



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS DE LA SALUD

Evaluación del efecto neuroprotector de los probióticos *Lactobacillus rhamnosus* LGG y *Bifidobacterium lactis* BB-12 en un modelo de hemiparkinsonismo inducido en ratas mediante la inyección de 6-hidroxidopamina en el cuerpo estriado.

Tesis presentada por:

L.N. Sergio Guillermo Cuevas Carbonell

En opción al grado de:

Maestro en Investigación en Salud

Directores de Tesis

Dra. Irma Isela Aranda González

Dr. José Luis Góngora Alfaro

Mérida, Yucatán Noviembre 2020





UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS DE LA SALUD

Evaluación del efecto neuroprotector de los probióticos *Lactobacillus rhamnosus* LGG y *Bifidobacterium lactis* BB-12 en un modelo de hemiparkinsonismo inducido en ratas mediante la inyección de 6-hidroxidopamina en el cuerpo estriado.

Tesis presentada por:

L.N. Sergio Guillermo Cuevas Carbonell

En opción al grado de:

Maestro en Investigación en Salud

Directores de Tesis

Dra. Irma Isela Aranda González

Dr. José Luis Góngora Alfaro

Mérida, Yucatán Noviembre 2020



UADY

UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
DE YUCATÁN

"Luz, Ciencia y Verdad"

Posgrado Institucional en  
Ciencias de la Salud

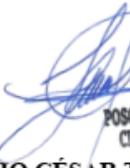
PICSA/080/20

11 de noviembre de 2020.

**A QUIEN CORRESPONDA**

La tesis "**Evaluación del efecto neuroprotector de los probióticos *Lactobacillus rhamnosus* LGG y *Bifidobacterium lactis* BB-12 en un modelo de hemiparinsonismo inducido en ratas mediante la inyección de 6-hidroxidopamina en el cuerpo estriado**", presentada por el **L.N. Sergio Guillermo Cuevas Carbonell**, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de **Maestra en Investigación en Salud**, ha sido aprobada en su contenido científico y en cuanto al cumplimiento de lo establecido en el Plan de Estudios vigente del Posgrado Institucional en Ciencias de la Salud.

**ATENTAMENTE**


**DR. JULIO CÉSAR TORRES ROMERO**  
**COORDINADOR DEL POSGRADO INSTITUCIONAL**  
**EN CIENCIAS DE LA SALUD**

c.c.p. Archivo

Campus de Ciencias de la Salud  
Calle 43 s/n x 96 Paseo de las Fuentes y 40 Col. Inalámbrica  
Teléfonos: 922 57 11, 922 57 16 | Mérida, Yucatán, México | [www.uady.mx](http://www.uady.mx)

## **Agradecimientos académicos**

En primera instancia deseo agradecer a mis directores la Doctora Irma Isela Aranda González y el Doctor José Luis Góngora Alfaro, por la dedicación, el tiempo y los recursos que han brindado a este trabajo. Les agradezco las enseñanzas proporcionadas en el tiempo que hemos colaborado y les reafirmo mi profunda estima y respeto.

A los miembros del comité las Doctoras Rosario García Miss, María Luisa Ávila Escalante y Reyna Cruz Bojórquez, a los Doctores Jaime Zaldívar Rae y Humberto Salgado Burgos que han contribuido siempre de manera puntual y decorosa a la revisión de este trabajo y a mi formación académica, haciendo de ésta una experiencia enriquecedora y memorable.

Expreso mi especial agradecimiento a las Q.F.B. Mirza Mut Martín, Shirley Ashanty Calderón Sauri, Valeria Guadalupe Parra Paz, a los L.N. Diego Granados Patrón, Alicia Dawn Ojeda, Daniel García López y a la Dra. Lizbeth Vásquez Celaya por su apoyo durante la realización de este trabajo.

Muchas gracias a mis directores y al M. en C. Fernando José Álvarez Cervera por la donación de los probióticos empleados en este proyecto; al financiamiento SEP-CONACyT - clave 256878 otorgado al Doctor José Luis Góngora Alfaro, el Programa de Apoyo al Desarrollo y Consolidación de los Cuerpos Académicos (PADECCA) 2017 otorgado al Grupo de Investigación "Alimentación, Nutrición y Salud" y al CONACyT por la beca otorgada (CVU #930013) durante el curso del posgrado.

Departamento de Neurociencias, Laboratorio de Neurofisiología.

Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”

Universidad Autónoma De Yucatán.

Mérida Yucatán, México.

## INDICE

OFICIO DE APROBACIÓN DE TRABAJO FINAL .....	iv
AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
INDICE DE TABLAS .....	xi
ABREVIATURAS .....	xii
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	3
ANTECEDENTES .....	3
Enfermedad de Parkinson .....	3
Epidemiología .....	4
Fisiopatología de la EP .....	5
Inflamación y estrés oxidativo en la EP .....	6
Modelos animales de la EP .....	9
Hipótesis del origen intestinal de la EP .....	11
Microbiota intestinal .....	13
La EP y la disbiosis intestinal.....	13
Probióticos, <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> .....	15
<i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> y SNC .....	17
Efecto antiinflamatorio y neuroprotector de los probióticos .....	18
Los probióticos en la enfermedad de Parkinson .....	19
OBJETIVOS .....	22
General .....	22
Específicos .....	22
HIPÓTESIS .....	23
MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
Grupos experimentales .....	25
Probióticos .....	26
Placebo .....	26
Cirugía estereotáxica .....	27
Pruebas conductuales empleadas para valorar la lesión dopaminérgica .....	29

Prueba de la pasarela estrecha elevada.....	30
Prueba del cilindro .....	33
Giro inducido por apomorfina.....	36
Fijación del cerebro mediante perfusión por vía intracardiaca.....	38
Obtención de cortes de estriado y sustancia <i>nigra</i> .....	38
Inmunohistoquímica.....	40
Plan de procesamiento, análisis de datos y presentación de resultados .....	43
Análisis de la inmunorreactividad a TH en las rebanadas cerebrales.....	43
Análisis de la inmunorreactividad a Iba1 en las rebanadas cerebrales .....	47
Análisis estadístico .....	52
RESULTADOS.....	53
Inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa en el estriado.....	53
Inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa en la sustancia <i>nigra</i> . .....	55
Inmunohistoquímica para Iba1 en el estriado. ....	60
Inmunohistoquímica para Iba1 en la sustancia <i>nigra</i> . .....	65
Correlación entre la activación de la microglía y la denervación dopaminérgica .....	70
Pruebas conductuales .....	71
Pasarela estrecha elevada .....	71
Cilindro .....	77
Giro inducido por apomorfina .....	80
DISCUSIÓN .....	83
Limitaciones .....	98
CONCLUSIONES .....	99
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
ANEXOS .....	112

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Posibles mecanismos deletéreos de la excesiva activación glial.....	9
Figura 2. Hipótesis del origen intestinal de la EP.....	12
Figura 3. Posible participación de la disbiosis en el desarrollo o progresión de la EP..	15
Figura 4. Posibles acciones de los probióticos que contribuyen a la neuroprotección..	20
Figura 5. Beneficios gastrointestinales reportados del consumo de probióticos en la EP. .....	21
Figura 6. Metodología general..	25
Figura 7. Cirugía estereotáxica y selección del área de lesión. .	28
Figura 8. Ejemplo de recorrido normal en la prueba de la pasarela estrecha elevada..	30
Figura 9. Ejemplos de fallos en la extremidad izquierda durante el recorrido en la pasarela estrecha.....	32
Figura 10. Ejemplos de la actividad exploratoria en la prueba del cilindro.....	35
Figura 11. Giro contralateral inducido por apomorfina en una rata con denervación dopaminérgica en el estriado derecho.....	36
Figura 12. Obtención de cortes para la IHQ.....	39
Figura 13. Regiones del cerebro de la rata.....	40
Figura 14. Fundamento de la técnica ABC para la IHQ.....	42
Figura 15. Análisis de la inmunohistoquímica para TH en el estriado.....	44
Figura 16. Análisis de la inmunohistoquímica para TH en la sustancia nigra.....	46
Figura 17. Análisis de la inmunohistoquímica para Iba1 en el estriado.....	48
Figura 18. Clasificación morfológica de los estados de activación de la microglía <sup>29</sup> .....	49
Figura 19. Selección de las áreas para el conteo de microglía Iba1 <sup>+</sup> en la SNpc.....	51
Figura 20. Los probióticos <i>L. rhamnosus</i> LGG y <i>B. lactis</i> BB-12 reducen la pérdida de inmunorreactividad a TH en el estriado dorsolateral lesionado con 6-OHDA.....	53
Figura 21. Pérdida de área TH <sup>+</sup> en el cuerpo estriado con verdadera o falsa lesión.....	55
Figura 22. Porcentaje de pérdida de somas TH <sup>+</sup> en la región rostral de la sustancia <i>nigra pars compacta</i> del hemisferio lesionado.....	56
Figura 23. Porcentaje de pérdida de somas TH <sup>+</sup> en la región medial de la sustancia <i>nigra pars compacta</i> del hemisferio lesionado.....	57
Figura 24. Porcentaje de pérdida de somas TH <sup>+</sup> en la región caudal de la sustancia <i>nigra pars compacta</i> del hemisferio lesionado.....	58
Figura 25. Porcentaje global de pérdida de somas TH <sup>+</sup> en la sustancia <i>nigra pars compacta</i> del hemisferio lesionado.....	59
Figura 26. Los probióticos <i>L. rhamnosus</i> LGG y <i>B. lactis</i> BB-12 reducen la inmunorreactividad a Iba1 en el estriado dorsolateral lesionado con 6-OHDA.....	60
Figura 27. Incremento porcentual de microglía Iba1 <sup>+</sup> en la zona medial al sitio de inyección en el estriado.....	61
Figura 28. Incremento porcentual de microglía Iba1 <sup>+</sup> en la zona ventral al sitio de inyección en el estriado.....	62

Figura 29. Incremento porcentual de microglía Iba1 <sup>+</sup> en la zona lateral al sitio de inyección en el estriado.....	63
Figura 30. Incremento porcentual global de microglía Iba1 <sup>+</sup> en el cuerpo estriado derecho (lesionado).....	64
Figura 31. Incremento porcentual de microglía Iba1 <sup>+</sup> en la SNpc rostral del hemisferio lesionado.....	66
Figura 32. Incremento porcentual de microglía Iba1 <sup>+</sup> en la SNpc medial del hemisferio lesionado.....	67
Figura 33. Incremento porcentual de microglía Iba1 <sup>+</sup> en la SNpc caudal del hemisferio lesionado.....	68
Figura 34. Incremento porcentual de microglía Iba1 <sup>+</sup> en la SNpc global del hemisferio lesionado. Cada barra representa el promedio $\pm$ EE del número de animales indicado entre paréntesis.....	69
Figura 35. Correlación entre la denervación dopaminérgica (pérdida de inmunorreactividad a TH <sup>+</sup> ) y la activación microglial (incremento de la microglía Iba1 <sup>+</sup> ) en el estriado lesionado.....	70
Figura 36. Tiempos de recorrido de la pasarela estrecha elevada expresados en porcentaje.....	72
Figura 37. Curso temporal de los porcentajes de los tiempos de recorrido en la prueba de la pasarela estrecha elevada.....	73
Figura 38. Fallos en el recorrido de la pasarela estrecha elevada expresados en porcentaje.....	75
Figura 39. Curso temporal de los fallos en el recorrido expresados en porcentaje en la pasarela elevada.....	76
Figura 40. Porcentaje de asimetría en el uso de las patas delanteras en la prueba del cilindro.....	78
Figura 41. Curso temporal de los porcentajes de asimetría en la prueba del cilindro....	79
Figura 42. Giros contralaterales inducidos por apomorfina.....	81
Figura 43. Curso temporal de los giros inducidos por apomorfina.....	82

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de los grupos experimentales.....	25
Tabla 2. Contenido nutrimental del placebo .....	26

## ABREVIATURAS

**5-HT:** Serotonina  
**6-OHDA:** 6-hidroxidopamina  
**ACTH:** Hormona adrenocorticotrópica  
**AGCC:** Ácidos grasos de cadena corta  
**Akt:** Proteína quinasa B  
**BDNF:** Factor neurotrófico derivado del cerebro  
**CREB:** Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc  
**DA:** Dopamina  
**EP:** Enfermedad de Parkinson  
**ERK:** Quinasas reguladas por señales extracelulares  
**GDNF:** Factor neurotrófico derivado de la glía  
**GFAP:** Proteína ácida fibrilar glial  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrogeno  
**HDAC:** Desacetilasas de histonas  
**Iba1:** Molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1  
**IHQ:** Inmunohistoquímica  
**IL-10:** Interleucina 10  
**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 beta  
**IL-6:** Interleucina 6  
**I $\kappa$ B $\alpha$ :** Inhibidor alfa de factor nuclear kappa B  
**LPS:** Lipopolisacárido  
**MPTP:** 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina  
**Msp1:** Proteína de secreción mayor 1  
**Msp2:** Proteína de secreción mayor 2  
**NAD<sup>+</sup>:** Dinucleótido de adenina y nicotidamida  
**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear kappa B  
**NO:** Óxido nítrico  
**PPAR- $\gamma$ :** Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma  
**RDI:** Región de interés  
**RNS:** Especies reactivas de nitrógeno  
**ROS:** Especies reactivas de oxígeno  
**SIBO:** Sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado  
**SNC:** Sistema nervioso central  
**SNpc:** Sustancia *nigra pars compacta*  
**Tfam:** Factor de transcripción mitocondrial A  
**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta  
**TH:** Tirosina hidroxilasa  
**TLR:** Receptores tipo Toll  
**TNF $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
**UFC:** Unidades formadoras de colonia  
 **$\alpha$ -SYN:**  $\alpha$ -sinucleína

## RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por deficiencias motoras, debido a la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. Se han reportado efectos neuroprotectores de los probióticos sobre el SNC, sin embargo, esto no ha sido evaluado en el modelo con 6-hidroxidopamina (6-OHDA). En el presente trabajo se evaluó si el tratamiento con dos cepas de probióticos reduce la denervación dopaminérgica, la activación microglial y las deficiencias motoras en ratas Wistar con hemiparkinsonismo inducido mediante la inyección de 6-OHDA. Los animales recibieron diariamente por vía oral *Lactobacillus rhamnosus* LGG y *Bifidobacterium lactis* BB-12 ( $1 \times 10^9$  UFC c/u) o placebo durante los 14 días previos y 21 días posteriores a la inyección de 6-OHDA (8.75  $\mu$ g) o solución salina en el cuerpo estriado derecho (coordenadas: AP=+0.2 mm, L=-3.5 mm y DV=-4 mm). En las dos semanas previas y las tres posteriores a la inyección se evaluó la capacidad motora mediante las pruebas de la pasarela estrecha elevada, la exploración vertical en el cilindro y el giro inducido con apomorfina (0.25 mg/kg), en días previos y posteriores a la inyección, en intervalos semanales. El día 22 se perfundió a las ratas con paraformaldehído al 4% para fijar *in situ* el cerebro, posteriormente se hicieron cortes de 70  $\mu$ m para realizar inmunohistoquímicas para tirosina hidroxilasa y para la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1, tanto en el estriado como en la sustancia *nigra pars compacta*. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías, ANOVA de medidas repetidas y correlación lineal de Pearson, con un valor de significancia  $p < 0.05$ .

El tratamiento con probióticos redujo la denervación dopaminérgica y la activación de la microglía en el estriado, pero no en la sustancia *nigra*; disminuyó el tiempo y los errores cometidos en la pasarela elevada, aumentó los giros inducidos por apomorfina y no se encontró efecto en la lateralización del uso de

las extremidades. Los probióticos tienen un efecto neuroprotector manifestado por la reducción de la pérdida dopaminérgica, la menor activación de la microglía en el estriado y mantienen el desempeño motor en la prueba de la pasarela estrecha elevada.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo complejo, caracterizado por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas del sistema nigroestriatal, posiblemente causado por la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -SYN) mal plegada resistente a la hidrólisis, que desencadena la activación de la microglía; la microglía activada produce especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), además de citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  e IL-6, que conllevan a la apoptosis de las neuronas dopaminérgicas.<sup>1-10</sup>

Se ha sugerido que el intestino es un órgano importante en relación al desarrollo y progresión de la EP, posiblemente debido al constante intercambio de información entre éste, el medio ambiente y el cerebro.<sup>11-14</sup>

La disbiosis es la alteración de la microbiota que produce efectos adversos en el hospedero, ya que aumenta la permeabilidad intestinal y activa la respuesta inmune local, con incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias; se ha propuesto que estos eventos ocasionaría la formación de  $\alpha$ -sinucleína que, de forma similar a un prión, migraría a la SNpc a través del nervio vago, promoviendo la neurodegeneración dopaminérgica.<sup>15-17</sup>

Por lo anterior, se ha propuesto que el consumo de probióticos podría corregir la disbiosis intestinal, lo que podría tener un efecto protector reduciendo la neurodegeneración.<sup>18-20</sup>

## ANTECEDENTES

### Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurológico complejo pues su etiología es desconocida y en términos generales sus causas se deban a la combinación de factores medioambientales y genéticos.<sup>1</sup> Fue descrita por primera vez en 1817 por James Parkinson y más tarde diferenciada de otras

enfermedades similares por Jean-Martin Charcot.<sup>21</sup> Entre sus síntomas característicos se encuentran la bradicinesia o lentitud de los movimientos voluntarios, el temblor en reposo, la rigidez muscular y el deterioro postural durante la marcha.<sup>1,2</sup>

Las alteraciones motoras antes señaladas se relacionan con la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc), en particular, de la zona ventrolateral.<sup>4</sup> Conforme la EP progresa empeoran las disfunciones motoras y aunque existen alternativas terapéuticas para su control no se dispone de ninguna que disminuya su progresión.<sup>1</sup> La EP también cursa con alteraciones no motoras como la disfunción olfatoria, trastornos en el sueño, fatiga, depresión, incontinencia urinaria y estreñimiento, los cuales merman la calidad de vida del afectado.<sup>1,2,22</sup>

En etapas avanzadas de la EP el tratamiento farmacológico disminuye su efectividad, por lo tanto, las complicaciones motoras y no motoras son más frecuentes; entre las más graves están las caídas, asfixias y la demencia.<sup>2</sup>

## **Epidemiología**

La EP es el segundo trastorno degenerativo más común después de la demencia tipo Alzheimer.<sup>1</sup> La prevalencia de la EP varía ampliamente a lo largo del mundo, en general es más alta en Europa y Estados Unidos que en otros países. La prevalencia en la población mundial oscila entre el 0.3 % y el 1 % en sujetos mayores de 60 años, y alcanza el 3 % en las personas de 80 años o más.<sup>23</sup>

Entre los factores de riesgo asociados más relevantes se encuentra la edad, ya que a medida que ésta aumenta también lo hacen la prevalencia y la incidencia de EP, especialmente después de los 80 años.<sup>24</sup> Esta tendencia provoca el incremento en el número de casos conforme la población envejece y la esperanza de vida aumenta.<sup>25</sup> En México se ha estimado una prevalencia de entre 40 a 50 casos por cada 100 mil habitantes por año y se prevé que la cifra se duplique e incluso se llegue a triplicar en las próximas décadas.<sup>26</sup> En una publicación

reciente se analizó la tasa de incidencia de EP en población mexicana entre enero de 2014 y diciembre de 2017, los datos se tomaron de los Anales de Morbilidad y del Boletín Epidemiológico publicados por la Secretaria de Salud; la tasa de incidencia en la población de más de 65 años fue de 313.94 por cada 100 mil habitantes.<sup>27</sup>

Elementos ambientales también se han asociado a la EP; un meta-análisis evaluó 30 factores de riesgo potenciales e identificó que la exposición a plaguicidas, traumatismos cerebrales previos, vida rural, uso de  $\beta$ -bloqueadores, vivir en un ambiente rural, tener ocupación agrícola y consumo de agua de pozo aumentaban el riesgo.<sup>3</sup> Mientras que el tabaquismo, beber café, el uso de antiinflamatorios no esteroideos, bloqueadores de los canales de calcio y el consumo de bebidas alcohólicas se asociaron a una disminución del riesgo.<sup>3</sup>

