha en rata en el contexto de la EP y ninguno ofrece alguna propuesta terapéutica semejante a la realizada en este trabajo (Cendelín et al., 2010; Hsieh et al., 2011; Lee et al., 2012; Vandeputte et al., 2010), por lo que, el estudio que proponemos se encuentra a la vanguardia en cuanto al modelo de lesión, el tratamiento probiótico y la evaluación conductual.

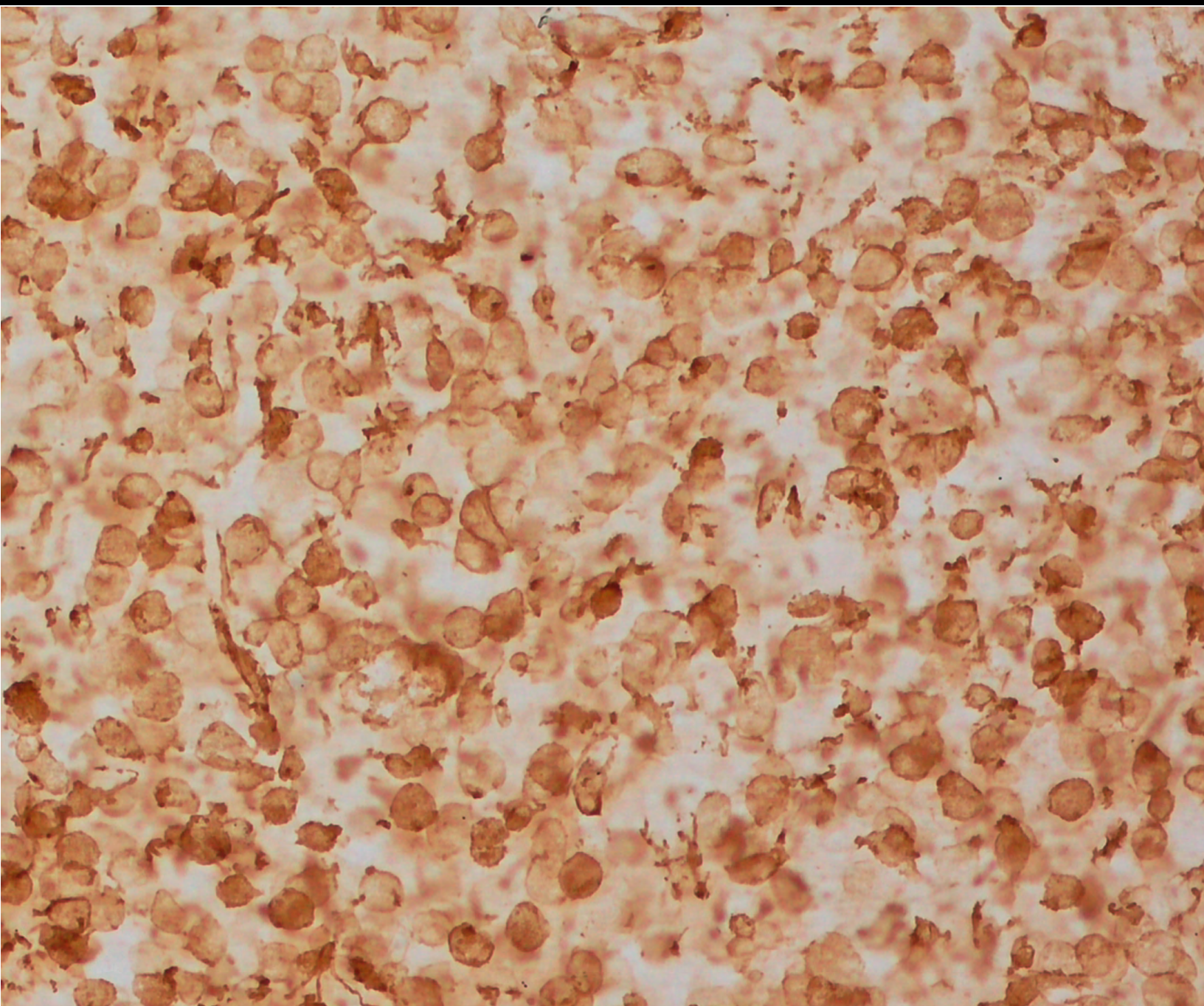
Se sabe que el LPS causa una disminución en la cuenta total de células positivas Iba-1 en el núcleo estriado 24 horas después de su administración. Posiblemente, debido al mecanismo de la endotoxina: interacción con TLR-4, inicio de la cascada de señalización que culmina con la activación del inflamosoma y la producción de preinterleucinas proinflamatorias y muerte microglial por piroptosis para la liberación de las citocinas maduras (Flores-Martinez et al., 2018; Parra et al., 2020). El efecto de esta muerte es la intensificación del proceso inflamatorio que causa la migración de células inmunitarias a partir de núcleos vecinos, posiblemente del torrente sanguíneo y, quizá, proliferación microglial. En estas condiciones y, debido a que Iba-1 es una proteína inespecífica de la microglía y, más bien, específica de macrófagos, 7 y 14 días después de realizada la inyección, existe un incremento de células Iba-1+ en el núcleo estriado y que, de alguna forma, activa a las células Iba-1+ (que asumimos como microgliales) de la SNpc y SNpr (Parra et al., 2020). Además, por los estudios realizados por Choi, et al., (2009) y Hunter et al., (2008; 2007), se sabe que el LPS causa, 3 días posteriores del ingreso al sistema, la disfunción de los complejos I y II de las mitocondrias de la SNpc y del núcleo estriado modificando su forma ultraestructural y su función; lo cual, lleva al incremento de membranas oxidadas y de proteínas nitradas. Además, 7 días después de la inyección de LPS, las células continúan en un estado totalmente activado con lo que se puede afirmar que, en el núcleo estriado, el momento de mayor inflamación tóxica es durante los primeros 7 días después de la administración del LPS y es, en este punto temporal, cuando se muestran las mayores afectaciones en la marcha y la función motora de las extremidades posteriores, aunque en la SNpc es hasta el día 14 en donde se aprecia una activación microglial importante (**FIGURAS 20, 21**).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman que la inyección del LPS en el núcleo estriado inducen una respuesta proinflamatoria severa y muestran novedosamente que los tratamientos aplicados mejoran los trastornos de la marcha y neuroinflamatorios causados por el inflamógeno. Sin embargo, poco sabemos acerca de los mecanismos por los cuales el AGE y el probiótico genera las modificaciones conductuales y a nivel celular en la microglía. Además, debido a la exigua cantidad de reportes y la enorme diversidad de propuestas terapéuticas, de bacterias probióticas y de regímenes de administración resulta difícil proponer mecanismos específicos o responder preguntas sobre ¿Por qué una sola cepa bacteriana es capaz de causar los mismos efectos que una mezcla más compleja? O lo inverso ¿Por qué cierta mezcla de bacterias causa lo que una por sí misma no puede? Así como ¿Por qué las bacterias causan beneficios en un modelo y no en otro? O ¿Existe un metabolito clave que puede causar todos los efectos benéficos o es necesaria la diversidad bacteriana para incrementar la cantidad de metabolitos? No obstante, los estudios realizados por otros autores podrían ser auxiliares para identificar algunos mecanismos clave para proponer mecanismos hipotéticos.