### **Fisiopatología de la EP**

La característica patológica más relevante de la EP es la pérdida pronunciada de neuronas que producen dopamina, mediante la enzima tirosina hidroxilasa (TH), que se localizan en la SNpc; estas células normalmente liberan dopamina en sus terminales axónicos en el cuerpo estriado y forman parte del sistema extrapiramidal de regulación motora, por lo que su pérdida se traduce en los trastornos del movimiento en esta enfermedad.<sup>28</sup>

La EP también se caracteriza por la acumulación patológica de agregados de la proteína  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -SYN) denominados cuerpos de Lewy.<sup>29</sup>

La  $\alpha$ -SYN, es una proteína presente en varios tipos de células de todo el cuerpo, especialmente en terminales presinápticos de neuronas donde se le asocia con la regulación de la liberación de neurotransmisores mediante exocitosis vesicular.<sup>30</sup> En ciertas circunstancias, aún no bien esclarecidas, esta proteína puede modificar su estructura, formando agregados que adoptan una estructura de láminas  $\beta$ , modificando su función normal, pudiendo comportarse como priones que se propagan de una neurona a otra.<sup>11</sup> Esto conduce al sello

histológico de neuritas PD-Lewy y cuerpos de Lewy compuestos por  $\alpha$ -SYN fibrilar, fosforilada y ubiquitinada.<sup>31</sup> Se ha propuesto que las neuronas que presentan cuerpos de Lewy son aquellas que tratan de evadir el mecanismo tóxico involucrado en las enfermedades neurodegenerativas como la EP.<sup>28</sup> La habilidad de los cuerpos de Lewy para secuestrar proteínas que han adoptado formas fibrilares potencialmente citotóxicas podría ser inicialmente benéfica para las neuronas dopaminérgicas, pero es difícil imaginar que estas inclusiones no contribuyan a la pérdida de funciones celulares una vez que hayan aumentado su volumen dentro del soma celular.<sup>28</sup>

Actualmente el tratamiento farmacológico para EP es sintomático; los medicamentos para controlar los síntomas motores aumentan las concentraciones cerebrales de dopamina (DA) o estimulan sus receptores. Entre estos medicamentos se incluyen la levodopa, los agonistas dopaminérgicos, los inhibidores de la monoamino oxidasa tipo B y con menos frecuencia la amantadina.<sup>32</sup> Sin embargo, aún no existen tratamientos que disminuyan la progresión de la EP.<sup>1,32</sup> Entre los posibles objetivos a considerar para desarrollar terapias que pudieran reducir el riesgo de padecer la EP o reducir su progresión, se pueden considerar tratamientos que disminuyan la neuroinflamación, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la actividad de los canales de calcio, de la LRRK2 quinasa, así como la acumulación, agregación y transmisión de  $\alpha$ -SYN mal plegada.<sup>4</sup>

### **Inflamación y estrés oxidativo en la EP**

En la enfermedad de Parkinson existe un proceso inflamatorio crónico y estrés oxidativo por lo que se ha hipotetizado que ambos contribuyen a su progresión,<sup>33,34</sup> lo anterior se sustenta de estudios que presentan evidencia de la activación de la neuroglía, el aumento en la vía del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), el cual tiene una función clave en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria, la acumulación de citoquinas proinflamatorias, el daño oxidativo a

las proteínas del líquido cerebro espinal y cerebros de pacientes con EP.<sup>34</sup> Estos hallazgos se han confirmado también en la examinación *post mortem* de cerebros con EP y en modelos experimentales.<sup>4,5</sup>

El área lateral de la sustancia *nigra* se degenera antes y con mayor severidad en la EP; una investigación encontró un incremento de la expresión de genes que codifican citoquinas proinflamatorias y una disminución de la expresión de varios genes relacionados al metabolismo del glutatión en esta área.<sup>6</sup> La expresión de estos genes es alta en las células gliales, lo que respalda la idea de que la desregulación de la neuroglia puede ser un mecanismo subyacente importante en la patogénesis de la EP.<sup>6,7</sup>

Las células gliales han sido consideradas de manera clásica como células de soporte estructural, metabólico y trófico de las neuronas.<sup>8</sup> Se puede clasificar a las células gliales en dos grandes grupos: la macroglía, que se origina a partir de células precursoras del ectodermo y que en el SNC comprende a los astrocitos y a los oligodendrocitos. La segunda clase es la microglía, que se encuentran exclusivamente en el SNC y proceden de monocitos de la médula espinal.<sup>8</sup>

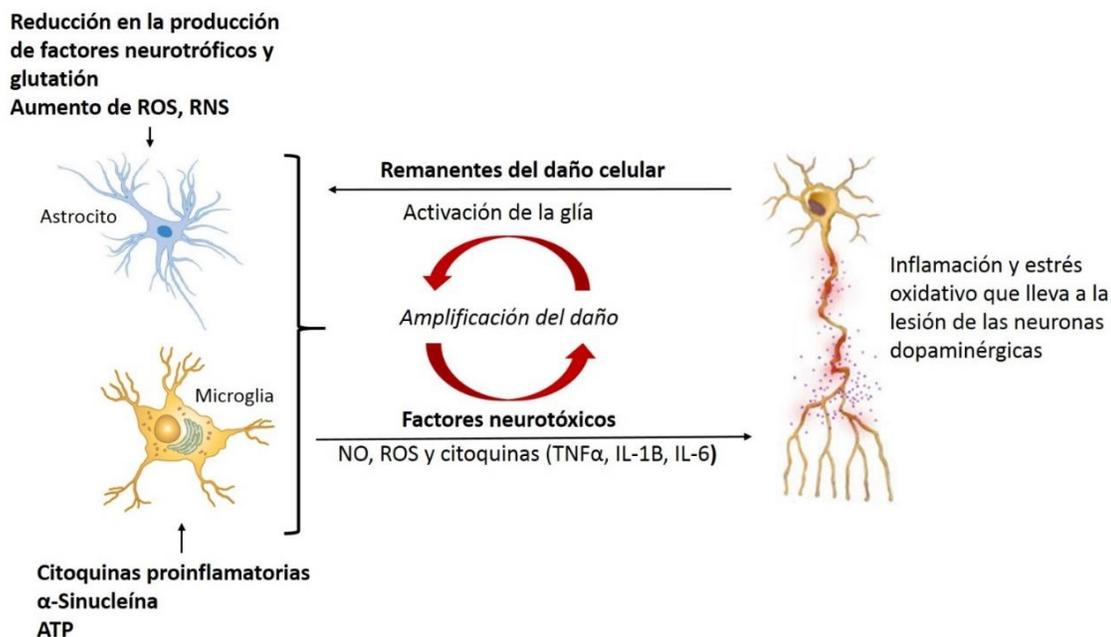
Los astrocitos son las células gliales más abundantes en el SNC; participan en la formación de la barrera hematoencefálica, producen importantes factores que contribuyen a la diferenciación, desarrollo y supervivencia de las neuronas, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), sintetizan glutatión que protege al SNC del estrés oxidativo y además inhiben la inflamación excesiva regulando la activación de la microglía; sin embargo, investigaciones recientes señalan que podrían iniciar o potenciar la respuesta inmune en el SNC.<sup>9,10</sup> Considerando esto, los astrocitos tienen un papel crítico en la neuroprotección y la regeneración del cerebro cuando ocurre un daño.<sup>10</sup>

La microglía son macrófagos residentes del SNC; en el cerebro sano se considera que la mayoría de estas células se encuentra en un estado de “descanso” (al contrario de lo que el término pudiera sugerir, en este estado la

microglía está en constante movimiento, monitoreando el medio en busca de patógenos o cambios en el micromedioambiente).<sup>35</sup> La microglía puede cambiar a un estado “activado” en respuesta a varios estímulos, por ejemplo, endotoxinas como el lipopolisacárido (LPS) que al activar a los receptores tipo Toll (TLR) de la microglía induce la producción de mediadores proinflamatorios, como las interleucinas 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e IL-6, y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), la cuales pueden potenciar la activación de la microglía.<sup>36–38</sup>

Otros estímulos podrían ser proteínas mal plegadas, como los agregados de  $\alpha$ -SYN o  $\beta$ -amiloide, al igual que el ATP liberado de las neuronas dañadas.<sup>7</sup> En respuesta a estos estímulos de “activación” la microglía aumenta la expresión de varias proteínas reguladoras, como la molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (Iba1),<sup>37</sup> además de incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO), esto con el objetivo de destruir posibles patógenos; sin embargo, estos factores pueden dañar tejidos cercanos, de manera que a largo plazo pueden contribuir al inicio y progresión del daño neuronal (figura 1).<sup>5,7,36</sup>

Diversos estudios sugieren que la inflamación crónica cerebral contribuye a la patogenia de múltiples enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como lo es la EP; se postula que un proceso inflamatorio sostenido reduce la capacidad de los sistemas antioxidantes de la glía y las neuronas, además de aumentar la producción de ROS, los cuales pueden reaccionar con los lípidos y proteínas en las membranas celulares impidiendo sus funciones permanentemente; además estos radicales pueden causar mutaciones o daños en el DNA mitocondrial o nuclear causando la muerte celular.<sup>39</sup>



**Figura 1. Posibles mecanismos deletéreos de la excesiva activación glial.** Se ha propuesto que desregulación en las funciones de la neuroglia podrían mantener el estado inflamatorio, aumentar el estrés oxidativo y contribuir a la neurodegeneración en la EP.<sup>5,7-10,36,40</sup> (ROS: especies reactivas de oxígeno, RNS: especies reactivas de nitrógeno, NO: óxido nítrico, TNFα: factor de necrosis tumoral alfa, IL-1B: interleucina 1β, IL-6: interleucina 6).

## Modelos animales de la EP

El desarrollo de estos modelos está orientado a inducir modificaciones estructurales o funcionales en la transmisión dopaminérgica nigroestriatal. Como modelos que son, ninguno de ellos cuenta con todas las características de la EP que se desarrollan en el humano. Sin embargo, son de gran utilidad para estudiar el funcionamiento de los ganglios basales, los mecanismos implicados en la muerte de las neuronas dopaminérgicas, la actividad antiparkinsoniana de distintas sustancias y la eficacia de posibles tratamientos neuroprotectores.<sup>41</sup>

La 6-hidroxidopamina (6-OHDA) es la neurotoxina más ampliamente usada en el desarrollo de modelos experimentales de EP en roedores. La inyección intracerebral de 6-OHDA produce una destrucción selectiva de las neuronas

catecolaminérgicas.<sup>42</sup> La inyección en el cuerpo estriado produce una lesión selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra*.<sup>43</sup> Esto se debe a que la sustancia *nigra* contiene los somas de las neuronas dopaminérgicas que proyectan sus axones hacia el estriado.<sup>44</sup>

Existen estudios que demuestran que la 6-OHDA posee una acción inhibitoria de la cadena de transporte electrónico en la mitocondria,<sup>45</sup> sin embargo, la muerte neuronal dopaminérgica en este modelo está ligada a la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radicales libres tipo hidroxilo y quinonas que se producen en su metabolización.<sup>46,47</sup>

El proceso neuroinflamatorio en el modelo de 6-OHDA ha sido evaluado mediante la activación de los astrocitos y microglía. Se ha determinado que la activación de estas células gliales ocurre desde el tercer día posterior a la lesión con 6-OHDA y se mantiene hasta 3 semanas posteriores a ésta.<sup>48,49</sup> El proceso neuroinflamatorio precede a la muerte de las neuronas dopaminérgicas nigrales y probablemente en sus etapas iniciales, éste sirve como un mecanismo para contener el daño celular; sin embargo, la evidencia señala también que tras la activación de las células gliales la producción de citoquinas proinflamatorias podría incrementar la citotoxicidad de la 6-OHDA.<sup>48</sup>

El modelo de lesión de las neuronas dopaminérgicas en ambos hemisferios imita con mayor fidelidad la fisiopatología de la EP en humanos. Sin embargo, la administración bilateral de 6-OHDA en la SNpc de las ratas causa una inhibición total de la ingesta de agua y alimento, de manera que si no se les alimenta por sonda intragástrica mueren entre los 4 a 20 días posteriores a la lesión.<sup>50,51</sup>

El procedimiento tradicional de lesión unilateral consiste en la inyección de 6-OHDA directamente en la SNpc que produce un daño irreversible a la mayoría de las neuronas dopaminérgicas causando una severa disfunción motora, por lo que se ha propuesto que es un modelo representativo de etapas avanzadas de la EP.<sup>52-54</sup>

Por tal motivo se ha propuesto un modelo alternativo menos agresivo, que consiste en la inyección de cantidades moderadas de 6-OHDA en la región dorsolateral del estriado, de manera que sobrevivan algunas neuronas dopaminérgicas, simulando etapas tempranas de la EP.<sup>54</sup> Considerando lo anterior es posible causar una lesión dopaminérgica de magnitud moderada que permita observar las alteraciones motoras y al mismo tiempo permita evaluar el efecto neuroprotector de diversos tratamientos.

### **Hipótesis del origen intestinal de la EP**

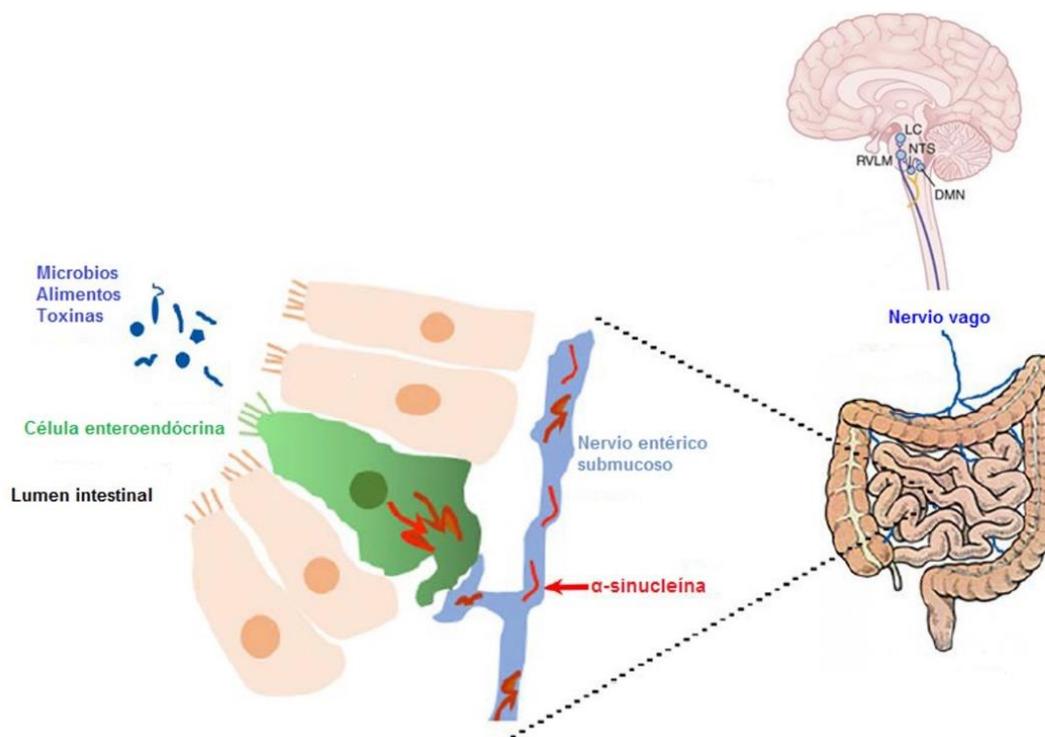
El eje entérico – cerebral consiste en la comunicación bidireccional entre el SNC y el sistema nervioso entérico, que une centros emocionales cognitivos del cerebro con funciones periféricas intestinales.<sup>13,55</sup> Existe mucha evidencia que señala a la microbiota como otro miembro activo de este eje, lo que pone de manifiesto las complejas conexiones neurales, endocrinas, inmunes y humorales entre estos órganos.<sup>12</sup>

Como se ha mencionado previamente, el estreñimiento es el síntoma gastrointestinal, no motor, asociado a la EP y que se presenta con mayor frecuencia antes y después del inicio de los síntomas motores.<sup>22</sup> En etapas avanzadas de la EP puede requerir tratamiento diario con laxantes.<sup>2</sup> No obstante, hay evidencia de que también puede preceder a la sintomatología motora por décadas, por lo que ha sido clasificado entre los llamados síntomas prodrómicos.<sup>22</sup>

La  $\alpha$ -SYN, es un componente normal del sistema nervioso entérico, sin embargo, en pacientes con EP se encuentra en concentraciones más elevadas en comparación con controles sanos de la misma edad.<sup>56</sup>

En secciones anteriores se mencionó que determinados factores (entre los que se proponen toxinas, algunos microorganismos o metabolitos de éstos) podrían modificar la estructura de la  $\alpha$ -SYN y promover su agregación, causando que se comporte como un prion;<sup>11</sup> evidencias recientes señalan al intestino como un

posible punto de origen para este evento, en particular en las células enteroendocrinas de la mucosa intestinal, las cuales se encuentran en estrecha relación con los plexos nerviosos submucosos, que a su vez se conectan con el nervio vago, a través del cual migrarían los agregados de  $\alpha$ -SYN alcanzando varios núcleos del tallo cerebral hasta la SNpc (figura 2),<sup>11,57</sup> promoviendo su acumulación en las neuronas dopaminérgicas, en donde se formarían cuerpos de Lewy que eventualmente desencadenarían la disfunción mitocondrial que llevaría a la apoptosis.<sup>57</sup>



**Figura 2. Hipótesis del origen intestinal de la EP.** Vía propuesta para la migración de  $\alpha$ -sinucleína (mal plegada) patogénica del intestino al cerebro.<sup>57</sup> (adaptado de Chandra *et al.*, 2017)

Otro mecanismo hipotético sobre el origen intestinal de la EP se relaciona con la mayor permeabilidad intestinal en los pacientes, en comparación con controles sanos.<sup>58</sup> Los resultados de una investigación indican que en los pacientes con EP hay defectos en las uniones intestinales estrechas, sin daño en la mucosa,

incluyendo reducciones de los niveles de proteínas promotoras de barrera e interrupciones en las redes de unión.<sup>59</sup> Hipotéticamente, este incremento de la permeabilidad intestinal promovería la entrada de moléculas proinflamatorias y oxidativas derivadas de las bacterias residentes en el tubo digestivo (como el LPS) los cuales inducirían la activación sostenida de la respuesta inmune en el intestino, cuyos mediadores proinflamatorios (citoquinas y quimioquinas) podrían migrar a través de la sangre hacia los órganos circunventriculares (regiones de la barrera hematoencefálica relativamente permeables), lo que causaría la activación de los astrocitos y la microglía, promoviendo la neuroinflamación.<sup>12</sup>

### **Microbiota intestinal**

La microbiota intestinal está formada por aproximadamente 100 trillones de microorganismos de diversos géneros, la mayor parte son beneficiosos y viven en simbiosis con el cuerpo humano.<sup>60</sup> En particular, las bacterias de la microbiota cumplen importantes funciones en el metabolismo de nutrimentos, producen sustancias bioactivas como vitaminas y ácidos grasos de cadena corta, contribuyen a mantener, la integridad estructural de la mucosa intestinal, ejercen funciones inmunomoduladoras y protegen contra microorganismos patógenos.<sup>60</sup> En general una microbiota saludable se compone principalmente de dos grandes filos bacterianos, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*; si bien este perfil permanece relativamente constante cabe aclarar que su composición en familias y especies, así como la abundancia de éstas varía en distintas partes del tracto gastrointestinal, llegando a su máximo en el colon donde su número asciende hasta  $1 \times 10^{12}$  por gramo de contenido.<sup>60</sup>