Asumiendo que cierta mezcla de probióticos es capaz de restaurar la microbiota y esta, a su vez, es capaz de producir AGCC, principalmente las bases conjugadas de los ácidos butírico, propílico y acético (Srivastav et al., 2019; Sun et al., 2018); además, puede inducir su activación e inhibir el proceso inflamatorio, un mejor enfrentamiento al estrés antioxidante (Alipour Nosrani et al., 2021; Castelli et al., 2020; Nurrahma et al., 2021; Wang

et al., 2022) y la activación de cascadas de señalización relacionadas con la supervivencia celular y producción de factores de crecimiento (Castelli et al., 2020; Srivastav et al., 2019; Wang et al., 2022). Así como que el LPS es capaz de inducir la expresión de PPAR- γ (Hunter et al., 2008) un factor de transcripción dependiente de ligando involucrado en la neuroinflamación, el estrés oxidativo y el metabolismo energético, que también es capaz de estimular la liberación de neurotrofinas (Carta & Pisanu, 2013; Daynes & Jones, 2002). Se podría pensar que el papel neuroprotector de los probióticos y del AGE (evidenciado en el tiempo de soporte en el grupo LPS + P en el modelo, así como en la disminución de los errores graves mostrados en el presente estudio) está relacionada con la capacidad de los AGCC para promover la modificación de la estructura de la cromatina, tal que, permitan que los factores de transcripción PPAR- γ y Nrf2 induzcan la producción de las proteínas necesarias para hacer frente al proceso inflamatorio y la oxidación mediante la producción de neurotrofinas, la inhibición de factores relacionados con la proinflamación y el refuerzo del sistema antioxidante. Lo cual, desemboca en un proceso inflamatorio menos intenso en los grupos tratados oralmente, pero que, sin duda, los probióticos incrementan la probabilidad de neuroproteger el sistema nervioso, así como de evitar una inflamación exacerbada y tóxica, especialmente en el punto temporal que, según mostramos en otro estudio, la activación microglial es enorme.

10. CONCLUSIONES PERSPECTIVAS



-
- ci.** El probiótico no previene la disfunción de la extremidad anterior contralateral en el cilindro en un modelo de hemiparkinsonismo inducido por la administración estriatal de LPS.
 - cii.** El probiótico previene el agravamiento de la alteración de la marcha de la extremidad posterior contralateral en la viga en un modelo de hemiparkinsonismo inducido por la administración estriatal de LPS.
 - ciii.** El probiótico no protege contra la degeneración dopaminérgica en un modelo de hemiparkinsonismo inducido por la administración estriatal de LPS.
 - civ.** El probiótico y el AGE disminuyen la microgliosis en el núcleo estriado en un modelo de hemiparkinsonismo inducido por la administración estriatal de LPS.
 - cv.** El probiótico y el AGE atenúan la activación exacerbada de la microglía en el núcleo estriado en un modelo de hemiparkinsonismo inducido por la administración estriatal de LPS.
 - cvi.** El probiótico no disminuye la activación exacerbada de la microglía en la SNpc en un modelo de hemiparkinsonismo inducido por la administración estriatal de LPS.
-
- pi.** Extender el tratamiento probiótico.
 - pii.** Ofrecer el tratamiento probiótico posteriormente a la cirugía.
 - piii.** Administrar cepas individuales o mezclas de probióticos más complejas.
 - piv.** Evaluar citocinas de la respuesta inflamatoria y factores tróficos en el cerebro y otros órganos como el intestino, la sangre o el hígado.
 - piv.** Evaluar la diversidad microbiana y metabolitos en las heces.
 - pvi.** Evaluar conductas no motoras como la ansiedad.

11. REFERENCIAS



A

- Abbas, A., K., Lichtman, A., H., & Pillai, S. (2015). *Inmunología Celular y Molecular* (8th ed.). Elsevier.
- Abbott, R. D., Petrovitch, H., White, L. R., Masaki, K. H., Tanner, C. M., Curb, J. D., . . . 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>
- Abdel-Haq, R., Schlachetzki, J. C. M., Glass, C. K., & Mazmanian, S. K. (2019). Microbiome-microglia connections via the gut-brain axis. *J Exp Med*, 216(1), 41-59. <https://doi.org/10.1084/jem.20180794>
- Abenavoli, L., Scarpellini, E., Colica, C., Boccuto, L., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., . . . Capasso, R. (2019). Gut Microbiota and Obesity: A Role for Probiotics. *Nutrients*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/nu11112690>
- Aceves, M., Dietz, V. A., Dulin, J. N., Jeffery, U., & Jeffery, N. D. (2020). An Analysis of Variability in "CatWalk" Locomotor Measurements to Aid Experimental Design and Interpretation. *eNeuro*, 7(4). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0092-20.2020>
- Alipour Nosrani, E., Tamtaji, O. R., Aliboland, Z., Sarkar, P., Ghazanfari, M., Azami Tameh, A., . . . 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. *J Immunoassay Immunochem*, 42(2), 106-120. <https://doi.org/10.1080/15321819.2020.1833917>
- Allbutt, H. N., & Henderson, J. M. (2007). Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods*, 159(2), 195-202. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.07.006>
- Aono, H., Choudhury, M. E., Higaki, H., Miyanishi, K., Kigami, Y., Fujita, K., . . . Tanaka, J. (2017). Microglia may compensate for dopaminergic neuron loss in experimental Parkinsonism through selective elimination of glutamatergic synapses from the subthalamic nucleus. *Glia*, 65(11), 1833-1847. <https://doi.org/10.1002/glia.23199>

B

- Baker, R. (2013). *Measuring walking : a handbook of clinical gait analysis*. Mac Keith Press.
- Batka, R. J., Brown, T. J., Mcmillan, K. P., Meadows, R. M., Jones, K. J., & Haulcomb, M. M. (2014). The need for speed in rodent locomotion analyses. *Anat Rec (Hoboken)*, 297(10), 1839-1864. <https://doi.org/10.1002/ar.22955>
- Berg, D., Postuma, R. B., Adler, C. H., Bloem, B. R., Chan, P., Dubois, B., . . . Deuschl, G. (2015). MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord*, 30(12), 1600-1611. <https://doi.org/10.1002/mds.26431>

- Berg, D., Postuma, R. B., Bloem, B., Chan, P., Dubois, B., Gasser, T., . . . Deuschl, G. (2014). Time to redefine PD? Introductory statement of the MDS Task Force on the definition of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 29(4), 454-462. <https://doi.org/10.1002/mds.25844>
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A. L., Sadoul, R., & Verna, J. M. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 65(2), 135-172. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(01\)00003-x](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(01)00003-x)
- Boix, J., von Hieber, D., & Connor, B. (2018). Gait Analysis for Early Detection of Motor Symptoms in the 6-OHDA Rat Model of Parkinson's Disease. *Front Behav Neurosci*, 12, 39. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00039>
- Brailowsky, S., Knight, R. T., Blood, K., & Scabini, D. (1986). gamma-Aminobutyric acid-induced potentiation of cortical hemiplegia. *Brain Res*, 362(2), 322-330. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90457-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90457-9)
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., . . . Pettersson, S. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med*, 6(263), 263ra158. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009759>
- Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., . . . Weiner, H. L. (2014). Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci*, 17(1), 131-143. <https://doi.org/10.1038/nn.3599>
- Butovsky, O., & Weiner, H. L. (2018). Microglial signatures and their role in health and disease. *Nat Rev Neurosci*, 19(10), 622-635. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0057-5>

C

- Caputa, G., Flachsmann, L. J., & Cameron, A. M. (2019). Macrophage metabolism: a wound-healing perspective. *Immunol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1111/imcb.12237>
- Carta, A. R., & Pisanu, A. (2013). Modulating microglia activity with PPAR- γ agonists: a promising therapy for Parkinson's disease? *Neurotox Res*, 23(2), 112-123. <https://doi.org/10.1007/s12640-012-9342-7>
- Carter, R. J., Morton, J., & Dunnett, S. B. (2001). Motor coordination and balance in rodents. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 8, Unit 8.12. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0812s15>
- Castelli, V., d'Angelo, M., Lombardi, F., Alfonsetti, M., Antonosante, A., Catanesi, M., . . . Cimini, A. (2020). Effects of the probiotic formulation SLAB51 in Aging (Albany NY), 12(5), 4641-4659. <https://doi.org/10.18632/aging.102927>

- Cendelín, J., Voller, J., & Vozeh, F. (2010). Ataxic gait analysis in a mouse model of the olivocerebellar degeneration. *Behav Brain Res*, 210(1), 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.01.035>
- Ceppa, F. A., Izzo, L., Sardelli, L., Raimondi, I., Tunesi, M., Albani, D., & Giordano, C. (2020). Human Gut-Microbiota Interaction in Neurodegenerative Disorders and Current Engineered Tools for Its Modeling. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 297. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00297>
- Choi, D. Y., Liu, M., Hunter, R. L., Cass, W. A., Pandya, J. D., Sullivan, P. G., . . . Bing, G. (2009). Striatal neuroinflammation promotes Parkinsonism in rats. *PLoS One*, 4(5), e5482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005482>
- Choi, D. Y., Zhang, J., & Bing, G. (2010). Aging enhances the neuroinflammatory response and alpha-synuclein nitration in rats. *Neurobiol Aging*, 31(9), 1649-1653. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.09.010>
- Chuang, C. S., Su, H. L., Cheng, F. C., Hsu, S. H., Chuang, C. F., & Liu, C. S. (2010). Quantitative evaluation of motor function before and after engraftment of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Biomed Sci*, 17, 9. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-9>
- Clarke, K. A., & Parker, A. J. (1986). A quantitative study of normal locomotion in the rat. *Physiol Behav*, 38(3), 345-351. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(86\)90105-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(86)90105-8)
- Cox, L. M., & Weiner, H. L. (2018). Microbiota Signaling Pathways that Influence Neurologic Disease. *Neurotherapeutics*, 15(1), 135-145. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0598-8>
- ### D
- Daynes, R. A., & Jones, D. C. (2002). Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 2(10), 748-759. <https://doi.org/10.1038/nri912>
- de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A. I., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol Adv*, 36(8), 2060-2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>
- Desale, S. E., & Chinnathambi, S. (2020). Role of dietary fatty acids in microglial polarization in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 17(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01742-3>
- Doron, S., & Snyderman, D. R. (2015). Risk and safety of probiotics. *Clin Infect Dis*, 60 Suppl 2, S129-134. <https://doi.org/10.1093/cid/civ085>
- Dos Santos, K., Silva Vieira, A. D., Alonso Buriti, F. C., Frutuoso do Nascimento, J. C., Silva de Melo, M. E., Bruno, L. M., . . . Dimitrov Todorov, S. (2015). Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Dairy Science and Technology*, 95, 209-230. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0201-6>
- Dutta, G., Zhang, P., & Liu, B. (2008). The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundam Clin Pharmacol*, 22(5), 453-464. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2008.00616.x>
- Dwyer, Z., Chaiquin, M., Landrigan, J., Ayoub, K., Shail, P., Rocha, J., . . . Hayley, S. (2021). The impact of dextran sodium sulphate and probiotic pre-treatment in a murine model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*, 18(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02062-2>
- ### E
- Ellis, S., Lin, E. J., & Tartar, D. (2018). Immunology of Wound Healing. *Curr Dermatol Rep*, 7(4), 350-358. <https://doi.org/10.1007/s13671-018-0234-9>
- Erny, D., Hrabě de Angelis, A. L., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., . . . Prinz, M. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci*, 18(7), 965-977. <https://doi.org/10.1038/nn.4030>
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., . . . Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci*, 24(3), 312-325. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
- ### F
- Fang, X., Tian, P., Zhao, X., Jiang, C., & Chen, T. (2019). Neuroprotective effects of an engineered commensal bacterium in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine Parkinson disease mouse model via producing glucagon-like peptide-1. *J Neurochem*, 150(4), 441-452. <https://doi.org/10.1111/jnc.14694>
- Flores-Martinez, Y. M., Fernandez-Parrilla, M. A., Ayala-Davila, J., Reyes-Corona, D., Blanco-Alvarez, V. M., Soto-Rojas, L. O., . . . Martinez-Fong, D. (2018). Acute Neuroinflammatory Response in the Substantia Nigra Pars Compacta of Rats after a Local Injection of Lipopolysaccharide. *J Immunol Res*, 2018, 1838921. <https://doi.org/10.1155/2018/1838921>
- Forsyth, C. B., Shannon, K. M., Kordower, J. H., Voigt, R. M., Shaikh, M., Jaglin, J. A., . . . Keshavarzian, A. (2011). Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLoS One*, 6(12), e28032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028032>
- Freire, M. O., & Van Dyke, T. E. (2013). Natural resolution of inflammation. *Periodontol 2000*, 63(1), 149-164. <https://doi.org/10.1111/prd.12034>