### **La EP y la disbiosis intestinal**

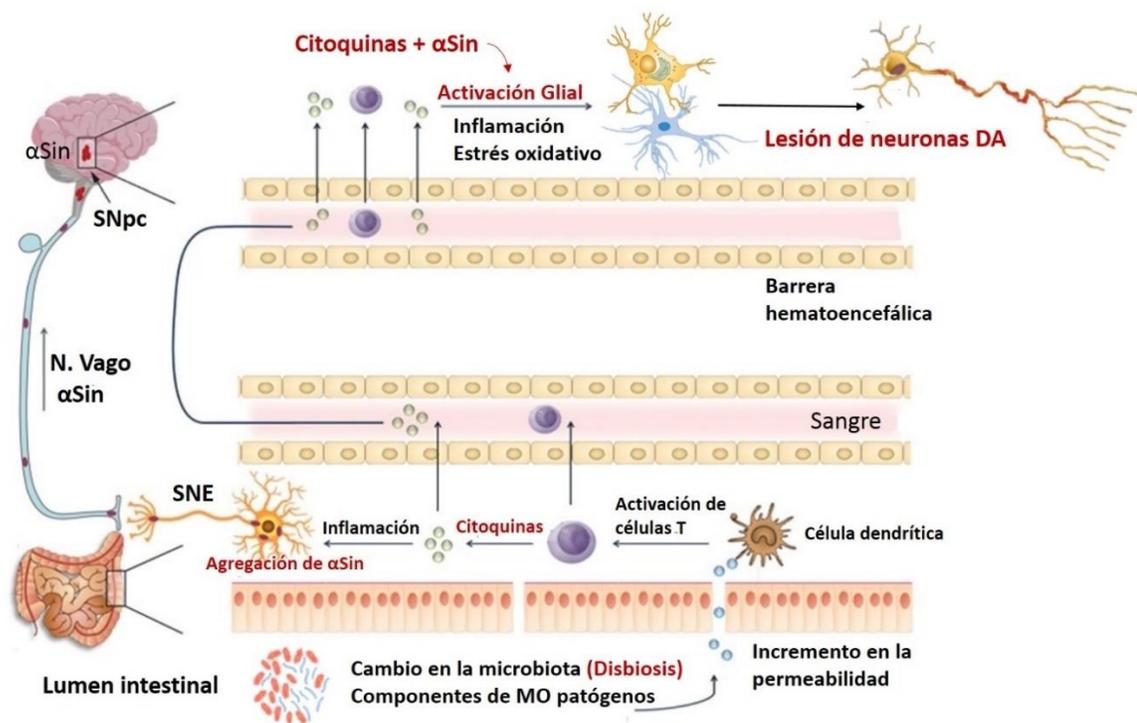
Se ha descrito que en la enfermedad de Parkinson hay un aumento de la permeabilidad intestinal.<sup>58,59</sup> Los pacientes con EP presentan una mayor prevalencia (54.2 %) de sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado

(SIBO por sus siglas en inglés) en comparación con sus controles (8.3 %).<sup>61,62</sup> El SIBO ha sido definido como el incremento en la densidad bacteriana en el intestino delgado excediendo los  $10^5$  -  $10^6$  organismos/mL (normalmente la concentración debería ser menos de  $10^3$ ); el tipo de microorganismos presentes tiene un papel importante en las manifestaciones clínicas observadas<sup>63</sup> y en la EP se le ha relacionado con anomalías en la motilidad intestinal y empeoramiento en la función motora.<sup>61</sup>

La disbiosis intestinal ha sido definida como: una pérdida del “equilibrio” en la composición de los microorganismos que componen la microbiota del intestino, un cambio en su actividad metabólica o un cambio en la distribución de ésta a lo largo del intestino.<sup>15</sup> La disbiosis se caracteriza por la pérdida de bacterias benéficas, el crecimiento excesivo de bacterias potencialmente patogénicas o la pérdida general de la diversidad bacteriana.<sup>15</sup>

La disbiosis puede causar incremento en la permeabilidad intestinal, lo que podría facilitar el paso de bacterias a través de la mucosa intestinal y la activación del sistema inmune subyacente, promoviendo un estado de inflamación intestinal crónico de baja intensidad que podría afectar al cerebro (figura 3).<sup>16,17,55</sup>

Recientemente se ha evidenciado la asociación entre las enfermedades neurodegenerativas y la composición de la microbiota intestinal. Varios estudios muestran un incremento de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Varrucomicrobiaceae* y *Akkermansia* y una disminución de *Faecalibacterium spp.*, *Coprococcus spp.*, *Blautia spp.*, *Prevotella spp.* y *Prevotellaceae* en pacientes con EP.<sup>64</sup>



**Figura 3. Posible participación de la disbiosis en el desarrollo o progresión de la EP.** La disbiosis predispone un estado inflamatorio intestinal y sistémico que podría participar en la agregación de la  $\alpha$ -SYN y la hiperactivación de la glía, ocasionando el deterioro dopaminérgico <sup>55</sup> (Adaptado de: Pérez Pardo *et al.* Curr Behav Neurosci Rep. 2017;4:361–68)

### **Probióticos, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium***

Si bien la eliminación de las especies de microorganismos patógenos del intestino (con antibióticos, por ejemplo) es una estrategia viable y comprobada para mejorar la salud del hospedero, otro abordaje es manipular la microbiota favoreciendo la proliferación de especies benéficas mediante el consumo de probióticos.<sup>18</sup>

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran a dosis adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped.<sup>65</sup> En general los probióticos cuyo uso se encuentra más extendido son *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, bifidobacteria y algunas cepas de *Lactobacillus*

*casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus coagulans*, *Escherichia coli* cepa Nissle 1917, *Enterococcus faecium* SF68, y la levadura *Saccharomyces boulardii*.<sup>66,67</sup>

El uso preferencial de *Lactobacillus* y Bifidobacterias se debe en parte a que la FDA las ha reconocido como generalmente seguras (GRAS – generally recognized as safe), con nula virulencia; por otra parte, sus propiedades benéficas se encuentran bien documentadas.<sup>68</sup>

Los *Lactobacillus* pertenecen al filo *Firmicutes*, los miembros de este género son Gram positivos, anaeróbicos facultativos, ácido tolerantes, negativos a catalasa, son inmóviles y no forman endosporas, forman parte de la microbiota humana y se encuentran comúnmente en la boca, el tracto gastrointestinal y genitourinario.<sup>69</sup> El principal producto final del metabolismo de los *Lactobacillus* es el ácido láctico, también produce ácido acético que es un ácido graso de cadena corta (AGCC) y succínico en pequeñas cantidades.<sup>69,70</sup>

Los *Bifidobacterium* forman parte del filo Actinobacteria, son Gram positivos, anaeróbicos e inmóviles, se encuentran entre los primeros microorganismos en colonizar el tracto gastrointestinal humano<sup>71</sup> y al igual que los *Lactobacillus* producen ácidos orgánicos como productos terminales, entre los que se encuentran el ácido láctico y AGCC como el propiónico.<sup>69–72</sup>

Lo más común es que los probióticos se administren en combinaciones de dos o más cepas, aunque también pueden ser usados por separado. Cabe señalar que los efectos de los probióticos son muy específicos para cada cepa y no deben ser generalizados. Una misma cepa puede exhibir diferentes efectos cuando se usa individualmente o en combinación con otras.<sup>66</sup>

Los probióticos interactúan con el hospedero mediante diversos mecanismos, entre los que destacan: la modulación del sistema inmune, la regulación de funciones de las células epiteliales y la interacción con la microbiota intestinal existente.<sup>18,66</sup> Algunos probióticos pueden contribuir a la salud del hospedero promoviendo la función de barrera del epitelio intestinal y favorecer una respuesta antiinflamatoria disminuyendo la producción de citoquinas proinflamatorias.<sup>18,66,73</sup>

### ***Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y SNC**

Una revisión sistemática de los efectos de los probióticos en las funciones del SNC en animales y humanos encontró que los probióticos más usados fueron los *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. breve*, y *B. infantis*) y *Lactobacillus* (*L. helveticus* y *L. rhamnosus*), con dosis entre  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonia (UFC) durante 2 semanas en animales y 4 en humanos.<sup>19</sup>

En modelos animales estos probióticos aumentaron la locomoción, la memoria espacial y no espacial, la comunicación (vocalización ultrasónica), la regulación sensorial, así como disminución de los comportamientos asociados con ansiedad, depresión y trastorno obsesivo compulsivo.<sup>19</sup> En humanos los cambios conductuales no fueron significativos, pero sí disminuyeron la ansiedad en pacientes con síndrome de fatiga crónica, con una mejoría del estado de ánimo y memoria episódica según la escala Wechsler.<sup>19</sup> Entre otros efectos, destacan el aumento en las concentraciones plasmáticas de la citoquina antiinflamatoria IL-10 y la disminución de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 en pacientes con artritis reumatoide, el aumento en el número y actividad de células NK en sujetos fumadores, así como disminución de la concentración de cortisol salival en sujetos sanos.<sup>19</sup>

Entre los efectos observados por la administración de probióticos en modelos animales están: la disminución de las concentraciones séricas de corticosteroides por *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* y *L. casei Shirota*, la disminución de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) por *L. helveticus* y *L. fermentum*, la disminución de citoquinas inflamatorias (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y aumento de la citoquina antiinflamatoria (IL-10) por *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *B. longum*, y *L. rhamnosus*.

También se ha documentado que producen un incremento de monoaminas como serotonina (5-HT) y dopamina (DA) en la corteza prefrontal e hipocampo, acompañado de disminución de sus metabolitos por *L. plantarum*, *L. helveticus* y *B. infantis*; incremento en la expresión del receptor del neurotransmisor inhibitor

GABA en la región cortical (cíngulo y prelímbico) pero reducción en hipocampo, amígdala y *locus coeruleus* por *L. rhamnosus*; incremento del BDNF en el hipocampo y del mRNA de c-Fos, un factor de transcripción de genes de expresión rápida, en el núcleo paraventricular por *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *B. longum* y *C. butyricum*.

En humanos dos estudios encontraron niveles reducidos de cortisol en saliva y orina tras la administración de *L. casei* Shirota, *L. helveticus* junto con *B. longum* respectivamente. *L. casei* redujo las concentraciones séricas de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12, y produjo el incremento de la citoquina antiinflamatoria IL-10.<sup>19</sup>

### **Efecto antiinflamatorio y neuroprotector de los probióticos**

Entre los principales mecanismos de comunicación propuestos para explicar la influencia de la microbiota sobre el cerebro se encuentran: La síntesis y recambio de neurotransmisores, por ejemplo, dopamina, serotonina y GABA, además de factores neurotróficos como el BDNF,<sup>19</sup> así como la protección de la barrera intestinal a través de favorecer la integridad de las uniones estrechas,<sup>17</sup> la estimulación de las neuronas entéricas que transmiten información al SNC,<sup>13,74</sup> la producción de diversos metabolitos y la regulación de la respuesta inmune en la mucosa intestinal (figura 4).<sup>14,75,76</sup>

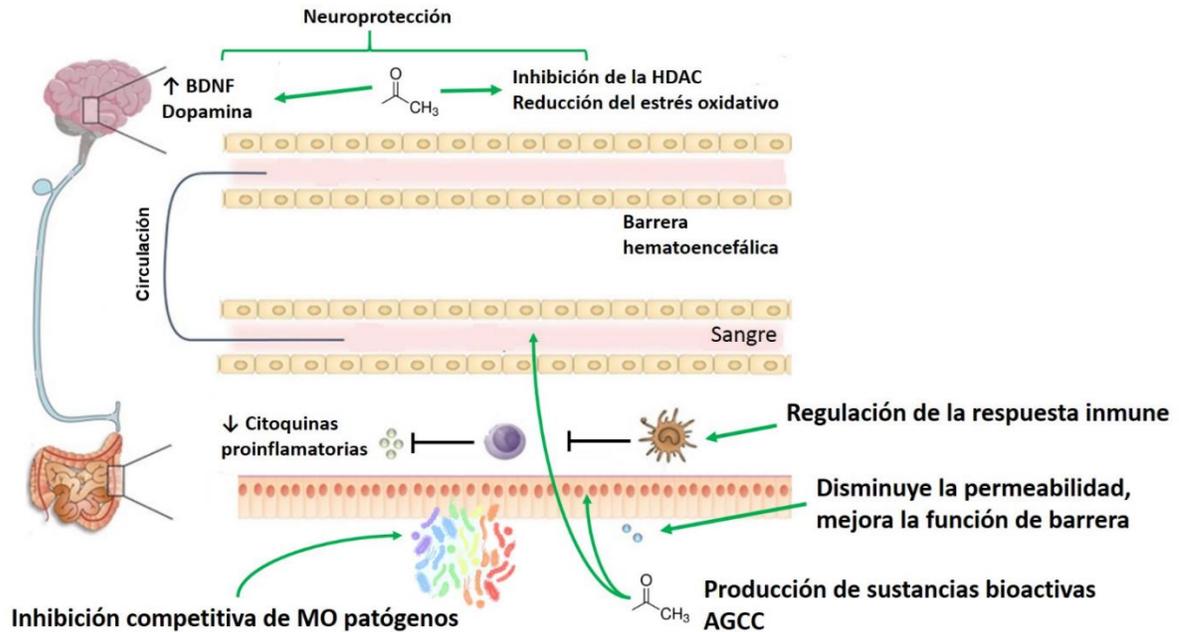
Entre los principales productos del metabolismo de las bacterias se encuentran los AGCC, como: los ácidos acético (2C), propiónico (3C) y butírico (4C). Si bien una parte de estos puede ser metabolizado por las células de la pared intestinal para la producción de energía, se ha demostrado que también pueden activar receptores acoplados a proteínas G (GPR41 y GPR43) e inhibir las desacetilasas de histonas (HDAC), favoreciendo la condensación de la cromatina que da como resultado una menor transcripción de genes, que inhibe la síntesis de factores como el NF- $\kappa$ B ejerciendo así un efecto antiinflamatorio.<sup>14,75</sup>

Con relación al sistema inmune se ha demostrado que los AGCC inducen la quimiotaxis y el incremento en la expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos; aunque existen discrepancias en cuanto a su efecto sobre la producción de ROS en los macrófagos, si disminuyen su producción de  $TNF\alpha$ , IL-6 y NO.<sup>77,78</sup> Existe algo de controversia en cuanto a la acción de los AGCC sobre la microglía y la producción de mediadores inflamatorios, pero la mayoría de los estudios señala que estos ácidos grasos atenúan su activación mediante un mecanismo relacionado con la inhibición de las HDAC.

### **Los probióticos en la enfermedad de Parkinson**

Las investigaciones referentes al efecto de la suplementación con probióticos en pacientes con EP son escasas. Al momento de iniciar este trabajo de tesis, una búsqueda en PubMed solo arrojó tres estudios clínicos donde a personas con EP se les administraron *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus acidophilus* más *Bifidobacterium infantis* o una bebida fermentada con mezcla de microorganismos, pero en todos estos trabajos los únicos parámetros evaluados fueron síntomas gastrointestinales, mejorando la consistencia de las heces, reduciendo la sensación de hinchazón, el dolor abdominal y el estreñimiento (figura 5).<sup>79-81</sup> Durante el curso de la investigación se publicaron dos ensayos clínicos aleatorizados doble ciego, en ambos, los pacientes con EP recibieron diariamente un tratamiento que consistía en una mezcla de *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*, y *L. fermentum* ( $2 \times 10^9$  UFC de cada uno) durante 12 semanas.<sup>82,83</sup> Borzabadi *et al.* encontraron que la suplementación con probióticos redujo la expresión de IL-1, IL-8 y  $TNF-\alpha$ ; y aumentó el factor de crecimiento transformante beta ( $TGF-\beta$ ) y el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR- $\gamma$ ) en células mononucleares de sangre periférica.<sup>82</sup> Tamtaji *et al.* (2019) reportan que la suplementación con estos probióticos logró reducir los trastornos del movimiento (The Movement Disorders Society-Unified

Parkinson's Disease Rating Scale), en el plasma redujeron la proteína C reactiva, el malondialdehído; a la vez que aumentó los niveles de glutatión.<sup>83</sup>

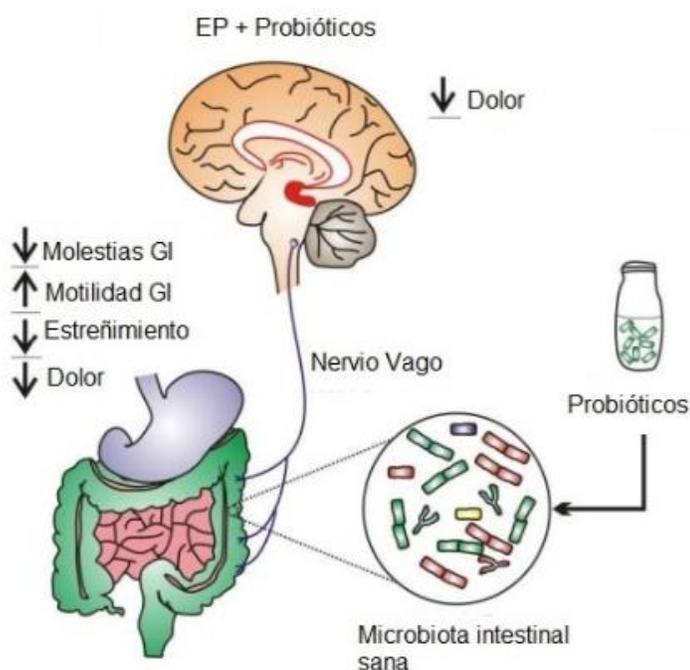


**Figura 4. Posibles acciones de los probióticos que contribuyen a la neuroprotección.** Los probióticos contribuyen a reducir la inflamación a la vez que aumentan los niveles de dopamina y de factores neurotróficos en el cerebro.

Existe evidencia epidemiológica que sugiere que tanto los bebedores de café o como los fumadores tienen un menor riesgo de padecer EP; una de las hipótesis propuestas de este efecto protector, es que modifican la composición de la microbiota intestinal de manera que disminuye la inflamación local y en consecuencia el plegamiento anómalo de la  $\alpha$ -SYN, con lo que se evitaría su propagación al SNC y se reduciría el riesgo de desarrollar la EP.<sup>84</sup> De ser cierta esta hipótesis la corrección de la disbiosis intestinal mediante la administración de probióticos sería una forma de prevenir el desarrollo de la EP.<sup>20</sup>

Lo anterior está apoyado por dos estudios preclínicos que también se publicaron mientras se realizaban los experimentos de esta tesis.

En el primero de ellos se encontró que probióticos como *Lactobacillus rhamnosus* LGG, *Bifidobacterium animalis lactis*, y *Lactobacillus acidophilus* ejercen un efecto neuroprotector en modelos de EP en ratones inducidos con las neurotoxinas dopaminérgicas 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) y rotenona, posiblemente mediado por el butirato.<sup>85</sup> En el segundo se usaron ratones transgénicos que desarrollaron EP y se encontró que el grupo que recibió la mezcla de probióticos constituido por *B. Bifidum*, *B. longum*, *L. rhamnosis*, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* LP28 y *Lactococcus lactis sub. Lactis*, tuvo una menor pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc.<sup>86</sup>



**Figura 5. Beneficios gastrointestinales reportados del consumo de probióticos en la EP.** El restablecimiento de la eubiosis por los probióticos podría contribuir a la reducción de los trastornos inflamatorios gastrointestinales, disminuyendo el riesgo de desarrollar la EP.<sup>79-81,84</sup> (Imagen adaptada de Felice *et al.*, 2016)

## OBJETIVOS

### General

Evaluar el efecto neuroprotector de la administración de *Lactobacillus rhamnosus* LGG y *Bifidobacterium lactis* BB-12 en un modelo de hemiparkinsonismo en ratas inducido por la inyección unilateral de 6-OHDA en el estriado.

### Específicos

- Determinar si la administración de *L. rhamnosus* LGG y *B. lactis* BB-12 disminuye la pérdida de neuronas dopaminérgicas, en un modelo de hemiparkinsonismo inducido en ratas mediante la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado.
- Determinar si la administración de *L. rhamnosus* LGG y *B. lactis* BB-12 reduce la activación de la microglía, en un modelo de hemiparkinsonismo inducido en ratas mediante la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado.
- Determinar si existe correlación entre la activación de la microglía y la pérdida de inervación dopaminérgica, en un modelo de hemiparkinsonismo inducido en ratas mediante la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado.
- Determinar si la administración de *L. rhamnosus* LGG y *B. lactis* BB-12 reduce la bradicinesia, la incoordinación motora y la lateralización en el uso de las extremidades anteriores, en un modelo de hemiparkinsonismo inducido en ratas mediante la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado.
- Determinar si la administración de *L. rhamnosus* LGG y *B. lactis* BB-12 atenúa la conducta de giro inducida por el agonista dopaminérgico apomorfina, que refleja un incremento de los receptores dopaminérgicos (supersensibilidad por denervación) en el hemisferio lesionado, en un modelo de hemiparkinsonismo inducido en ratas mediante la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado.

## HIPÓTESIS

La administración de *Lactobacillus rhamnosus* LGG y *Bifidobacterium lactis* BB-12 tiene un efecto neuroprotector manifestado por la reducción de la activación de la microglía, una reducción de la pérdida de neuronas dopaminérgicas y atenuando las alteraciones motoras causadas por la inyección de 6-OHDA en el estriado.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron ratas Wistar machos, adultas de 2 a 3 meses de edad, con pesos entre 250 a 300 gramos (el día de la cirugía), adquiridas del bioterio del Centro de Investigaciones Regionales (CIR) "Dr. Hideyo Noguchi" de la Universidad Autónoma de Yucatán (CIR-UADY). Fueron alojadas de manera individual en jaulas de policarbonato de 430 mm de largo x 220 mm de ancho x 210 mm de altura. Las ratas se mantuvieron en un cuarto a una temperatura controlada ( $25 \pm 2$  °C) con ciclos de luz-oscuridad de 12 x 12 h (las luces se encendían a las 7 horas).

Todos los procedimientos estuvieron acordes a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio", el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Yucatán, clave del proyecto: FMED-2019-0001 (se adjuntan los documentos en la sección anexos). Se detectó la presencia de helmintos intestinales del género *Syphacia* en las ratas del Bioterio del CIR y se tomaron las medidas necesarias para controlar esta parasitosis; el día en que las ratas eran llevadas al laboratorio se les realizó una prueba de Graham para determinar si estaban o no infestadas. Considerando que esta prueba puede dar falsos negativos, durante el período de habituación a todos los animales se les administró fenbendazol (12 mg/kg) por vía oral durante 10 días, lo cual se ha reportado que erradica los helmintos adultos y mata sus huevos.<sup>87</sup> El fenbendazol carece de toxicidad en ratas y se ha documentado que la administración de estas dosis no modifica el comportamiento de esta especie en diversas pruebas conductuales.<sup>88</sup>

Para asegurar que el fenbendazol haya sido eliminado totalmente al momento de iniciar los tratamientos, desde la última dosis del antiparasitario se dejó transcurrir al menos 3 días antes de iniciar el tratamiento con probióticos. Desde el día en que se llevaron al laboratorio se inició un registro de la ganancia de peso de las

ratas, dos veces a la semana, con la finalidad de proyectar la fecha en que alcanzarían el peso adecuado para iniciar las dos semanas de tratamiento y programar la cirugía. La dieta proporcionada fue LabDiet® 5001 de la marca Purina. El alimento y el agua potable para beber se administraron *ad libitum*.



**Figura 6. Metodología general.** Se trabajó en grupos de 6 a 12 ratas, se consideró el día de cirugía como referencia para las actividades a realizarse en cada ciclo experimental. AG: Aceite de girasol, PE: Pasarela elevada, Hemi: Hemiesfera, Cx: Cirugía estereotáxica, Sx: Sacrificio, IHQ: Inmunohistoquímica.

### Grupos experimentales

Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos experimentales (Tabla 1), de acuerdo a si se les inyectó 6-OHDA o solución salina 0.9% + ácido ascórbico al 0.2% (falsa lesión) y si se administró la suspensión de probióticos (Microbiot pediátrico ®) o el placebo constituido de aceite de girasol (AG) + alimento estándar.

**Tabla 1. Distribución de los grupos experimentales.**

Grupo	Tratamientos	Código
1	Lesión con 6-OHDA + Probióticos	6-OHDA + Prob
2	Lesión con 6-OHDA + Placebo	6-OHDA + AG
3	Falsa lesión con solución salina + Probióticos	Sal + Prob
4	Falsa lesión con solución salina + Placebo	Sal + AG

## Probióticos

El tratamiento con probióticos consistió en la administración diaria de 300 µL de Microbiot pediátrico®, que contiene  $1 \times 10^9$  UFC de *Lactobacillus rhamnosus* LGG y  $1 \times 10^9$  UFC de *Bifidobacterium Lactis* BB-12, los cuales están suspendidos en 215 µL de aceite de girasol adicionado con 0.19 mg de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol). Esta cantidad se determinó con base en ensayos preliminares para garantizar la administración de 250 mg del producto, considerando el peso de este volumen, el residuo que permanece en la cánula y las posibles pérdidas durante el consumo voluntario.

## Placebo

El placebo consistió en la administración de 300 µL de una mezcla de alimento estándar para roedor pulverizado y suspendido en aceite de girasol marca Campo Vivo®, al cual se le adicionó  $\alpha$ -tocoferol (E-FERTOOC vitae®) a la misma concentración que la declarada en la etiqueta de Microbiot pediátrico®. La concentración del alimento (10 % m/v) en el aceite de girasol fue la misma que la proporción del residuo sólido de Microbiot pediátrico®. La mezcla con el alimento estándar se realizó para mejorar la palatabilidad y aceptación del tratamiento, sin alterar el experimento, ya que es el mismo alimento que los animales consumían.

**Tabla 2. Contenido nutrimental del placebo** (preparado para semejar las características señaladas en Microbiot pediátrico®)

Nutrimento	En 10 mL
Alimento estándar pulverizado	1 g
Vitamina E	7.455 mg ( $\alpha$ -tocoferol)
Aceite de girasol	Aforar a 10 mL

Se ha reportado que el tratamiento con vitamina E durante un mes, a la dosis de 50 UI/Kg/día tiene un efecto neuroprotector contra la inyección intraestriatal de 6-

OHDA; esta dosis corresponde a 33 mg/Kg/día, la cual es muy superior a la que fue administrada (0.81 mg/Kg/día) con los probióticos o el placebo, por lo que no se espera que haya influido en los resultados del presente estudio.<sup>89,90</sup>

### **Cirugía estereotáxica**

Las ratas fueron anestesiadas con 50 mg/kg i.p. de pentobarbital sódico (Pisabental®) y en caso de necesitar una segunda dosis, se administraron 15 mg/kg (aproximadamente 45 min después de la primera). Para inhibir las secreciones bronquiales por efecto de la anestesia se administró 0.1 mg/kg de atropina (Atro Ofteno 1 %®) por vía i.m. Cuando la rata quedó sedada se le depiló la zona superior de la cabeza. Antes de iniciar la cirugía siempre se verificó la profundidad de la anestesia pellizcando la cola y cuando la rata ya no la retiraba, se procedió a inmovilizar la cabeza del animal en el equipo estereotáxico (figura 7A), con las barras auriculares en los conductos auditivos óseos y la barra de los incisivos situada a una altura de -3.3 mm.<sup>91</sup>

Seguidamente se colocó un campo estéril sobre el cuerpo del animal, con una abertura a nivel de la zona depilada, sobre la cual se aplicó una solución antiséptica (benzalconio). Hecho lo anterior, se realizó un corte sagital en la piel para exponer el cráneo y visualizar el punto donde convergen las suturas óseas sagital y coronal (Bregma), el cual sirvió como referencia para calcular las coordenadas: anteroposterior (AP = +0.2 mm) y lateral (L = -3.5 mm) para ubicar el sitio para trepanar el cráneo. Hecho lo anterior, se hizo descender la aguja hasta tocar la superficie de la duramadre y se calculó la coordenada dorsoventral (DV = -4.0 mm) para introducir la punta de la aguja Hamilton® en la región dorsolateral del estriado derecho.

El atlas del cerebro de la rata albina de Paxinos y Watson<sup>91</sup> se usó para identificar las coordenadas óptimas para realizar la inyección en el estriado dorsolateral, el cual se eligió intencionalmente por que se ha reportado que en esa zona (figura 7B) se localizan las neuronas estriatales que disparan potenciales de acción

cuando la rata camina.<sup>92</sup> Lo anterior fue para aumentar las posibilidades de producir deficiencias motoras con la 6-OHDA, lo cual en efecto sucedió. Una vez que la punta de la aguja estuvo situada en las coordenadas deseadas, manualmente se inyectaron 3.5  $\mu\text{L}$  de la solución de 6-OHDA conteniendo 2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de la base libre (D-014, Biochemical Research Inc. RBI, Lot LX-III-09) o del vehículo (solución salina 0.9 % + ácido ascórbico al 0.2 %), a una velocidad de 0.05  $\mu\text{L}$  cada 5 segundos; al terminar se dejó en posición la aguja durante 5 minutos para permitir la difusión de la solución en el tejido cerebral.

En total se inyectaron 8.75  $\mu\text{g}$  de 6-OHDA, dosis que fue seleccionada porque un estudio reportó que inyectándola en el estriado produjo una denervación dopaminérgica suficiente para que la administración de apomorfina causara una conducta de giro contralateral.<sup>93</sup> Después de extraer la aguja se limpió la herida con un hisopo esterilizado y se suturó con catgut crómico (calibre 2-0), después de lo cual se aplicó nuevamente la solución antiséptica de benzalconio. Para evitar la hipotermia se dejó al animal en recuperación bajo una lámpara incandescente, colocada a 20 cm de distancia, hasta que el animal recuperó la consciencia.<sup>93</sup>



**Figura 7. Cirugía estereotáxica y selección del área de lesión. (A)** Montaje para la cirugía estereotáxica y la inyección en el estriado. **(B)** Diagrama ilustrando la zona del estriado (delimitada en rojo) donde las neuronas disparan potenciales de acción cuando la rata camina.

### **Pruebas conductuales empleadas para valorar la lesión dopaminérgica**

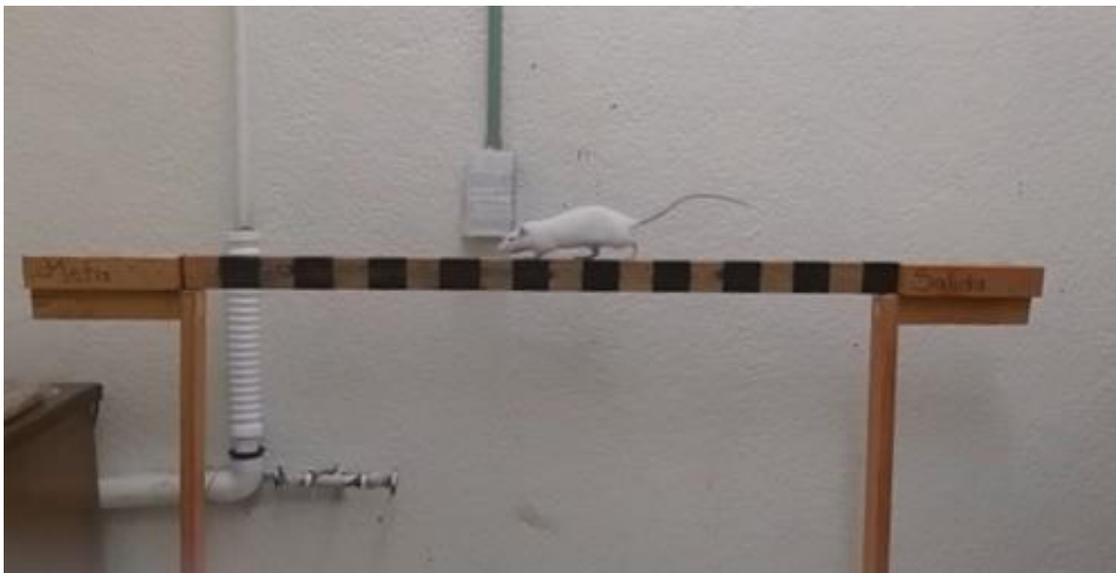
La conducta implica una respuesta integrada y compleja que refleja el intercambio de información entre los conjuntos de neuronas del sistema nervioso central (SNC) que están involucradas en la ejecución de un comportamiento particular. Constituye un parámetro útil y económico de medición para las alteraciones motoras causadas por la lesión de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. Para evitar sesgos durante estas mediciones, se tomaron las medidas necesarias para minimizar los factores que pudieran modificar el comportamiento de las ratas durante el experimento, de manera que los datos obtenidos fueran los más confiables. Considerando lo anterior, el día de las pruebas conductuales se permitió que las ratas se adaptaran al menos 30 minutos al entorno del cuarto de experimentación (que es distinto al cuarto de alojamiento). Se evitaron los ruidos y los olores intensos y los animales fueron manipulados con gentileza para evitar estresarlos. Todas las pruebas se hicieron en el mismo orden: caminata en la pasarela estrecha, uso de las extremidades anteriores en el cilindro y conducta de giro inducido por apomorfina (hemiesfera) y fueron realizadas por la misma persona, en un horario comprendido entre las 9 y las 14 horas.

Se usaron 3 pruebas para evaluar las alteraciones motoras; la pasarela estrecha elevada realizó los días -14, -1, +7, +14 y +21; el cilindro los días -14, -1, +10 y +21 y la conducta de giro en la hemiesfera los días -1, +7, +14 y +21, todas ellas con respecto al día de la cirugía estereotáxica (día 0). Cada una se describe con más detalle en las secciones siguientes.

### **Prueba de la pasarela estrecha elevada**

Esta prueba conductual se fundamenta en el instinto natural de la rata para alejarse de lugares abiertos hacia una zona segura, en este caso representada por su jaula de alojamiento. Se esperaba que las ratas sanas realizaran esta tarea en forma rápida y sin contratiempos, mientras que las hemiparkinsonianas tendrían dificultades para abandonar la plataforma inicial o disminución de su velocidad para completar el recorrido.<sup>94</sup>

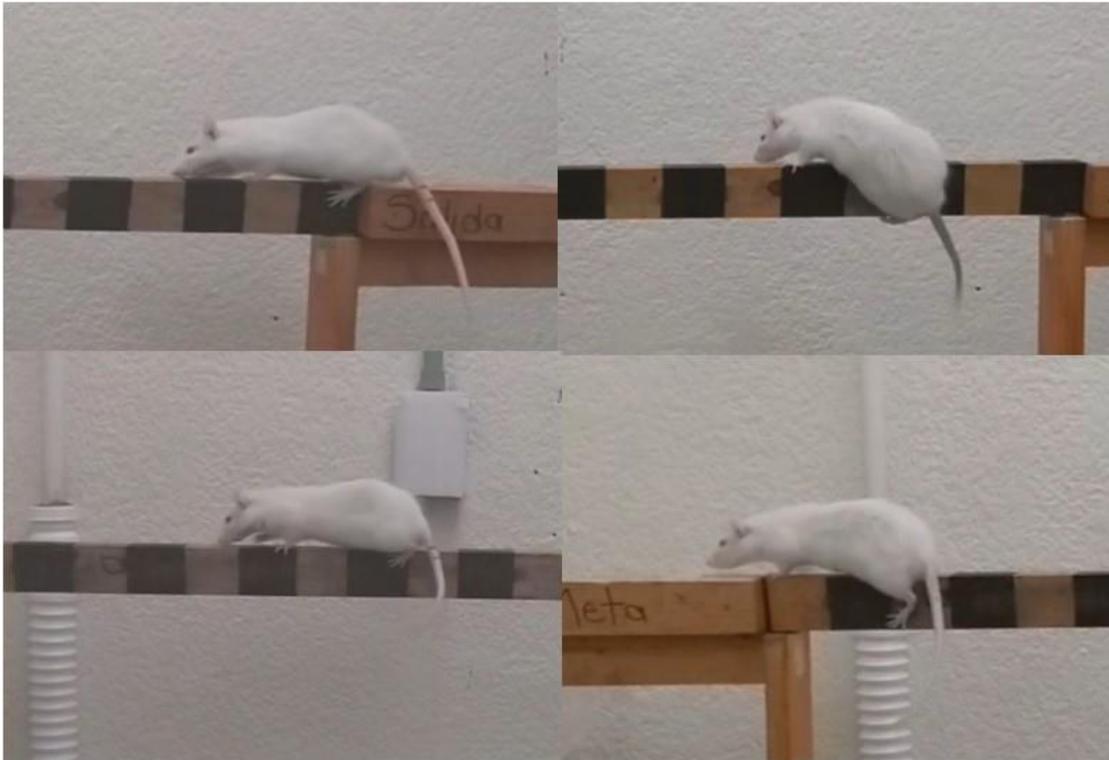
La pasarela estrecha elevada consistió en un travesaño de madera de 100 cm de longitud, 2 cm de ancho y 5 cm de altura, el cual estaba suspendido a un metro de altura sobre el piso. En cada extremo había plataformas de 12 cm de longitud, 7.5 cm de ancho y 5 cm de grosor (Fig. 8). Una de las plataformas era considerada de salida donde se depositaba a la rata y la otra era la plataforma meta, la cual estaba próxima a su jaula de alojamiento habitual. Para evitar que la rata se lesionara en caso de caerse de la pasarela, al nivel del piso se colocó una colchoneta de hule espuma de 10 cm de espesor para amortiguar el impacto.



**Figura 8. Ejemplo de recorrido normal en la prueba de la pasarela estrecha elevada**

El procedimiento para a realizar la prueba fue el siguiente:

1. En un día determinado, la prueba consistió en 5 intentos consecutivos, en los que la rata atravesara la pasarela sin interrupción, desde la salida hasta la meta.
2. Todos los intentos fueron filmados para su posterior análisis, con la cámara orientada para filmar el lado hemiparkinsoniano del cuerpo, en este caso el izquierdo (Fig. 8); de esta forma fue posible apreciar mejor los fallos durante el recorrido.
3. Cada intento iniciaba al liberar a la rata en la plataforma de salida, con su hocico apuntando en dirección contraria a la plataforma meta.
4. Si la rata se caía antes de abandonar la plataforma de salida, durante el recorrido o regresaba a la plataforma de salida antes de concluir el recorrido, el intento se consideraba inválido y se repetía.
5. En una etapa posterior los videos fueron analizados para cuantificar dos variables de interés: (a) el tiempo de recorrido, definido como los segundos transcurridos desde que la rata ponía una de sus extremidades anteriores sobre la pasarela estrecha hasta que apoyara cualquiera de sus extremidades anteriores sobre la plataforma meta y (b) los fallos cometidos al realizar el recorrido, los cuales fueron definidos como: el apoyo claramente identificable de cualquiera de las extremidades contralaterales anteriores o posteriores (izquierdas) de la rata, sobre el costado lateral de la pasarela estrecha (lado ancho de 5 cm) (Fig 9).<sup>95</sup>
6. Si el observador veía que la rata asentaba una de sus extremidades anteriores sobre la pasarela estrecha, pero inmediatamente regresaba a la plataforma de salida, se reiniciaba el conteo del tiempo de recorrido, de acuerdo a los criterios anteriores.



**Figura 9. Ejemplos de fallos en la extremidad izquierda durante el recorrido en la pasarela estrecha.**

De acuerdo a la bibliografía, una sesión de entrenamiento es suficiente para asegurar el óptimo desempeño en esta prueba,<sup>94</sup> por lo que el día -15 se realizó el entrenamiento, consistente en hacer que la rata realizara el número de intentos necesarios hasta lograr que recorriera completamente la pasarela 5 veces. Para facilitar el aprendizaje y condicionar su desplazamiento hacia la meta, durante el entrenamiento algunas ratas fueron liberadas a la mitad de la pasarela estrecha con el hocico orientado hacia la meta. Posterior a la cirugía, durante los intentos en la pasarela algunas ratas no abandonaban la plataforma de salida; en estos casos, para estimular la caminata fue suficiente levantar ligeramente la cola del animal; se evitaron estímulos más fuertes, como pellizcar la cola o empujarla, puesto que la rata se podría estresar y comprometer los resultados obtenidos.