Fumagalli, M., Lombardi, M., Gressens, P., & Verderio, C. (2018). How to reprogram microglia toward beneficial functions. *Glia*, 66(12), 2531-2549. <https://doi.org/10.1002/glia.23484>

G

Gage, G. J., Kipke, D. R., & Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp*(65). <https://doi.org/10.3791/3564>

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., . . . Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, 25(3), 486-541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

Galán-Arriero, I., Serrano-Muñoz, D., Gómez-Soriano, J., Goicoechea, C., Taylor, J., Velasco, A., & Ávila-Martín, G. (2017). The role of Omega-3 and Omega-9 fatty acids for the treatment of neuropathic pain after neurotrauma. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1859(9 Pt B), 1629-1635. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2017.05.003>

Gazerani, P. (2019). Probiotics for Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*, 20(17). <https://doi.org/10.3390/ijms20174121>

Ginhoux, F., & Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*, 44(3), 439-449. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024>

Ginhoux, F., Schultze, J. L., Murray, P. J., Ochando, J., & Biswas, S. K. (2016). New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol*, 17(1), 34-40. <https://doi.org/10.1038/ni.3324>

Glajch, K. E., Fleming, S. M., Surmeier, D. J., & Osten, P. (2012). Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*, 230(2), 309-316. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.007>

Goetz, C. G., Tilley, B. C., Shaftman, S. R., Stebbins, G. T., Fahn, S., Martinez-Martin, P., . . . Force, M. D. S. U. R. T. (2008). Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov Disord*, 23(15), 2129-2170. <https://doi.org/10.1002/mds.22340>

Goetze, O., Wiczorek, J., Mueller, T., Przuntek, H., Schmidt, W. E., & Voitalla, D. (2005). Impaired gastric emptying of a solid test meal in patients with Parkinson's disease using ¹³C-sodium octanoate breath test. *Neurosci Lett*, 375(3), 170-173. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.11.007>

Gonzales-Sánchez, F., Azaola, A., Gutierrez-Lopez, G., & Hernandez, H. (2010). Viability of microencapsulated

Bifidobacterium animalis ssp. *lactis* BB12 in kefir during refrigerated storage. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 431-436. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00604.x>

Gordon, S., Plüddemann, A., & Martínez Estrada, F. (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev*, 262(1), 36-55. <https://doi.org/10.1111/imr.12223>

Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S. H., Onai, N., Schraml, B. U., . . . Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol*, 14(8), 571-578. <https://doi.org/10.1038/nri3712>

H

Hamers, F. P., Koopmans, G. C., & Joosten, E. A. (2006). CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 23(3-4), 537-548. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.537>

Harsanyi, J., Buday, T., & Kralova Trancikova, A. (2020). Parkinson's Disease and the Gut: Future Perspectives for Early Diagnosis. *Front Neurosci*, 14, 626. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00626>

Headland, S. E., & Norling, L. V. (2015). The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol*, 27(3), 149-160. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.014>

Heinzel, S., Berg, D., Gasser, T., Chen, H., Yao, C., Postuma, R. B., & Disease, M. T. F. o. t. D. o. P. s. (2019). Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord*, 34(10), 1464-1470. <https://doi.org/10.1002/mds.27802>

Hof, A. L. (1996). Scaling gait data to body size. *Gait & Posture*, 4(3), 22-223. [https://doi.org/10.1016/0966-6362\(95\)01057-2](https://doi.org/10.1016/0966-6362(95)01057-2)

Hsieh, T. H., Chen, J. J., Chen, L. H., Chiang, P. T., & Lee, H. Y. (2011). Time-course gait analysis of hemiparkinsonian rats following 6-hydroxydopamine lesion. *Behav Brain Res*, 222(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.031>

Hsieh, T. H., Kuo, C. W., Hsieh, K. H., Shieh, M. J., Peng, C. W., Chen, Y. C., . . . Chen, H. Y. (2020). Probiotics Alleviate the Progressive Deterioration of Motor Functions in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Brain Sci*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/brainsci10040206>

Huber-Lang, M., Lambris, J. D., & Ward, P. A. (2018). Innate immune responses to trauma. *Nat Immunol*, 19(4), 327-341. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0064-8>

Hunter, R., Ojha, U., Bhurtel, S., Bing, G., & Choi, D. Y. (2017). Lipopolysaccharide-induced functional and structural injury of the mitochondria in the nigrostriatal pathway. *Neurosci Res*, 114, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2016.09.007>