## Prueba del cilindro

Cuando una rata es confinada en un espacio limitado su tendencia natural es explorarlo, desplegando una conducta de exploración vertical, la cual consiste en erguirse sobre sus patas traseras mientras que apoya sus patas delanteras sobre las paredes del cilindro, con las cuales realiza movimientos de desplazamiento lateral que requieren un cambio en el punto de apoyo de su peso, similar al desplazamiento de los pies durante la marcha en los humanos. En esta prueba se valora el porcentaje de asimetría según el número de veces que la rata apoya las extremidades anteriores (derecha, izquierda o ambas) en las paredes del cilindro durante la exploración vertical mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de asimetría} = \frac{(\text{Ipsi} + \frac{(\text{Ambas})}{2})}{\text{Apoyos totales}} * 100$$

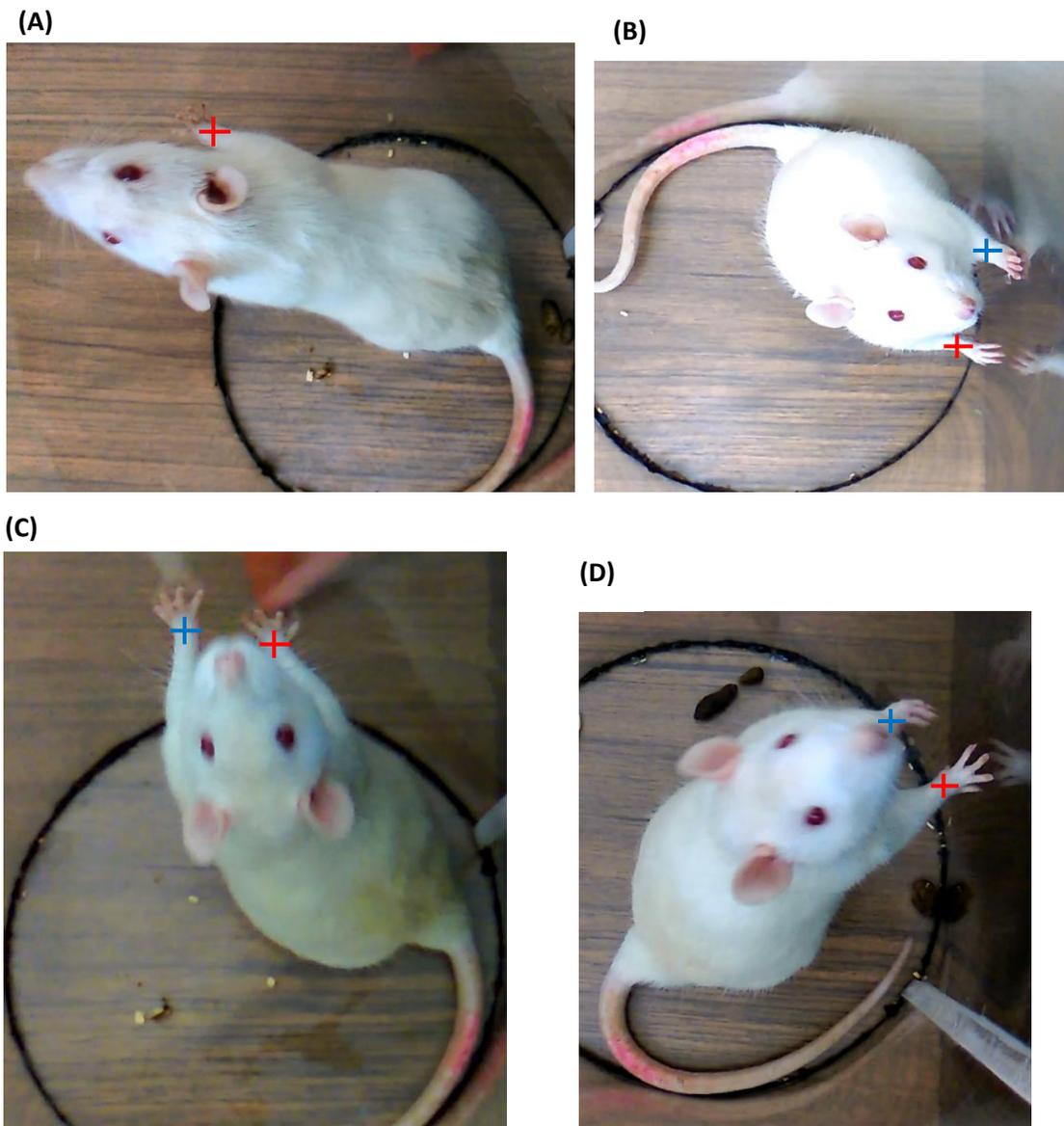
En ratas normales el número de veces que apoyan las patas derecha e izquierda en las paredes del cilindro es similar (simetría), mientras que en las ratas hemiparkinsonianas se reduce el uso de la pata contralateral al lado lesionado con 6-OHDA, y aumenta el número de apoyos con la pata ipsilateral, es decir, se produce una asimetría en el uso de las patas anteriores.<sup>96</sup> Para evaluar esta conducta se empleó un cilindro de acrílico transparente de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura.

El procedimiento para a realizar la prueba fue el siguiente:

1. La rata fue liberada dentro del cilindro y desde arriba se filmó su comportamiento durante al menos 10 minutos.
2. Durante la prueba la rata exploró hacia arriba, apoyando las extremidades delanteras de manera individual, o de manera simultánea, debiendo ocurrir un mínimo de 20 contactos en la pared para que la prueba se considere válida.<sup>96</sup>

Para contabilizar el apoyo de las extremidades anteriores se consideraron los siguientes criterios (Fig.10):

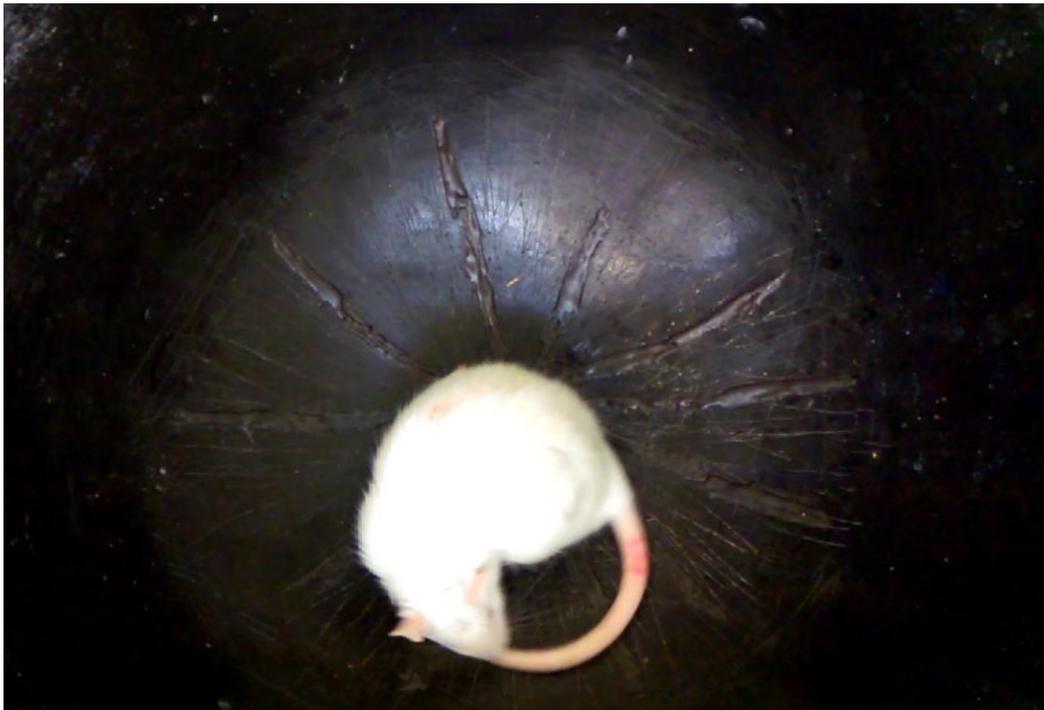
1. El conteo se inició cuando una pata hizo contacto con el cilindro.
2. Si un movimiento fue ambiguo (no se pudo determinar con precisión la extremidad empleada) no consideró en el conteo (Fig. 10A).
3. Después de que una pata hacía contacto, la colocación retardada (al menos 0.5 segundos) de la otra extremidad se consideró un movimiento adicional y se contabilizó como un evento simultáneo para ambas extremidades.
4. Si una pata hacia múltiples contactos, separando y apoyando sin usar la otra extremidad, todos los movimientos de la pata apoyada se consideraron como contactos independientes, hasta que apoyó simultáneamente la otra extremidad, lo que se contabilizó como una medición para ambas patas o que la exploración se detuvo.
5. Si una extremidad permanecía apoyada en la pared mientras que con la otra hacía múltiples contactos, se consideró como una única medición para ambas extremidades.
6. Si durante la exploración de la pared del cilindro la rata se desplazaba lateralmente, alternando las dos extremidades, se consideraron como eventos simultáneos para ambas patas.
7. Si al concluir la exploración la rata descendía alternando las extremidades delanteras para recargar su peso en las paredes del cilindro, cada combinación de las patas delanteras, se consideró como eventos simultáneos para ambas patas.
8. Si la rata descendió y reanudó inmediatamente la exploración de la pared del cilindro se contabilizó como un nuevo evento, de acuerdo a los criterios anteriores.
9. Si ambas extremidades estaban en contacto con la pared y retiró una de ellas durante más de 0.5 segundos, se consideró como otro evento y se contabilizó un apoyo para la extremidad que permanecía en contacto.



**Figura 10. Ejemplos de la actividad exploratoria en la prueba del cilindro.** (A) Contacto ambiguo, en el que no se puede asegurar si la extremidad izquierda está haciendo o no contacto con las paredes del cilindro (estos contactos fueron descartados); (B) Contacto de la extremidad contralateral (pata izquierda marcada con una cruz azul), (C) contacto de ambas extremidades, (D) contacto de la extremidad ipsilateral (pata derecha marcada con una cruz roja).

### **Giro inducido por apomorfina**

Esta prueba, a diferencia de las otras, no se basa en una conducta espontánea, sino que es inducida farmacológicamente. Los animales con lesión unilateral de la vía nigroestriatal muestran una conducta de rotación en dirección contraria (contralateral) al lado de la lesión cuando reciben agonistas de los receptores dopaminérgicos, como la apomorfina. Esta rotación contralateral se atribuye a un incremento del número de receptores dopaminérgicos en el estriado ipsilateral a la lesión como consecuencia de la pérdida de inervación dopaminérgica, fenómeno conocido como supersensibilidad por denervación.<sup>97</sup> Para facilitar la conducta, las ratas fueron colocadas dentro de una hemiesfera de 40 cm de diámetro (Fig. 11) y su comportamiento se filmó durante los 5 minutos previos y los 60 minutos posteriores a la inyección subcutánea de apomorfina (0.25 mg/kg) en la base del cuello.



**Figura 11. Giro contralateral inducido por apomorfina en una rata con denervación dopaminérgica en el estriado derecho.**

El procedimiento para a realizar la prueba fue el siguiente:

1. Se realizaron dos grabaciones, la primera de 5 minutos tuvo como objetivo ver si la rata realizaba giros espontáneos, antes de inyectar la apomorfina, los cuales no se contabilizaron en el total.
2. Concluida la primera grabación se administró apomorfina (0.25 mg/kg, s.c.) e inmediatamente se grabaron otros 60 minutos.

Los giros se contabilizaron de la siguiente manera:

- 1) Al liberar a la rata en la hemiesfera se ubicó la orientación de su hocico como punto inicial de referencia.
- 2) Se consideró una vuelta completa cuando a partir del punto de referencia la rata efectuó un giro de 360°, sin cambiar de dirección.
- 3) Si la rata se detuvo durante el giro y tomó una dirección contraria, el punto en el que detuvo su hocico se consideró como la nueva referencia para contabilizar un giro completo, siempre y cuando la rata haya girado al menos 90° en dirección contraria hacia la que estaba girando previamente.
- 4) Se consideraron giros contralaterales aquellos realizados en dirección opuesta al hemisferio cerebral donde se inyectó la 6-OHDA o el vehículo (en este estudio siempre se inyectó en el hemisferio derecho) y giros ipsilaterales los realizados hacia el hemisferio cerebral donde se aplicó la inyección.<sup>98</sup>

### **Fijación del cerebro mediante perfusión por vía intracardiaca**

Concluidas las pruebas conductuales, el día +22 se administró a las ratas una sobredosis de barbitol sódico (580 mg/kg i.p.) y una vez que estuvieron completamente anestesiadas se procedió a realizar la perfusión intracardiaca con 250 mL de PBS 0.1 M (pH 7.4) a 4 °C, seguido inmediatamente por 200 mL de una solución de paraformaldehído al 4%, en PBS a 4 °C. Al finalizar la perfusión se extrajo el cerebro, el cual se mantuvo en esta misma solución a temperatura ambiente durante 24 horas más. Posteriormente se sumergió el cerebro en una solución de sacarosa al 15 % en PBS durante al menos 12 horas.<sup>99</sup> Cuando por algún motivo no se hicieron de inmediato los cortes histológicos, los cerebros se mantuvieron a 4 °C en la solución de sacarosa, a la cual se le añadió azida de sodio al 0.2% para prevenir el crecimiento microbiano.

### **Obtención de cortes de estriado y sustancia *nigra***

Transcurridas las 12 horas, cuando el cerebro ya había embebido la solución de sacarosa, se procedió a realizar cortes coronales de 70 µm de grosor, empleando un Vibratomo 1000 plus® (Peleo Instruments, USA). Para ello primero se separó la porción anterior del cerebro haciendo un corte coronal a 8 mm por delante del cerebelo. El bloque anterior del cerebro (con el estriado) se fijó a la platina del vibratomo con pegamento de cianoacrilato, con la corteza cerebral orientada hacia la navaja. Para poder diferenciar entre los hemisferios derecho e izquierdo, con una aguja de grueso calibre se realizó una muesca en la corteza cerebral del hemisferio izquierdo (Fig. 12).

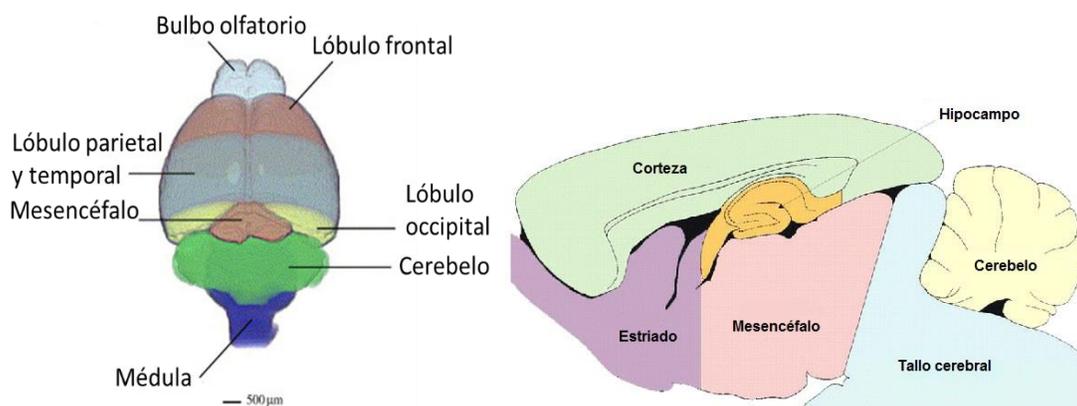
Para que el tejido se endureciera más la platina se llenó con solución PB 0.1 M a 4 °C, el cual se reemplazaba periódicamente con nueva solución fría. Antes de empezar a coleccionar las rebanadas, primero se removieron 3.5 mm del polo cerebral anterior, empezando desde el bulbo olfatorio hasta que fue visible el polo frontal del estriado. Se recolectaron 24 cortes de 70 µm del estriado,

colocándolos por pares y en forma seriada en pocillos de recolección conteniendo 1 mL de PB con azida de sodio (0.2%) a temperatura ambiente. El mismo procedimiento se realizó con el bloque posterior del cerebro, excepto que los cortes se hicieron en sentido caudal-rostral, removiendo primero el cerebelo y el tallo cerebral para dejar únicamente el mesencéfalo donde se localiza la sustancia *nigra* (Fig. 13); el hemisferio izquierdo de este bloque se marcó haciendo una muesca lateral al acueducto de Silvio.



**Figura 12. Obtención de cortes para la IHQ.** El bloque del tejido cerebral se adhería a la platina del vibratomo y se marcaba el hemisferio no lesionado con una muesca en la corteza.

La caja de los pocillos fue etiquetada con el código de la rata, las fechas de la perfusión y en que se realizaron los cortes, la cual se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta el momento en que se realizó la inmunohistoquímica (IHQ).



**Figura 13. Regiones del cerebro de la rata.** Ubicación del estriado y el mesencéfalo donde se localiza la SNpc, regiones que fueron cortadas y procesadas para la IHQ anti-TH y anti-Iba1.

### Inmunohistoquímica.

Se realizó la inmunohistoquímica para detectar a las neuronas que expresan la tirosina hidroxilasa (TH<sup>+</sup>) o la microglía, que cuando está activada aumenta su expresión de la molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (Iba1<sup>+</sup>); la metodología se describe a continuación:

1. Se inspeccionaban microscópicamente las rebanadas de estriado para seleccionar un par de cortes adyacentes, en los cuales fuera visible la trayectoria de la lesión mecánica de la inyección. Para la sustancia *nigra* se seleccionaron pares de cortes seriados de sus regiones rostral, medial o caudal, de acuerdo al atlas del cerebro de la rata de Paxinos y Watson.<sup>91</sup>
2. De cada par de cortes del estriado o de la sustancia *nigra*, uno fue asignado para realizar la IHQ de TH para medir el área de innervación dopaminérgica en el estriado o contabilizar a las neuronas dopaminérgicas en la SNpc y el otro corte, adyacente al anterior, para el inmunomarcaje de Iba1 para cuantificar la microglía.
3. Los cortes fueron distribuidos en los pocillos de placas de recolección con 1 mL de PBS 0.1 M (pH 7.4), colocando el corte de estriado y la *nigra*

medial en un pozo y las *nigras* rostral y caudal en otro. Se usaron pocillos diferentes para los inmunomarcajes de TH e Iba1

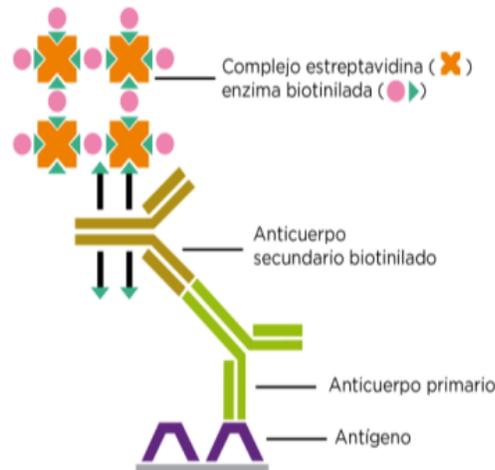
4. Se realizaron tres lavados de 10 minutos c/u con 1 mL de PB 0.1 M a temperatura ambiente. Entre cada uno de los siguientes pasos intermedios del procedimiento también se realizaron estos lavados, para eliminar el excedente de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), solución de bloqueo o de anticuerpo no unido.
5. Posteriormente, para inhibir la actividad de peroxidasa endógena, se incubaron durante 60 minutos en 0.3 mL de solución BLOXALL (Vector Labs. Cat. No: SP-6000).
6. Las rebanadas fueron incubadas en 0.3 mL de solución de bloqueo (suero de caballo al 10 % + Tritón X-100 al 0.5% + azida de sodio 0.1 %, en PB pH 7.4), durante 2 horas en agitación continua, a temperatura ambiente.
7. Posteriormente las rebanadas se incubaron en 0.3 mL de solución de bloqueo con el anticuerpo primario anti-TH [rabbit policlonal IgG, Cat. # sc-14007, Santa Cruz, USA], a una dilución 1:3000, durante 48 horas en agitación continua, a 4 °C.
8. Los siguientes pasos se realizaron con reactivos del Universal Quick kit de Vector (Cat. PK-7800).
9. Incubación durante 10 minutos con el suero de bloqueo prediluido (0.3 mL por poza), en agitación a temperatura ambiente.
10. Incubación durante 2 h con el Ab secundario universal biotinilado (0.3 mL por poza), en agitación a temperatura ambiente.
11. Incubación durante 30 minutos con la solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP, 0.3 mL por poza), en agitación a temperatura ambiente.
12. Para el revelado se añadió a cada pocillo 0.5 mL de la solución DAB con  $H_2O_2$ , procurando que cubriese por completo las rebanadas, dejando incubar en agitación continua a temperatura ambiente durante el tiempo

necesario para obtener una buena marca (aproximadamente 8 minutos de tiempo de revelado); cuando ocurrió lo anterior la reacción se detuvo retirando la solución de DAB y añadiendo PB frío.

13. Posterior al revelado se realizaron tres lavados con PB 0.1 M por 5 minutos cada uno.

El protocolo de inmunomarcaje para Iba1 fue el mismo anteriormente descrito (Fig. 14), excepto que el anticuerpo primario usado fue anti-Iba1 [rabbit policlonal IgG, Cat. # 019-19471, Wako, Japón] a una dilución de 1:5000 y el tiempo de revelado fue máximo de 10 minutos.

Al finalizar la IHQ las rebanadas fueron colocadas en laminillas gelatinizadas, dejándolas secar al menos 24 horas para obtener una máxima adherencia. Posteriormente fueron cubiertas con medio de montaje PermOUNT™, se les colocó un cubreobjetos y se les dejó secar al menos 48 horas antes de retirar el excedente del medio de montaje y limpiarlas para su posterior fotografía.



**Figura 14. Fundamento de la técnica ABC para la IHQ.** El anticuerpo primario reconoce a la proteína de interés, en este caso TH o Iba1, el anticuerpo secundario está conjugado con biotina y se une al primario. La estreptavidina está conjugada con peroxidasa de rábano. La estreptavidina tiene una gran afinidad por la biotina, y al unirse sirve como puente entre el anticuerpo secundario y la enzima encargada de formar el cromóforo.

### **Plan de procesamiento, análisis de datos y presentación de resultados**

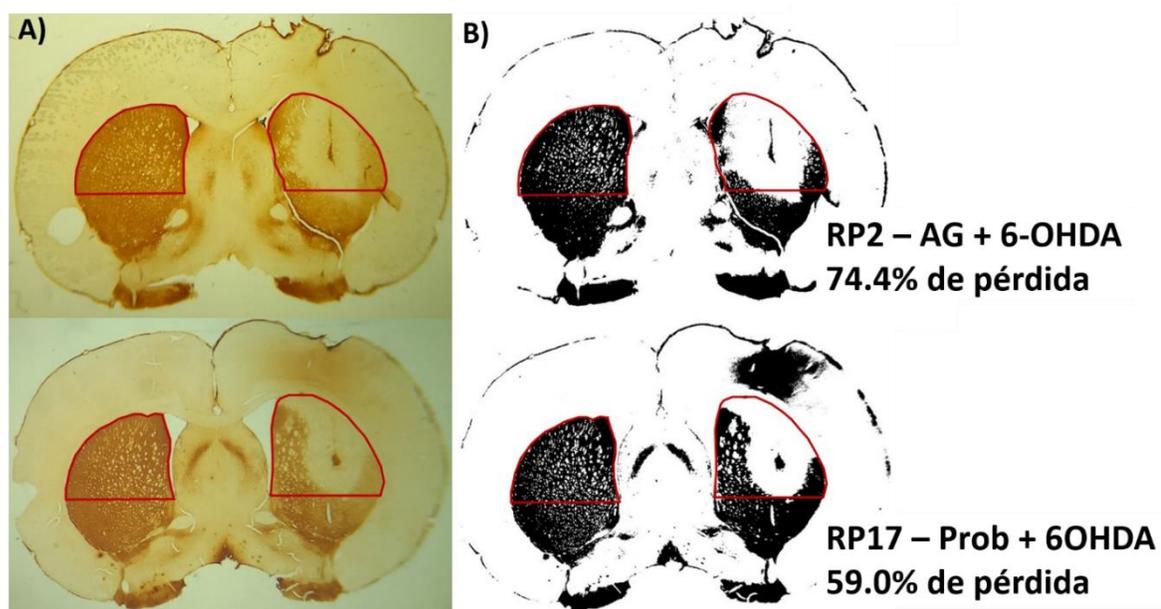
Los videos de las pruebas conductuales fueron analizados en cámara lenta, usando el programa Windows Movie Maker 12; los datos del análisis de conducta de cada rata fueron registrados en hojas de cálculo del programa Microsoft Excel 2010.

Para el análisis de la IHQ de TH e Iba1 de los cerebros, los cortes inmunoteñidos se fotografiaron con una cámara digital de 16 megapíxeles, en un microscopio Olympus SZ-PT o uno Motic B3 Professional Series. Para garantizar la uniformidad en los tonos de color de las imágenes fotográficas de los cortes de una misma región del cerebro (estriado o *nigra*) y procesadas con idéntica IHQ (TH o Iba1), las fotografías de los cortes procedentes de distintas ratas fueron tomadas en una sola sesión, utilizando los mismos valores para el brillo, foco y aumento del microscopio utilizado. Para capturar las imágenes del estriado se empleó un aumento de 1.8X en el microscopio Olympus SZ-PT, manteniendo siempre en 10 la potencia de la iluminación,

### **Análisis de la inmunorreactividad a TH en las rebanadas cerebrales**

El software FIJI 1.52P se usó para analizar las fotografías, las cuales fueron primero transformadas a imágenes de 8 bits, en tonos de color gris. Con la finalidad de evitar sesgos en la medición del área TH<sup>+</sup> en el estriado, en todos los cortes de esta región se seleccionó un área fija, delimitada por una línea recta horizontal trazada desde el vértice inferior del ventrículo cerebral correspondiente a cada hemisferio hasta el cuerpo caloso y luego una línea curva bordeando el cuerpo caloso y el ventrículo cerebral (Fig. 15A); el área del estriado así seleccionada en cada hemisferio (derecho e izquierdo) fue guardada en el programa FIJI como una región de interés (RDI). Posteriormente, en la RDI se seleccionó el umbral de inmunodetección (imagen binaria en blanco y negro) verificando visualmente que hubiese buena concordancia de los píxeles oscuros

en la zona del estriado delimitada en el hemisferio izquierdo (sano) con la imagen original a color; el valor de este umbral también fue registrado. Para cada rata se calcularon las áreas TH<sup>+</sup> en ambos estriados utilizando el número de píxeles en la RDI que estaban por arriba del umbral seleccionado; para ello, el valor del estriado izquierdo (sano) se consideró como el 100% y el valor del estriado derecho (que recibió la inyección) se expresó como un porcentaje del lado sano. Finalmente, sacando la diferencia entre ambos porcentajes se obtuvo el porcentaje de pérdida de inervación dopaminérgica en el estriado derecho (Fig. 15B).<sup>93</sup>

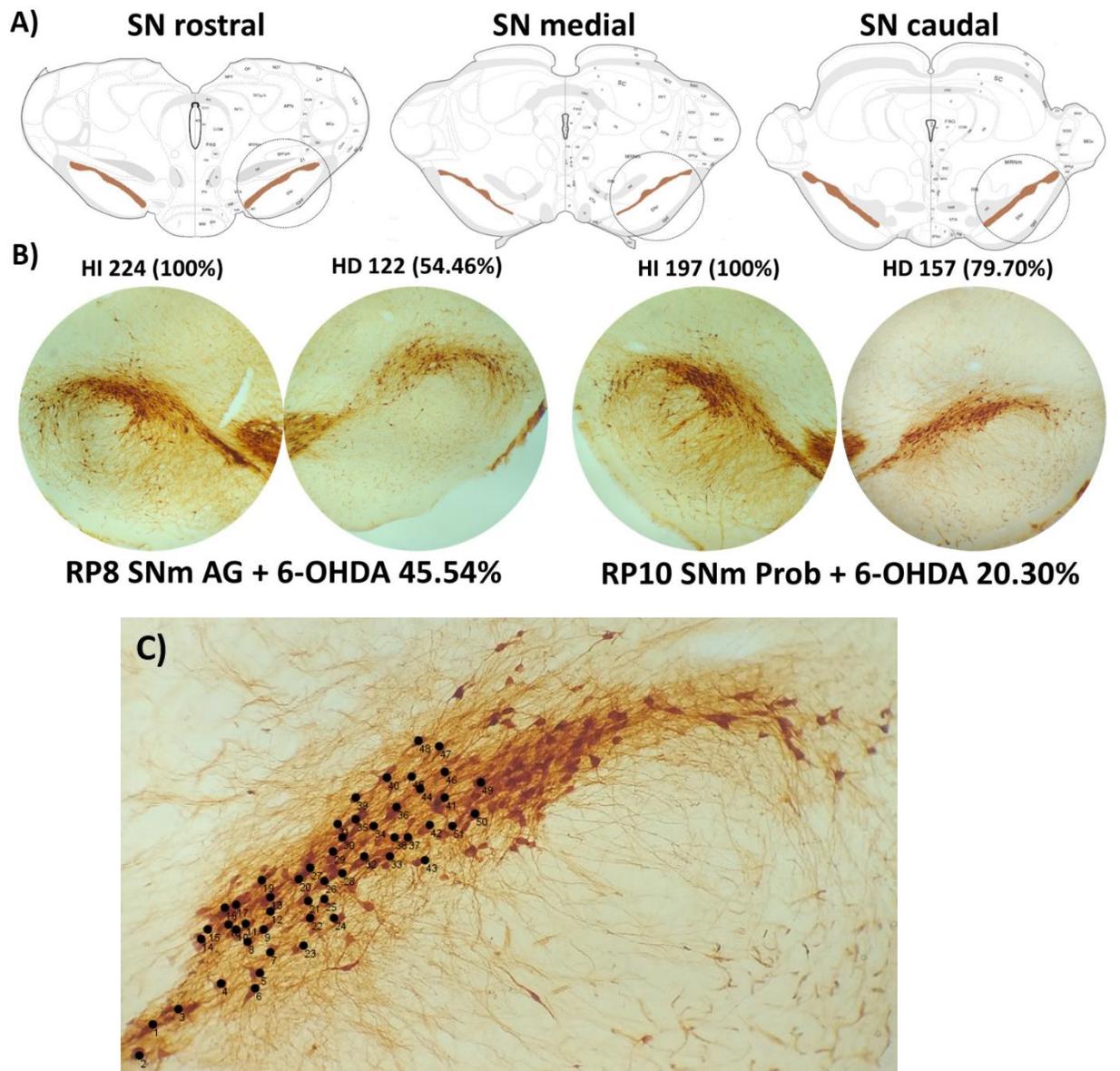


**Figura 15. Análisis de la inmunohistoquímica para TH en el estriado. A)** Selección del área inmunorreactiva a TH en el estriado. **B)** Imágenes binarias de las fotografías en las que las zonas oscuras representan los píxeles arriba del umbral de inmunodetección. La línea roja en el hemisferio izquierdo delimita los píxeles oscuros del estriado sano correspondientes a la zona TH<sup>+</sup>, que sirvió como referencia (100%) para calcular el porcentaje de píxeles coloreados remanentes en el estriado derecho, delimitado por la línea roja. Calculando la diferencia de esos valores se obtuvo el porcentaje de pérdida dopaminérgica en el estriado derecho que recibió la inyección de 6-OHDA o salina.

Para el análisis de TH en la sustancia *nigra*, ésta se fotografió con un aumento de 10X y posteriormente, mediante el software ImageJ, se realizó el conteo manual de los somas inmunorreactivos a TH<sup>+</sup> en las regiones rostral, medial y caudal de la SNpc de ambos hemisferios (Fig. 16A) mediante los siguientes criterios:

1. Se consideraron exclusivamente los somas localizados la SNpc, excluyendo los del área tegmental ventral y de la sustancia *nigra reticulata*, mediante referencias anatómicas señaladas en el atlas del Paxinos y Watson (1986).
2. Cuando se observaron varios somas agrupados, si los bordes de cada célula eran identificables se contabilizaron por separado, pero si sus límites no se podían apreciar, se contabilizaron como si fuera una sola neurona.
3. Fragmentos celulares o somas claramente de menor tamaño que el resto no fueron considerados para el cómputo final.

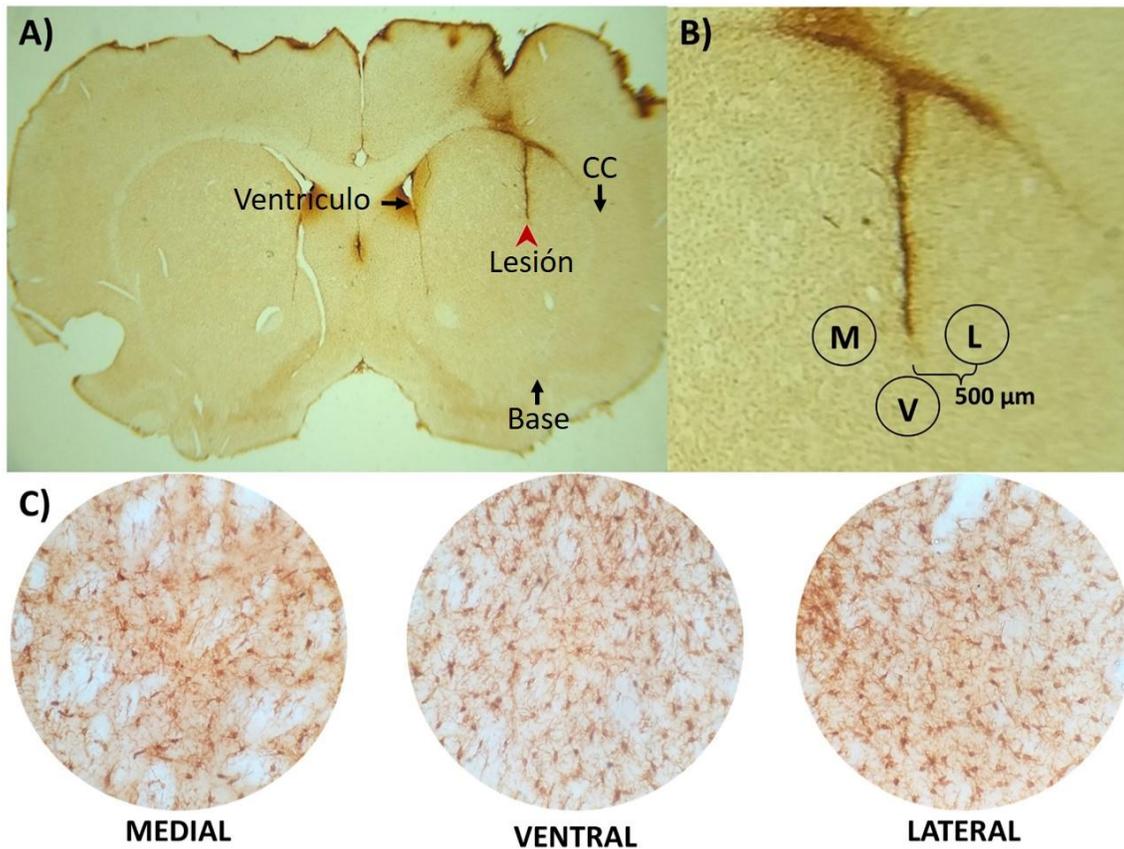
El número de somas del lado izquierdo (sano) se consideró como el 100% y a partir de éste se calculó el porcentaje remanente en el lado derecho y, mediante una diferencia, se obtuvo el porcentaje de pérdida de neuronas TH<sup>+</sup> en las diferentes regiones de la SNpc de cada rata (Fig. 16B).



**Figura 16. Análisis de la inmunohistoquímica para TH en la sustancia *nigra*.** **A)** Diagramas de cortes mesencefálicos mostrando en color café los límites de la SNpc, en sus regiones rostral, medial y caudal donde se realizó el conteo de los somas dopaminérgicos (TH<sup>+</sup>). **B)** Fotografías representativas de cortes a nivel de la sustancia *nigra* medial y procesados por IHQ de TH. Las zonas de color café representan los cúmulos de somas TH<sup>+</sup> que fueron contabilizados para calcular el porcentaje de neuronas dopaminérgicas que se perdió en la sustancia *nigra* derecha, que inerva al estriado donde se realizó la inyección de 6-OHDA o solución salina. **C)** Ampliación de una foto mostrando un ejemplo de la forma de conteo (no todos los somas están numerados)

### **Análisis de la inmunorreactividad a Iba1 en las rebanadas cerebrales**

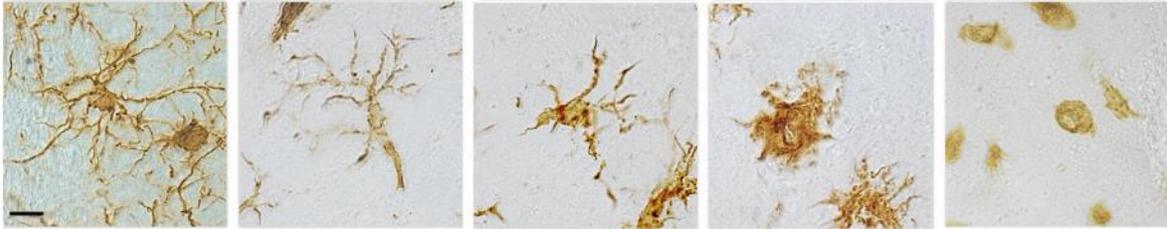
Para el análisis de la inmunorreactividad a Iba1 en el estriado se seleccionaron 3 zonas circulares de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro. Éstas se ubicaron a una distancia de 500  $\mu\text{m}$  del sitio más profundo de la lesión mecánica ocasionada por la aguja, una en dirección medial (hacia la línea media), otra en dirección ventral (hacia la base del cerebro) y otra en dirección lateral (hacia el cuerpo calloso); estas tres zonas se fotografiaron con un aumento de 40X con el microscopio Motic B3 Professional Series. En el hemisferio izquierdo se seleccionaron tres zonas en posiciones equivalentes, calculando las distancias usando una escala micrométrica y la escala integrada en el vernier de la platina del microscopio y tomando como referencia el cuerpo calloso (Fig. 17).



**Figura 17. Análisis de la inmunohistoquímica para Iba1 en el estriado.** **A)** Fotografía de un corte cerebral a nivel del estriado e inmunoteñido para Iba1 en donde se señalan los sitios de referencia para seleccionar las áreas del estriado para contabilizar la microglía Iba1<sup>+</sup>. La cabeza de flecha roja señala el sitio más profundo de la lesión mecánica causada por la aguja de inyección, CC = cuerpo calloso. **B)** Ampliación de la region del estriado derecho con la lesión mecánica de la aguja, mostrando las zonas medial (M), ventral (V) y lateral (L) seleccionadas. **C)** Fotos de las tres zonas seleccionadas del hemisferio derecho, tomadas con un aumento de 40X.