- Hunter, R. L., Cheng, B., Choi, D. Y., Liu, M., Liu, S., Cass, W. A., & Bing, G. (2009). Intrastratial lipopolysaccharide injection induces parkinsonism in C57/B6 mice. *J Neurosci Res*, 87(8), 1913-1921. <https://doi.org/10.1002/jnr.22012>
- Hunter, R. L., Choi, D. Y., Kincer, J. F., Cass, W. A., Bing, G., & Gash, D. M. (2007). Fenbendazole treatment may influence lipopolysaccharide effects in rat brain. *Comp Med*, 57(5), 487-492.
- Hunter, R. L., Choi, D. Y., Ross, S. A., & Bing, G. (2008). Protective properties afforded by pioglitazone against intrastratial LPS in Sprague-Dawley rats. *Neurosci Lett*, 432(3), 198-201. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.12.019>
- Hunter, R. L., Dragicevic, N., Seifert, K., Choi, D. Y., Liu, M., Kim, H. C., . . . Bing, G. (2007). Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. *J Neurochem*, 100(5), 1375-1386. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04327.x>
- I**
- Ikeguchi, S., Izumi, Y., Kitamura, N., Kishino, S., Ogawa, J., Akaike, A., & Kume, T. (2018). Inhibitory effect of the gut microbial linoleic acid metabolites, 10-oxo-trans-11-octadecenoic acid and 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, on BV-2 microglial cell activation. *J Pharmacol Sci*, 138(1), 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.06.015>
- Immunopedia. (2022). <https://www.immunopaedia.org.za/>
- Ishii, T., Furuoka, H., Kaya, M., & Kuhara, T. (2021). Oral Administration of Probiotic. *Biomedicines*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020167>
- J**
- Jankovic, J., & Tan, E. K. (2020). Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 91(8), 795-808. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-322338>
- K**
- Kelly, J. R., Kennedy, P. J., Cryan, J. F., Dinan, T. G., Clarke, G., & Hyland, N. P. (2015). Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Front Cell Neurosci*, 9, 392. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00392>
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol Rev*, 91(2), 461-553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*, 77(1), 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>
- Klann, E. M., Dissanayake, U., Gurralla, A., Farrer, M., Shukla, A. W., Ramirez-Zamora, A., . . . Vedam-Mai, V. (2021). The Gut-Brain Axis and Its Relation to Parkinson's Disease: A Review. *Front Aging Neurosci*, 13, 782082. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.782082>
- Koopmans, G. C., Deumens, R., Brook, G., Gerver, J., Honig, W. M., Hamers, F. P., & Joosten, E. A. (2007). Strain and locomotor speed affect over-ground locomotion in intact rats. *Physiol Behav*, 92(5), 993-1001. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.07.018>
- Kourtzelis, I., Hajishengallis, G., & Chavakis, T. (2020). Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation. *Front Immunol*, 11, 553. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00553>
- L**
- LeBlanc, J. G., Chain, F., Martín, R., Bermúdez-Humarán, L. G., Courau, S., & Langella, P. (2017). Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microb Cell Fact*, 16(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0691-z>
- Lee, H. Y., Hsieh, T. H., Liang, J. I., Yeh, M. L., & Chen, J. J. (2012). Quantitative video-based gait pattern analysis for hemiparkinsonian rats. *Med Biol Eng Comput*, 50(9), 937-946. <https://doi.org/10.1007/s11517-012-0933-5>
- Lee, S. W., Gajavelli, S., Spurlock, M. S., Andreoni, C., de Rivero Vaccari, J. P., Bullock, M. R., . . . Dietrich, W. D. (2018). Microglial Inflammation Activation in Penetrating Ballistic-Like Brain Injury. *J Neurotrauma*. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5530>
- Li, Q., & Barres, B. A. (2018). Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*, 18(4), 225-242. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.125>
- Liu, M., & Bing, G. (2011). Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*, 2011, 327089. <https://doi.org/10.4061/2011/327089>
- M**
- Madel, M. B., Ibáñez, L., Wakkach, A., de Vries, T. J., Teti, A., Apparailly, F., & Blin-Wakkach, C. (2019). Immune Function and Diversity of Osteoclasts in Normal and Pathological Conditions. *Front Immunol*, 10, 1408. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01408>
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). *Brock. Biology of Microorganisms* (15th ed.). Pearson.
- Mahlknecht, P., Seppi, K., & Poewe, W. (2015). The Concept of Prodromal Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis*, 5(4), 681-697. <https://doi.org/10.3233/JPD-150685>

- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25(12), 677-686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- Markowiak-Kopeć, P., & Śliżewska, K. (2020). The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/nu12041107>
- Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, 6, 13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>
- McFarland, L. V. (2014). Use of probiotics to correct dysbiosis of normal microbiota following disease or disruptive events: a systematic review. *BMJ Open*, 4(8), e005047. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-005047>
- McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E., & McGeer, E. G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38(8), 1285-1291.
- Minato, T., Maeda, T., Fujisawa, Y., Tsuji, H., Nomoto, K., Ohno, K., & Hirayama, M. (2017). Progression of Parkinson's disease is associated with gut dysbiosis: Two-year follow-up study. *PLoS One*, 12(11), e0187307. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187307>
- Mirelman, A., Shema, S., Maidan, I., & Hausdorff, J. M. (2018). *Gait. Handb Clin Neurol*, 159, 119-134. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63916-5.00007-0>
- Miyaniishi, 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. *Neurochem Int*, 122, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.11.005>
- Morris, M. E., Iansek, R., Matyas, T. A., & Summers, J. J. (1994). The pathogenesis of gait hypokinesia in Parkinson's disease. *Brain*, 117 (Pt 5), 1169-1181. <https://doi.org/10.1093/brain/117.5.1169>
- Morris, M. E., Iansek, R., Matyas, T. A., & Summers, J. J. (1996). Stride length regulation in Parkinson's disease. Normalization strategies and underlying mechanisms. *Brain*, 119 (Pt 2), 551-568. <https://doi.org/10.1093/brain/119.2.551>
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., . . . Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308(5726), 1314-1318. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>
- NOM-062-ZOO-1999. (1999). Norma oficial mexicana para el manejo de animales en el laboratorio. In.
- Nurrahma, B. A., Tsao, S. P., Wu, C. H., Yeh, T. H., Hsieh, P. S., Panunggal, B., & Huang, H. Y. (2021). Probiotic Supplementation Facilitates Recovery of 6-OHDA-Induced Motor Deficit via Improving Mitochondrial Function and Energy Metabolism. *Front Aging Neurosci*, 13, 668775. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.668775>

O

Ohms, M., Möller, S., & Laskay, T. (2020). An Attempt to Polarize Human Neutrophils Toward N1 and N2 Phenotypes. *Front Immunol*, 11, 532. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00532>

Olveira, G., & González-Molero, I. (2016). An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition. *Endocrinol Nutr*, 63(9), 482-494. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2016.07.006>

Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*, 173(4), 649-665. <https://doi.org/10.1111/bph.13139>

Ortega-Gómez, A., Perretti, M., & Soehnlein, O. (2013). Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med*, 5(5), 661-674. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202382>

Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., & Jones, P. P. (2014). *Kuby. Inmunología* (M. G. Hill, Ed. 7° ed.).