El conteo de células Iba1<sup>+</sup> se realizó teniendo en consideración los siguientes criterios:

1. Las células consideradas en el conteo tenían una morfología similar a alguna de las que se muestran en la Fig. 18:



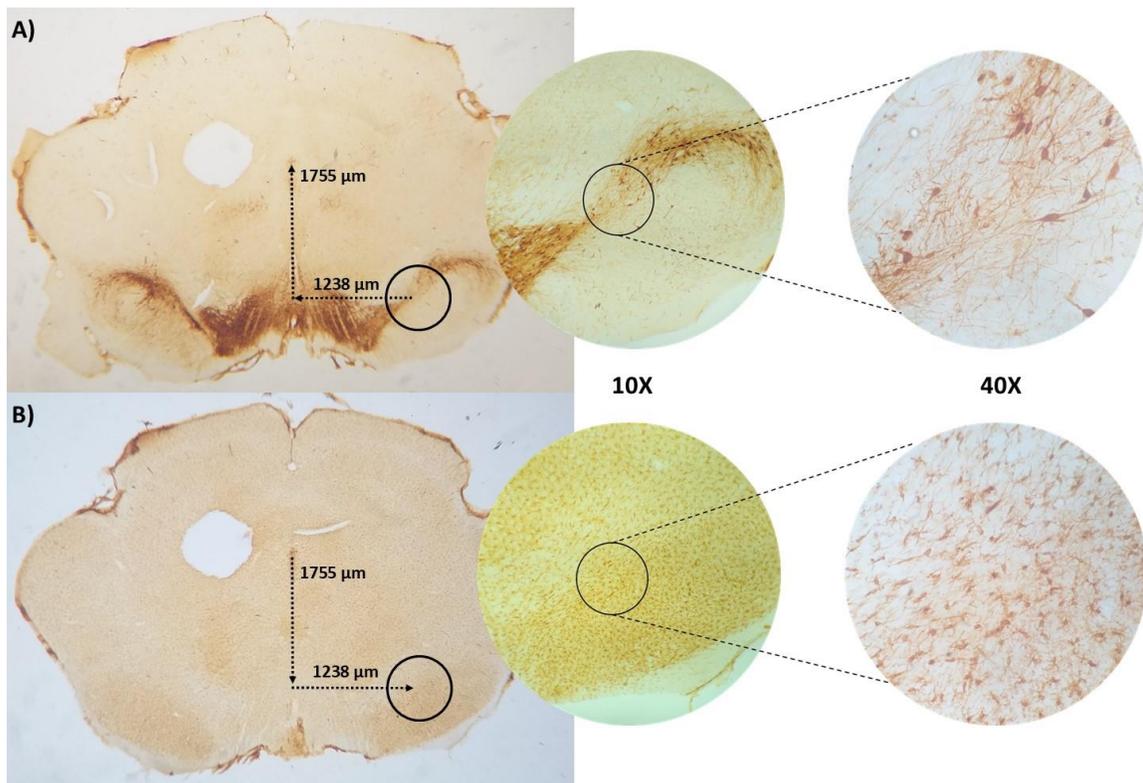
**Figura 18. Clasificación morfológica de los estados de activación de la microglía<sup>38</sup>**

2. Se contaron únicamente los somas completos de la microglía; los fragmentos de células, las proyecciones dendríticas aisladas o el agrupamiento de éstas no se contabilizaron.
3. Los cuerpos celulares contabilizados debían tener un tamaño similar entre sí (aprox. 5  $\mu\text{m}$ ).
4. Las células que se encontraban en los bordes del campo fotografiado se contabilizaron solo cuando más de la mitad del soma fue visible e identificable.
5. Células completamente fuera de foco (profundas), cuyas proyecciones o bordes no podían diferenciarse, fueron excluidas.
6. En un agrupamiento de células si la separación entre estas no estaba bien definida, se contabilizó al menos una célula.

Para cada rata, el número de somas contabilizados en alguna de las áreas (M, V o L) del lado izquierdo (sano) se consideró como el 100% y a partir de este valor, se calculó el porcentaje de incremento de células Iba1<sup>+</sup> en las zonas correspondientes del estriado derecho.

El conteo de células inmunorreactivas a Iba1 en las regiones rostral, medial y caudal de la SNpc de ambos hemisferios se realizó en áreas circulares de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro, fotografiadas con un aumento de 40X.

Debido a la irregularidad de la SNpc y a que el inmunomarcaje de Iba1 no proporciona referencias claras para seleccionar las zonas correspondientes donde se encuentran los somas TH<sup>+</sup> (entre ratas), en las rebanadas pares inmunomarcadas para TH se ubicó la zona de mayor pérdida de somas dopaminérgicos; a partir de la cual se midió la distancia (en  $\mu\text{m}$ ) hacia la línea media y luego, en un ángulo de 90°, la distancia hacia el acueducto de Silvio (Fig. 19A); usando estas medidas como referencia, en las rebanadas procesadas para Iba1 se ubicó el área equivalente a la zona de mayor pérdida de somas TH<sup>+</sup> en la SNpc del hemisferio derecho y su contraparte en el izquierdo (Fig. 19B). De manera similar al análisis en el estriado, el número de células Iba1<sup>+</sup> en la SNpc del hemisferio izquierdo se consideró como el 100%, a partir del cual se calculó el porcentaje de incremento de la microglía en el lado derecho.



**Figura 19. Selección de las áreas para el conteo de microglía Iba1<sup>+</sup> en la SNpc. A)** En las rebanadas de la sustancia *nigra* procesadas para TH, se midió la distancia desde el centro del área de mayor pérdida de somas dopaminérgicas en el lado derecho hasta la línea media y de ahí hasta el acueducto de Silvio. **B)** Las distancias anteriores se usaron para ubicar las áreas correspondientes de la SNpc derecha e izquierda en las rebanadas pares procesadas para Iba1. Este procedimiento se realizó para cada rata en ambos grupos con lesión verdadera (6-OHDA). Para ubicar las zonas de conteo de células Iba1<sup>+</sup> en la sustancia negra de los grupos con falsa lesión se utilizaron los promedios de las distancias calculadas en cada grupo de tratamiento (AG o Prob) de los animales que fueron lesionados con 6-OHDA.

## **Análisis estadístico**

Tanto para las pruebas de conducta como para el análisis de las inmunohistoquímicas se realizaron las pruebas de D'Agostino y Pearson para evaluar la Normalidad y la de Brown-Forsythe para verificar la homogeneidad de varianzas. Debido a la alta variabilidad en los valores absolutos de las variables medidas en la prueba de la pasarela estrecha, los datos de cada día se expresaron como porcentajes del promedio de los valores medidos en los ensayos prelesión. Para la prueba del cilindro, el porcentaje de asimetría para cada día se calculó como se describió en los métodos, en apego a lo reportado en la literatura. Para analizar los giros inducidos por apomorfina se usaron los valores absolutos.

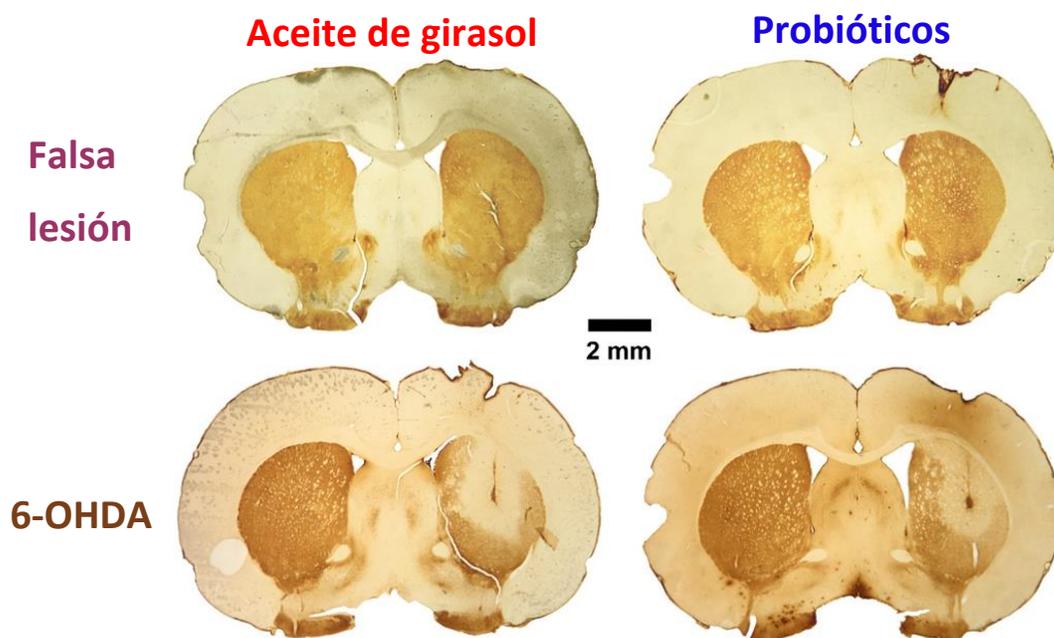
Para analizar los datos de las pruebas conductuales se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba post hoc de Tukey; para analizar los cambios de las variables a lo largo del tiempo dentro de cada grupo de tratamiento se empleó ANOVA de una vía de medidas repetidas, seguida de la prueba post hoc de Dunnett y considerando el día -1 como referencia para la comparación.

Los resultados de IHQ se expresaron en porcentajes relativos al hemisferio no lesionado, para TH se calculó la reducción del área inmunorreactiva en el estriado y la disminución de somas dopaminérgicos en las tres zonas de la SNpc; para Iba1 se calculó el porcentaje de aumento del número de células en las tres zonas del estriado y de la sustancia *nigra*. Para analizar los datos obtenidos de las inmunohistoquímicas se empleó ANOVA de dos vías con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Para determinar la posible asociación entre los resultados de las IHQ de TH e Iba1 en el estriado, se realizó un análisis de correlación lineal de Pearson. Para todas las pruebas estadísticas, se consideró significativo un valor  $p < 0.05$ . Los resultados en las gráficas y tablas se expresan como la media  $\pm$  EE.

## RESULTADOS

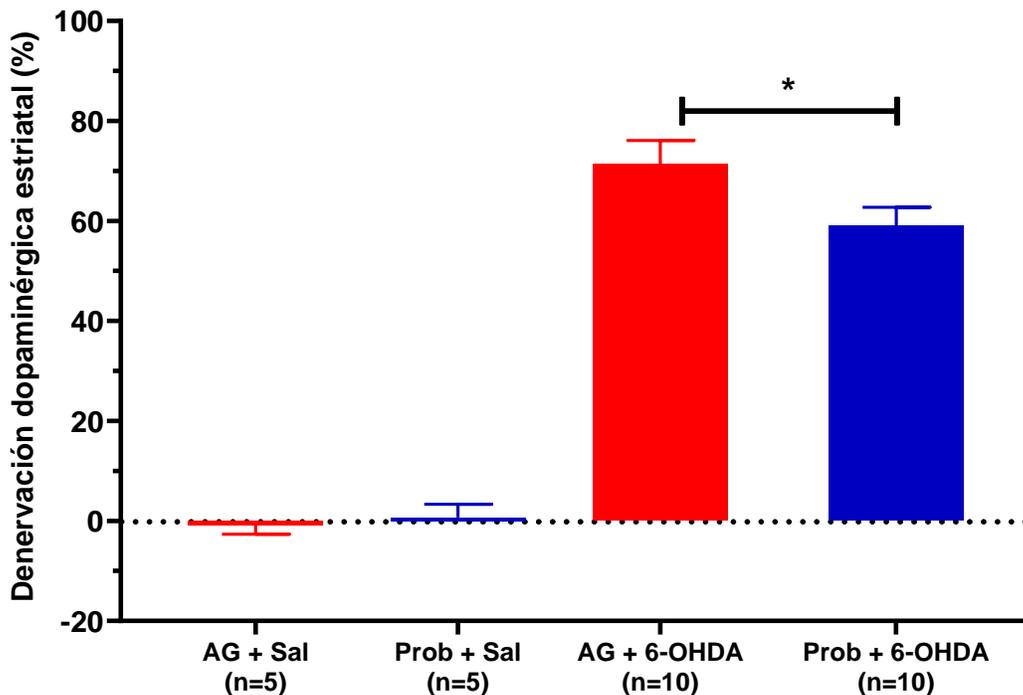
### Imunohistoquímica para tirosina hidroxilasa en el estriado.

En la figura 20 se muestran fotografías de cortes cerebrales a nivel del estriado que fueron procesados para revelar la inmunorreactividad a la tirosina hidroxilasa (TH<sup>+</sup>), las cuales fueron obtenidos de ratas representativas de cada uno de los cuatro grupos experimentales. Las zonas TH<sup>+</sup> aparecen de un color pardo más intenso y abarcan, de arriba hacia abajo, el estriado, el núcleo accumbens y las islas de Calleja, los cuales son ricos en plexos de axones procedentes de las neuronas dopaminérgicas localizadas en el mesencéfalo.



**Figura 20. Los probióticos *L. rhamnosus* LGG y *B. lactis* BB-12 reducen la pérdida de inmunorreactividad a TH en el estriado dorsolateral lesionado con 6-OHDA. IHQ a los 22 días de la inyección de 3.5  $\mu$ L de solución salina (falsa lesión) o de 8.75  $\mu$ g de 6-OHDA en el mismo volumen (aumento 1.8X). Se puede observar que en los cortes de ratas con falsa lesión el área TH<sup>+</sup> a nivel del estriado es prácticamente idéntica en los dos hemisferios, mientras que en los de las ratas lesionadas con 6-OHDA hay una zona de pérdida alrededor de la lesión mecánica donde se inyectó la neurotoxina dopaminérgica, cuya área es menor en el corte de la rata tratada con probióticos.**

Como se describió en los Métodos, el área TH<sup>+</sup> residual del hemisferio derecho (con lesión verdadera o falsa) se expresó como porcentaje del área TH<sup>+</sup> del estriado izquierdo sano (considerado como el 100%) y después de sacar la diferencia entre ambos hemisferios, se obtuvo el porcentaje de pérdida en el lado derecho. En la figura 21 se muestran los promedios de los cuatro grupos experimentales. Se puede observar que en los animales tratados con probióticos se redujo significativamente la pérdida de TH en el cuerpo estriado lesionado con 6-OHDA. El ANOVA de dos vías señaló diferencias significativas para el factor lesión:  $F(1,26) = 212.1, p < 0.0001$ ; pero no para los factores tratamiento:  $F(1,26) = 1.463, p = 0.237$  o la interacción de ambos factores:  $F(1,26) = 2.385, p = 0.135$ . Sin embargo, en los animales que recibieron 6-OHDA, la prueba *post hoc* de Bonferroni manifestó diferencias significativas entre los grupos tratados con probióticos y aceite de girasol (AG) (ver pie de la figura 21). Los grupos inyectados con solución salina tuvieron una pérdida de  $-0.780 \pm 1.86\%$  para el grupo tratado con AG y de  $0.720 \pm 2.61\%$  para el grupo de probióticos. Los grupos inyectados con 6-OHDA tuvieron una pérdida de  $71.35 \pm 4.73\%$  para el grupo que recibió AG, mientras para el grupo tratado con probióticos fue de  $59.02 \pm 3.74\%$ .



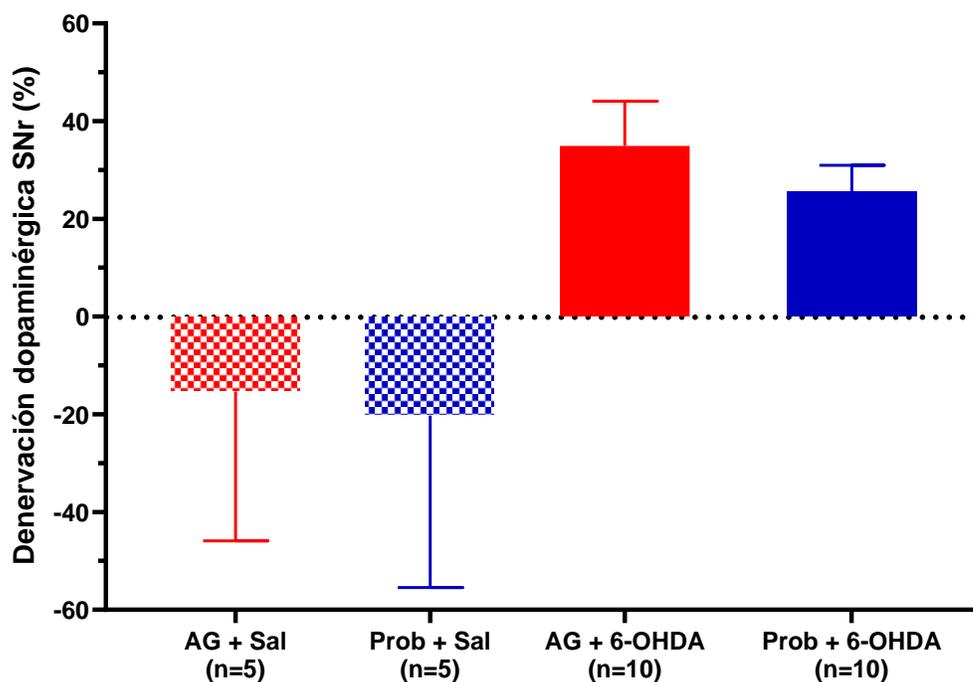
**Figura 21. Pérdida de área TH<sup>+</sup> en el cuerpo estriado con verdadera o falsa lesión.** Cada barra representa el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis. ANOVA de dos vías, *post hoc* Bonferroni (\* $p = 0.0493$ ). En esta y las demás gráficas: Prob = probióticos, AG = aceite de girasol, Sal = solución salina.

### **Inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa en la sustancia *nigra*.**

*El tratamiento con probióticos no produjo un efecto significativo en la pérdida de somas TH<sup>+</sup> en la región rostral de la SNpc del hemisferio cerebral derecho.*

El análisis en la SNpc se realizó por zonas (rostral, medial, caudal) y también de manera global. El número de somas TH<sup>+</sup> del hemisferio derecho fueron expresados como porcentaje de los contabilizados en el hemisferio izquierdo sano (100%) y sacando la diferencia se calculó el porcentaje de pérdida en la SNpc derecha. El ANOVA de dos vías señaló diferencias significativas para el factor lesión:  $F(1,26) = 7.45$ ,  $p = 0.011$ ; pero no para los factores tratamiento:  $F(1,26) = 0.166$ ,  $p = 0.687$  o la interacción de ambos factores:  $F(1,26) = 0.016$ ,  $p = 0.901$ . La prueba *post hoc* de Bonferroni no encontró diferencias entre los

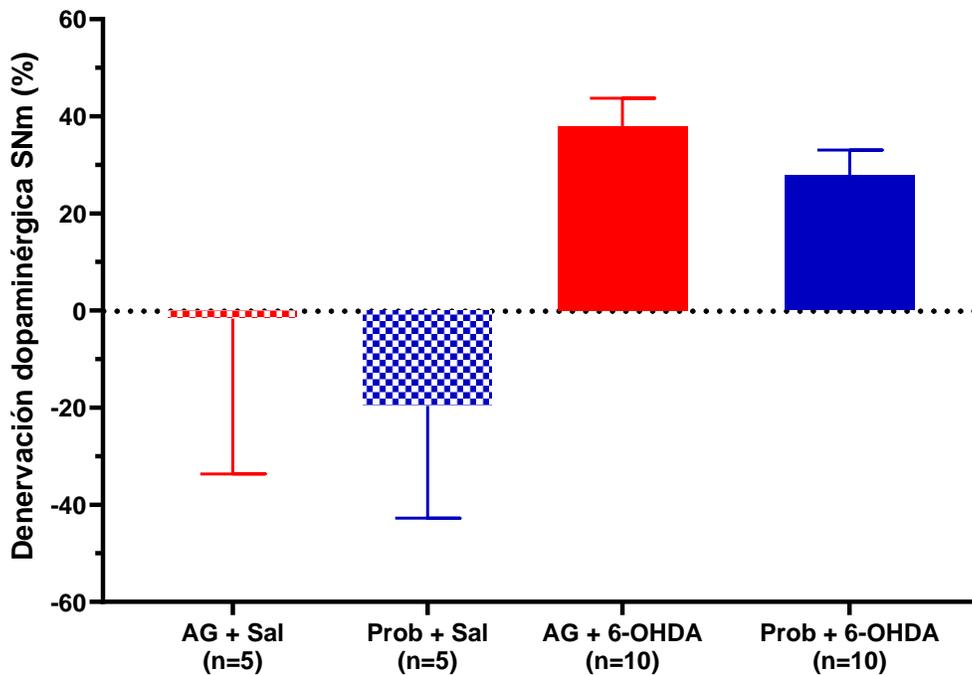
grupos que recibieron la inyección con 6-OHDA (ver pie de la figura 22). La pérdida de somas para el grupo inyectado con 6-OHDA que recibió aceite de girasol fue de  $34.93 \pm 9.13\%$  y para el grupo de probióticos fue de  $25.52 \pm 5.42\%$ , los valores para los grupos inyectados con solución salina fueron  $-15.31 \pm 30.62\%$  y  $-20.26 \pm 35.20\%$  para el aceite de girasol y probióticos respectivamente (en esta y las demás zonas, los valores negativos indican mayor número de somas en la SNpc derecha).



**Figura 22. Porcentaje de pérdida de somas TH<sup>+</sup> en la región rostral de la sustancia nigra pars compacta del hemisferio lesionado.** Cada barra representa el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis.