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. *Neurotox Res*, 37(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00104-z>

P

Parra-Paz, V. G., Calderón-Sauri, A., Granados-Patrón, D., Cuevas-Carbonell, S. G., García-López, D., Dawn-Ojeda, A., . . . Góngora-Alfaro, J. L. (2021). Chronic feeding with 3% dried raw blueberries (*V. corymbosum*) reduces apomorphine-induced rotations and striatal dopaminergic loss in hemiparkinsonian rats. *Food Res Int*, 140, 110066. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110066>

Pavón-Romero, L., Jimenez-Martínez, M. C., & Garcés Álvarez, M. E. (2021). *Inmunología molecular, celular y traslacional* (2° ed.).

N

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2019). *Lehninger. Principios de Bioquímica* (Omega, Ed. Séptima ed.).

- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain. In stereotaxic coordinates*. Press.
- Perez Visñuk, D., Savoy de Giori, G., LeBlanc, J. G., & de Moreno de LeBlanc, A. (2020). Neuroprotective effects associated with immune modulation by selected lactic acid bacteria in a Parkinson's disease model. *Nutrition*, 79-80, 110995. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110995>
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., . . . Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17013. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Postuma, R. B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C. W., Oertel, W., . . . Deuschl, G. (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*, 30(12), 1591-1601. <https://doi.org/10.1002/mds.26424>
- Prinz, M., Erny, D., & Hagemeyer, N. (2017). Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nat Immunol*, 18(4), 385-392. <https://doi.org/10.1038/ni.3703>
- Purves, D., Augustine, G., j., Fitzpatrick, D., Hall, W., C., LaMantia, A.-S., Mooney, R., D., . . . White, L., E. (2018). *Neuroscience (Sixth ed.)*. Oxford University Press.
- R**
- Rea, K., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). The microbiome: A key regulator of stress and neuroinflammation. *Neurobiol Stress*, 4, 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.03.001>
- Rodriguez-Violante, M., Velásquez-Pérez, L., & Cervantes-Arriaga, A. (2019). Incidence rates of Parkinson's disease in Mexico: Analysis of 2014-2017 statistic. *Revista mexicana de neurociencia*, 20(3), 136-140. <https://doi.org/10.24875/RMN.M19000043>
- Russell, W. R., Hoyles, L., Flint, H. J., & Dumas, M. E. (2013). Colonic bacterial metabolites and human health. *Curr Opin Microbiol*, 16(3), 246-254. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.07.002>
- S**
- Saijo, K., & Glass, C. K. (2011). Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 11(11), 775-787. <https://doi.org/10.1038/nri3086>
- Salama, A., Ibrahim, W., Tousson, E., Sakr, S., Masoud, M., Akela, . . . M., E.-R. (2015). Epigenetic study of Parkinson's Disease in experimental animal model. *International journal of clinical and experimental neurology*, 3(1), 11-20.
- Schallert, T., Fleming, S. M., Leasure, J. L., Tillerson, J. L., & Bland, S. T. (2000). CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*, 39(5), 777-787. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(00\)00005-8](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(00)00005-8)
- Schallert, T., & Tillerson, J. L. (2000). Intervention Strategies for Degeneration of Dopamine Neurons in Parkinsonism. In E. D.F., D. a. R.L., & S. P.R. (Eds.), *Central Nervous System Diseases. Contemporary Neuroscience* (pp. 131-151). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-691-1_8
- Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P. A., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., . . . Auvinen, P. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord*, 30(3), 350-358. <https://doi.org/10.1002/mds.26069>
- Schif-Zuck, S., Gross, N., Assi, S., Rostoker, R., Serhan, C. N., & Ariel, A. (2011). Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids. *Eur J Immunol*, 41(2), 366-379. <https://doi.org/10.1002/eji.201040801>
- Serhan, C. N., Brain, S. D., Buckley, C. D., Gilroy, D. W., Haslett, C., O'Neill, L. A., . . . Wallace, J. L. (2007). Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J*, 21(2), 325-332. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7227rev>
- Serhan, C. N., Chiang, N., Dalli, J., & Levy, B. D. (2014). Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(2), a016311. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016311>
- Serhan, C. N., Yang, R., Martinod, K., Kasuga, K., Pillai, P. S., Porter, T. F., . . . Spite, M. (2009). Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *J Exp Med*, 206(1), 15-23. <https://doi.org/10.1084/jem.20081880>
- Sochocka, M., Diniz, B. S., & Leszek, J. (2017). Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol Neurobiol*, 54(10), 8071-8089. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0297-1>
- Srivastav, S., Neupane, S., Bhurtel, S., Katila, N., Maharjan, S., Choi, H., . . . Choi, D. Y. (2019). Probiotics mixture increases butyrate, and subsequently rescues the nigral dopaminergic neurons from MPTP and rotenone-induced neurotoxicity. *J Nutr Biochem*, 69, 73-86. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.03.021>
- Stern, E. L., Quan, N., Proescholdt, M. G., & Herkenham, M. (2000). Spatiotemporal induction patterns of cytokine and related immune signal molecule mRNAs in response to intrastriatal injection of lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol*, 109(2), 245-260.
- Suganya, K., & Koo, B. S. (2020). Gut-Brain Axis: Role of Gut Microbiota on Neurological Disorders and How Probiotics/Prebiotics Beneficially Modulate Microbial and Immune Pathways to Improve Brain Functions. *Int J Mol Sci*, 21(20). <https://doi.org/10.3390/ijms21207551>

Sugimoto, M. A., Sousa, L. P., Pinho, V., Perretti, M., & Teixeira, M. M. (2016). Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front Immunol*, 7, 160. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00160>

Sun, J., Li, H., Jin, Y., Yu, J., Mao, S., Su, K. P., . . . Liu, J. (2021). Probiotic *Clostridium butyricum* ameliorated motor deficits in a mouse model of Parkinson's disease via gut microbiota-GLP-1 pathway. *Brain Behav Immun*, 91, 703-715. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.10.014>

Sun, M. F., Zhu, Y. L., Zhou, Z. L., Jia, X. B., Xu, Y. D., Yang, Q., . . . Shen, Y. Q. (2018). Neuroprotective effects of fecal microbiota transplantation on MPTP-induced Parkinson's disease mice: Gut microbiota, glial reaction and TLR4/TNF- α signaling pathway. *Brain Behav Immun*, 70, 48-60. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.02.005>

Sweis, B. M., Bachour, S. P., Brekke, J. A., Gewirtz, J. C., Sadeghi-Bazargani, H., Hevesi, M., & Divani, A. A. (2016). A modified beam-walking apparatus for assessment of anxiety in a rodent model of blast traumatic brain injury. *Behav Brain Res*, 296, 149-156. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.09.015>

T

Takakusaki, K. (2017). Functional Neuroanatomy for Posture and Gait Control. *J Mov Disord*, 10(1), 1-17. <https://doi.org/10.14802/jmd.16062>

Tan, A. H., Mahadeva, S., Thalha, A. M., Gibson, P. R., Kiew, C. K., Yeat, C. M., . . . Lim, S. Y. (2014). Small intestinal bacterial overgrowth in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 20(5), 535-540. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2014.02.019>

Tieu, K. (2011). A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1(1), a009316. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009316>

Tillerson, J. L., Cohen, A. D., Philhower, J., Miller, G. W., Zigmond, M. J., & Schallert, T. (2001). Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine. *J Neurosci*, 21(12), 4427-4435.

Torres-Platas, S. G., Comeau, S., Rachalski, A., Bo, G. D., Cruceanu, C., Turecki, G., . . . Mechawar, N. (2014). Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *J Neuroinflammation*, 11, 12. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-12>

Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2017). *Principles of Anatomy and Physiology* (Wiley, Ed. 15 th ed.).

V

Vandeputte, C., Taymans, J. M., Casteels, C., Coun, F., Ni, Y., Van Laere, K., & Baekelandt, V. (2010). Automated quantitative gait analysis in animal models of movement disorders. *BMC Neurosci*, 11, 92. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-92>

W

Walker, D. G., & Lue, L. F. (2015). Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimers Res Ther*, 7(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s13195-015-0139-9>

Wang, L., Zhao, Z., Zhao, L., Zhao, Y., Yang, G., Wang, C., . . . Li, S. (2022). DP189 Reduces α -SYN Aggravation in MPTP-Induced Parkinson's Disease Mice via Regulating Oxidative Damage, Inflammation, and Gut Microbiota Disorder. *J Agric Food Chem*, 70(4), 1163-1173. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07711>

Wang, L. D., & Wagers, A. J. (2011). Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(10), 643-655. <https://doi.org/10.1038/nrm3184>

Willemsen, L. E., Koetsier, M. A., van Deventer, S. J., & van Tol, E. A. (2003). Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts. *Gut*, 52(10), 1442-1447. <https://doi.org/10.1136/gut.52.10.1442>

X

Xie, C., & Prasad, A. A. (2020). Probiotics Treatment Improves Hippocampal Dependent Cognition in a Rodent Model of Parkinson's Disease. *Microorganisms*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111661>

Y

Yao, C., & Narumiya, S. (2019). Prostaglandin-cytokine crosstalk in chronic inflammation. *Br J Pharmacol*, 176(3), 337-354. <https://doi.org/10.1111/bph.14530>

Z

Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res*, 30(6), 492-506. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>

Çamcı, G., & Oğuz, S. (2016). Association between Parkinson's Disease and *Helicobacter Pylori*. *J Clin Neurol*, 12(2), 147-150. <https://doi.org/10.3988/jcn.2016.12.2.147>

12. ANEXOS



Neuroprotective and immunomodulatory effects of probiotics in a rat model of Parkinson's disease

Authors: Irving Parra¹, Isabel Martínez¹, Lizbeth Vásquez Celaya², Jose L. Gongora-Alfaro²,
Yousef Tizabi³ and Liliana Mendieta^{1*}

¹Laboratorio de Neuroquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

²Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán, México

³Department of Pharmacology, Howard University College of Medicine, Washington DC, USA

*Corresponding author:

Liliana Mendieta, Ph.D.

Laboratorio de Neuroquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 14 Sur y Av. San Claudio CU, Col. San Manuel, 72570 Puebla, México.
Tel.: (52) 222 29 55 00 ext. 2814

E-mail: liliana.martinezmen@correo.buap.mx

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Abstract

It is now well recognized that a bidirectional relationship between gut microbiota and the brain referred to as the gut-brain axis plays a prominent role in maintaining homeostasis, and that a disruption in this axis can result in neuroinflammatory response and neurological disorders such as Parkinson's disease (PD). Protective action of probiotics such as *Bifidobacterium animalis ssp lactis Bb12* and *Lactobacillus rhamnosus GG* in various animal models of PD have been reported. Therefore, in this study, we used an inflammatory model of PD to assess the effects of a combination of these two probiotics (Microbiot®) on motor behavior as well as on the response of microglia, including microglia morphology, to gain a better understanding of their mechanism of action. Microbiot® (300 µL) was administered orally once daily for 15 days in a lipopolysaccharide (LPS)-induced PD model using male Wistar rats. Although LPS-induced motor asymmetry in cylinder test was not affected by Microbiot®, impairment of motor coordination in the narrow-beam test was significantly reduced by this probiotic. Moreover, Microbiot® treatment reduced microglial activation suggesting an anti-inflammatory effect. While further mechanistic investigations of Microbiot® in neurodegenerative diseases is warranted, our results support potential utility of probiotics in PD.

Keywords: Probiotics, *Bifidobacterium animalis*; *Lactobacillus rhamnosus*; Lipopolysaccharide; Microglia; Inflammation, Hemiparkinsonism

Créditos y detalles de las imágenes.

PORTADAS: PRINCIPAL: CÁMARA DE CELULAR HUAWEI P30 LITE 21.JUNIO.2021; AGRADECIMIENTOS: CÁMARA DE CELULAR HUAWEI P30 LITE 06.MARZO.2021; PROLEGÓMENOS: MICROSCOPIO AXIOLAB 5 CARL ZEISS, CÁMARA AXIOCAM 208 COLOR, AUMENTO A 40X; INTRODUCCIÓN: MICROSCOPIO AXIOLAB 5 CARL ZEISS, CÁMARA AXIOCAM 208 COLOR, AUMENTO A 20X; JUSTIFICACIÓN: MICROSCOPIO AXIOLAB 5 CARL ZEISS, CÁMARA AXIOCAM 208 COLOR, AUMENTO A 100X; HIPÓTESIS Y OBJETIVOS: MICROSCOPIO AXIOLAB 5 CARL ZEISS, CÁMARA AXIOCAM 208 COLOR, AUMENTO A 20X; DIAGRAMA DE TRABAJO: MICROSCOPIO LEICA DM1000, AUMENTO A 40X, 18.SEPTIEMBRE.2020; METODOLOGÍA: CÁMARA DE CELULAR HUAWEI P30 LITE 09.MAYO.2021; RESULTADOS: CAPTURAS DE FOTOGRAFÍAS DE UN VIDEO CAPTURADO POR UNA CÁMARA CANON VIXIA HF R800, SUPERIOR 22.MAYO.21 E INFERIOR 18.MARZO.21; CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS: PÍO DEL RÍO HORTEGA, TOMADA DE DEL RÍO-HORTEGA BERECIARTU J. PÍO DEL RÍO-HORTEGA: THE REVOLUTION OF GLIA. ANAT REC (HOBOKEN). 2020 MAY;303(5):1232-1241. doi: 10.1002/ar.24266. EPUB 2019 Oct 18. PMID: 31525279. DIBUJOS DE DEL RÍO-HORTEGA, TOMADO DE DEL RÍO-HORTEGA, P. (1920). EL "TERCER ELEMENTO" DE LOS CENTROS NERVIOSOS. HISTOGENESIS Y EVOLUCIÓN NORMAL; ÉXODO Y DISTRIBUCIÓN REGIONAL DE LA MICROGLÍA. BOL. SOC. ESP. BIOL. **RATA AISLADA EN LA PÁGINA 2:** FOTOGRAFÍA POR EL USUARIO NANKA DE LA WEB SHUTTERSTOCK Y DESCARGADA GRATUITAMENTE, [HTTPS://WWW.SHUTTERSTOCK.COM/IMAGE-PHOTO/WHITE-RAT-ISOLATED-55505044](https://www.shutterstock.com/image-photo/white-rat-isolated-55505044); **ANEXO:** CÁMARA DE CELULAR HUAWEI P30 LITE 28.JUNIO.2021 **TODAS LAS FOTOGRAFÍAS TIENEN UNA RESOLUCIÓN DE 600 PÍXELES POR PULGADA Y FUERON RETOCADAS CON EL PROGRAMA ADOBE® PHOTOSHOP CS6.**

FIGURAS: FIGURA 1: POR IP; FIGURA 2: POR IP; FIGURA 3: TOMADO DE MANTOVANI A, ET AL., 2004. FIGURA 4: FIGURA MODIFICADA DE LA FIGURA 5-7 DE PAVÓN-ROMERO, ET AL., 2021. FIGURA 5: A Y B, POR IP; C, FIGURA MODIFICADA DE LA FIGURA 5-8 DE PAVÓN-ROMERO ET AL., 2021. FIGURA 6: A MODIFICADO DE PRINZ ET AL., 2014, 2017; LI & BARRES, 2017 Y BUTOVSKY & WEINER, 2018. FIGURA 7: TOMADAS DE LA FIGURA 24.3, 24.20 Y 24.25 DE TORTORA & DERRICKSON, 2017. FIGURA 8: A Y C DERECHA, FUERON MODIFICADAS DE LAS FIGURAS 15.3 Y 24.4 DE TORTORA & DERRICKSON, 2017; B Y C IZQUIERDA, FUERON MODIFICADAS DE LA FIGURA 21.4 DE PURVES ET AL., 2017. FIGURA 9: POR IP. FIGURA 10: POR IP. FIGURA 11: FIGURA MODIFICADA DE POEWE ET AL., 2017. FIGURA 12: POR IP. FIGURA 13: CÁMARA DE CELULAR HUAWEI P30 LITE TOMADAS A LO LARGO DE LA ESTANCIA EN LA UADY. FIGURA 14: FIGURA TOMADA DE LA WEB Y DIGITALIZADA POR IP. FIGURA 15: A Y C-F, POR IP; B Y C: CAPTURAS DE FOTOGRAFÍAS DE DIVERSOS VIDEOS CAPTURADOS POR UNA CÁMARA CANON VIXIA HF R800, ORDENADAS Y RETOCADAS CON EL PROGRAMA ADOBE® PHOTOSHOP CS6. FIGURA 16: 2A Y 2C: TOMADA DE GAGE ET AL., 2012; 3, POR IP; 5 IZQUIERDA, TOMADA DEL MANUAL BREVE AXIOLAB 5 UPRIGHT MICROSCOPE DE CARL ZEISS, PÁGINA 10 Y DIGITALIZADA POR IP; 5 DERECHA, TOMADAS DE PAXINOS Y WATSON, 2007. FIGURA 17: TOMADA DE PARRA ET AL., 2020. FIGURA 18A: POR IP; FIGURAS 18-27: LAS GRÁFICAS FUERON DISEÑADAS AUTOMÁTICAMENTE POR EL PROGRAMA GRAPHPAD PRISM 8, EXPORTADAS EN PDF Y SE LES MODIFICÓ EL COLOR, EL GROSOR DE LAS LÍNEAS, TIPOS Y TAMAÑOS DE FUENTES CON EL PROGRAMA ADOBE® ILLUSTRATOR CC 2015. FIGURAS 23-25: A, TOMADAS DE PAXINOS Y WATSON, 2007; B-F, PANELES MICROGRÁFICOS, MICROSCOPIO AXIOLAB 5 CARL ZEISS, CÁMARA AXIOCAM 208 COLOR. FIGURAS 26 Y 27: A, MICROSCOPIO AXIOLAB 5 CARL ZEISS, CÁMARA AXIOCAM 208 COLOR. **EN LAS FIGURAS 1, 2, 4, 6, 9 Y 10, QUE MUESTRAN REPRESENTACIONES GRÁFICAS DE CÉLULAS, TODAS ESTAS FUERON TOMADAS DE ALGÚN ARTÍCULO DE LA REVISTA NATURE Y RECREADAS DE CERO. TODAS LAS FIGURAS QUE NO SON FOTOGRAFÍAS FUERON CREADAS Y VECTORIZADAS CON EL PROGRAMA ADOBE® ILLUSTRATOR CC 2015 POR IP.**

EL PDF FUE EDITADO Y MAQUETADO EN EL PRORGAMA ADOBE® INDESIGN POR IP.

IP: IRVING PARRA