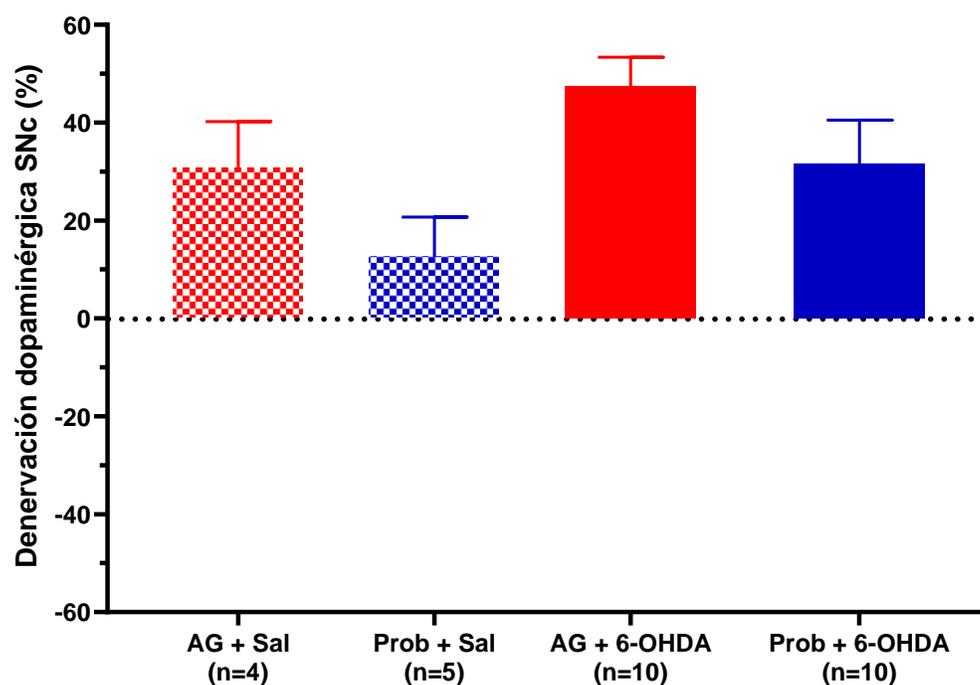
El tratamiento con probióticos no produjo un efecto significativo en la pérdida de somas TH<sup>+</sup> en la región medial de la SNpc.

El ANOVA de dos vías señaló diferencias significativas para el factor lesión:  $F(1,26) = 9.0$ ,  $p = 0.006$ ; pero no para los factores tratamiento:  $F(1,26) = 0.936$ ,  $p = 0.342$  o la interacción de ambos factores:  $F(1,26) = 0.074$ ,  $p = 0.788$ . La prueba *post hoc* de Bonferroni no encontró diferencias entre los grupos que recibieron la inyección con 6-OHDA (ver pie de la figura 23). La pérdida de somas para el grupo inyectado con 6-OHDA que recibió AG fue de  $37.99 \pm 5.74\%$  y para el grupo de probióticos fue  $27.87 \pm 5.18\%$ , los valores para los grupos inyectados con solución salina fueron  $-1.63 \pm 32.02\%$  y  $-19.63 \pm 23.11\%$  para el AG y probióticos, respectivamente.



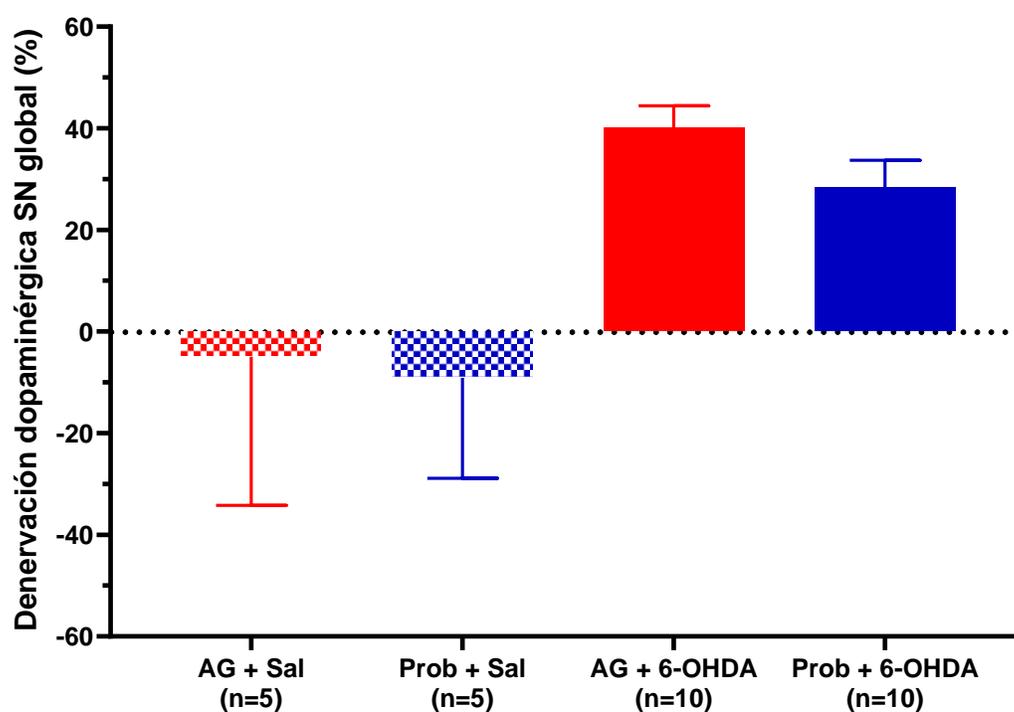
**Figura 23. Porcentaje de pérdida de somas TH<sup>+</sup> en la región medial de la sustancia nigra pars compacta del hemisferio lesionado.** Cada barra representa el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis.

El tratamiento con probióticos no produjo un efecto significativo en la pérdida de somas TH<sup>+</sup> en la región caudal de la SNpc. Para el análisis de esta zona se excluyó a un animal del grupo inyectado con salina y tratado con AG, pues la inmunorreactividad en los somas del hemisferio de referencia (izquierdo) fue anormalmente baja afectando el cálculo de la denervación. El ANOVA de dos vías no señaló diferencias significativas para los factores lesión:  $F(1,25) = 3.87$ ,  $p = 0.060$ ; tratamiento:  $F(1,25) = 3.49$ ,  $p = 0.074$  o la interacción de ambos factores:  $F(1,25) = 0.02$   $p = 0.895$ . La prueba *post hoc* de Bonferroni no encontró diferencias entre los grupos que recibieron la inyección con 6-OHDA (ver pie de la figura 24). La pérdida de somas para el grupo inyectado con 6-OHDA que recibió AG fue de  $47.38 \pm 5.96\%$  y para el grupo de probióticos fue  $31.64 \pm 8.86\%$ , mientras que para los grupos inyectados con solución salina fueron  $30.74 \pm 9.49\%$  y  $12.57 \pm 8.14\%$  para los grupos de AG y probióticos, respectivamente.



**Figura 24. Porcentaje de pérdida de somas TH<sup>+</sup> en la región caudal de la sustancia *nigra pars compacta* del hemisferio lesionado.** Cada barra representa el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis.

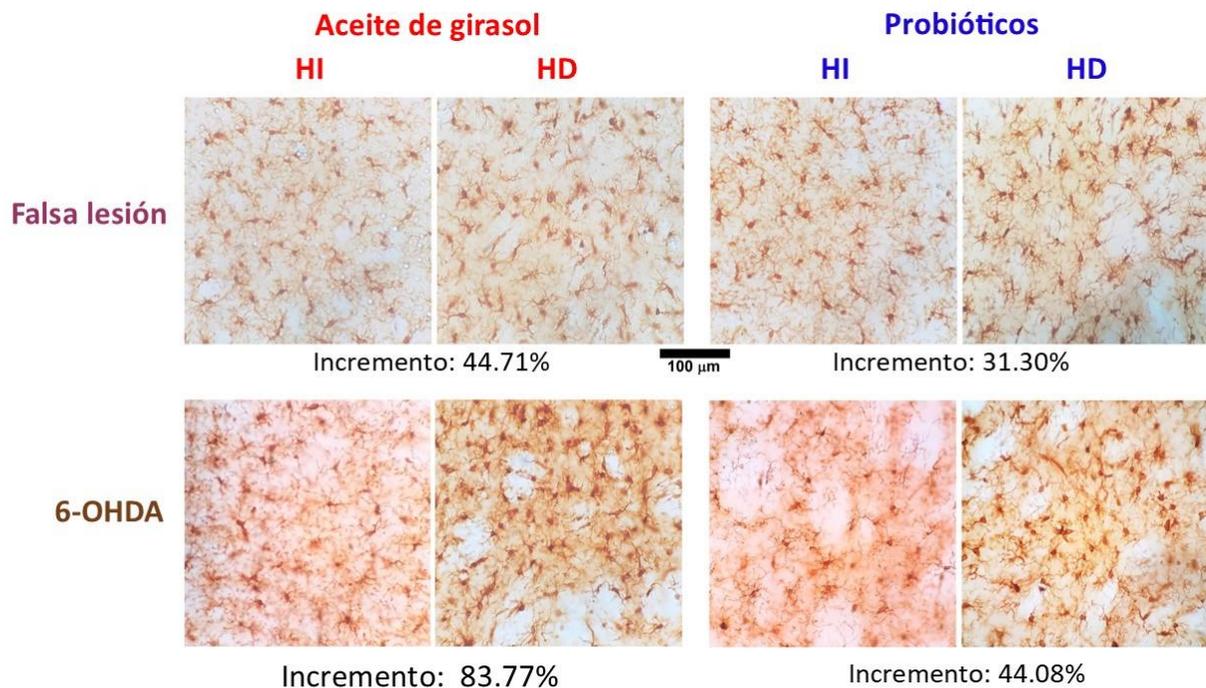
En el análisis global se encontró que el tratamiento con probióticos no produjo un efecto significativo en la pérdida de somas TH<sup>+</sup> en la SNpc del hemisferio lesionado. El ANOVA de dos vías señaló diferencias significativas para el factor lesión:  $F(1,26) = 10.09$ ,  $p = 0.004$ ; pero no para el tratamiento:  $F(1,26) = 0.375$ ,  $p = 0.546$  o la interacción de ambos factores:  $F(1,26) = 0.09$ ,  $p = 0.772$ . La prueba *post hoc* de Bonferroni no encontró diferencias entre los grupos que recibieron la inyección con 6-OHDA (ver pie de la figura 25). La pérdida de somas para el grupo inyectado con 6-OHDA que recibió AG fue de  $40.10 \pm 4.33\%$  y para el grupo de probióticos fue  $28.36 \pm 5.35\%$ ; los valores para los grupos inyectados con solución salina fueron  $-4.95 \pm 29.29\%$  y  $-9.10 \pm 19.76\%$  para los grupos de AG y probióticos, respectivamente.



**Figura 25. Porcentaje global de pérdida de somas TH<sup>+</sup> en la sustancia *nigra pars compacta* del hemisferio lesionado.** Se presenta el promedio de los porcentajes de disminución de los somas TH<sup>+</sup> en las regiones rostral, medial y caudal de la SNpc del hemisferio derecho. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis.

### Inmunohistoquímica para Iba1 en el estriado.

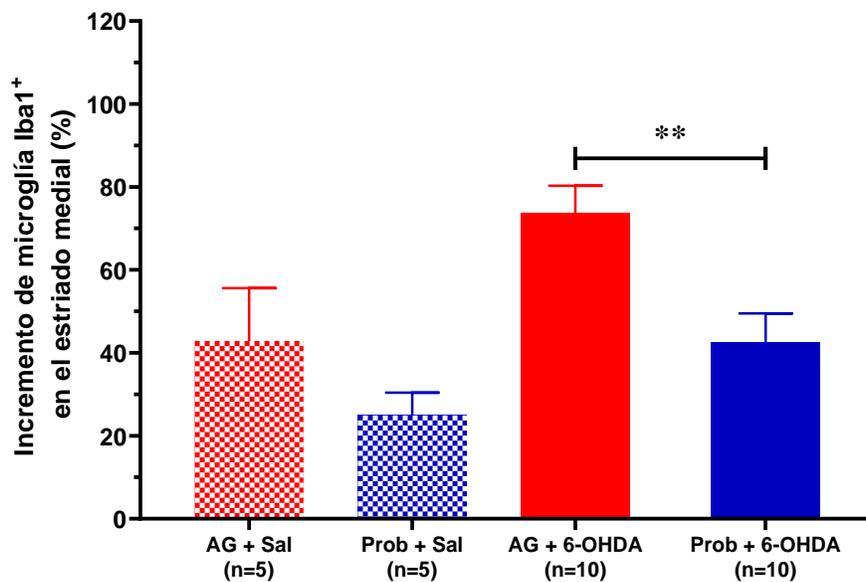
En la figura 26 se muestran fotografías de cortes cerebrales que fueron procesados para revelar la inmunorreactividad a la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado (Iba1<sup>+</sup>), las cuales fueron obtenidos de ratas representativas de los cuatro grupos experimentales. Esta proteína se encuentra en el citosol de la microglía; para poder realizar el conteo se seleccionaron tres zonas cercanas al sitio de inyección como se describió anteriormente.



**Figura 26. Los probióticos *L. rhamnosus* LGG y *B. lactis* BB-12 reducen la inmunorreactividad a Iba1 en el estriado dorsolateral lesionado con 6-OHDA.** IHQ a los 22 días de la inyección de 3.5 µL de solución salina (Falsa lesión) o de 8.75 µg de 6-OHDA en el mismo volumen (aumento 40X). Se puede observar que en los cortes de ratas con falsa lesión el número de células Iba1<sup>+</sup> por campo es prácticamente idéntico en los dos hemisferios, mientras que en los de las ratas lesionadas con 6-OHDA hay un mayor número de células en los campos correspondientes al hemisferio derecho, siendo menor en el corte de la rata tratada con probióticos (los cambios en la coloración se deben al autofocus de la cámara móvil).

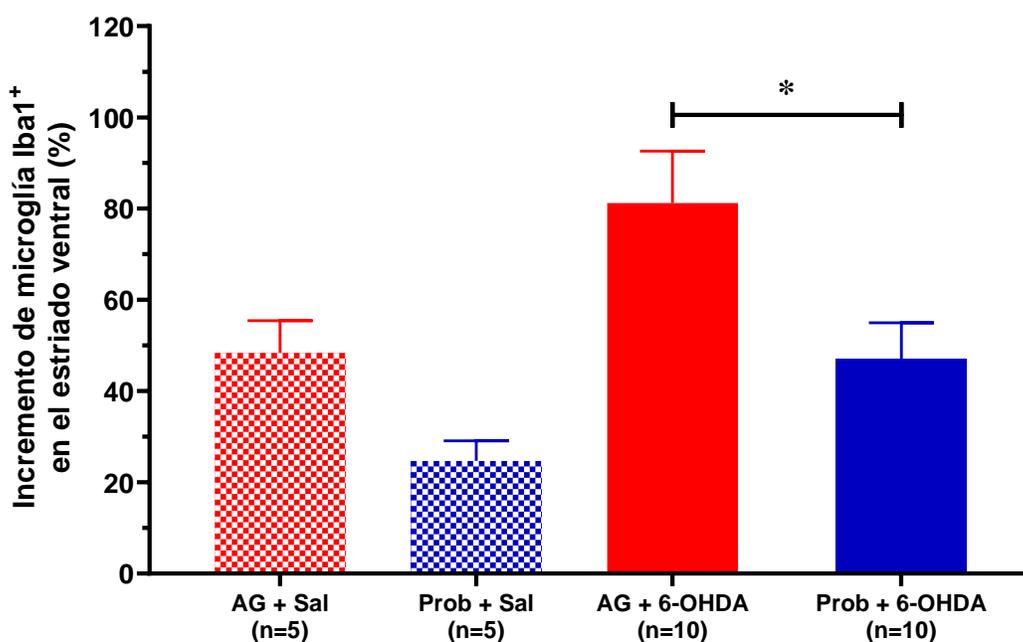
Los probióticos redujeron el aumento de la microglía Iba1<sup>+</sup> en el estriado donde se inyectó la 6-OHDA.

Se contabilizaron los somas de células Iba1<sup>+</sup> en áreas equidistantes al sitio más profundo de la lesión mecánica como se describe en la metodología. Se calculó el incremento porcentual de la microglía Iba1<sup>+</sup> respecto al hemisferio izquierdo (sano). En el estriado medial, el ANOVA de dos vías señaló diferencias significativas para el factor lesión:  $F(1,26) = 8.504$ ,  $p = 0.0072$  y para el factor tratamiento:  $F(1,26) = 8.656$ ,  $p = 0.0068$ , pero no para la interacción de ambos factores:  $F(1,26) = 0.6185$ ,  $p = 0.4387$ . La prueba *post hoc* de Bonferroni manifestó diferencias significativas entre los grupos que recibieron 6-OHDA (ver pie de la figura 27). El incremento para el grupo inyectado con 6-OHDA que recibió AG fue de  $73.71 \pm 6.61\%$  y para el grupo de probióticos fue  $42.64 \pm 6.88\%$ ; los valores para los grupos inyectados con solución salina fueron  $42.86 \pm 12.73\%$  y  $24.90 \pm 5.52\%$  para los grupos de AG y probióticos, respectivamente.



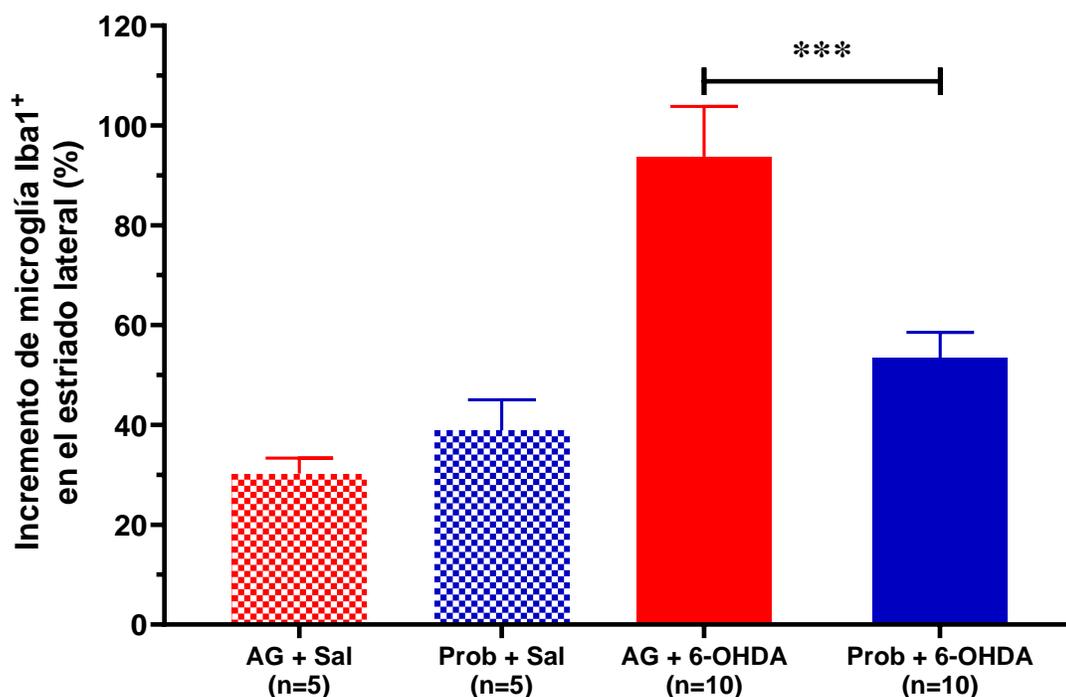
**Figura 27. Incremento porcentual de microglía Iba1<sup>+</sup> en la zona medial al sitio de inyección en el estriado.** Cada barra representa el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis. ANOVA de dos vías, *post hoc* Bonferroni (\*\* $p = 0.0067$ ).

En el estriado ventral, el ANOVA de dos vías señaló diferencias significativas para el factor lesión:  $F(1,26) = 7.061$ ,  $p = 0.0133$  y para el factor tratamiento:  $F(1,26) = 7.741$ ,  $p = 0.0099$ , pero no para la interacción de ambos factores:  $F(1,26) = 0.2532$ ,  $p = 0.6190$ . La prueba *post hoc* de Bonferroni manifestó diferencias significativas entre los grupos que recibieron 6-OHDA (ver pie de la figura 28). El incremento para el grupo inyectado con 6-OHDA que recibió AG fue de  $81.21 \pm 11.42\%$  y para el grupo de probióticos fue  $47.10 \pm 7.89\%$ ; los valores para los grupos inyectados con solución salina fueron  $48.38 \pm 7.06\%$  y  $24.70 \pm 4.41\%$  para los grupos de AG y probióticos, respectivamente.



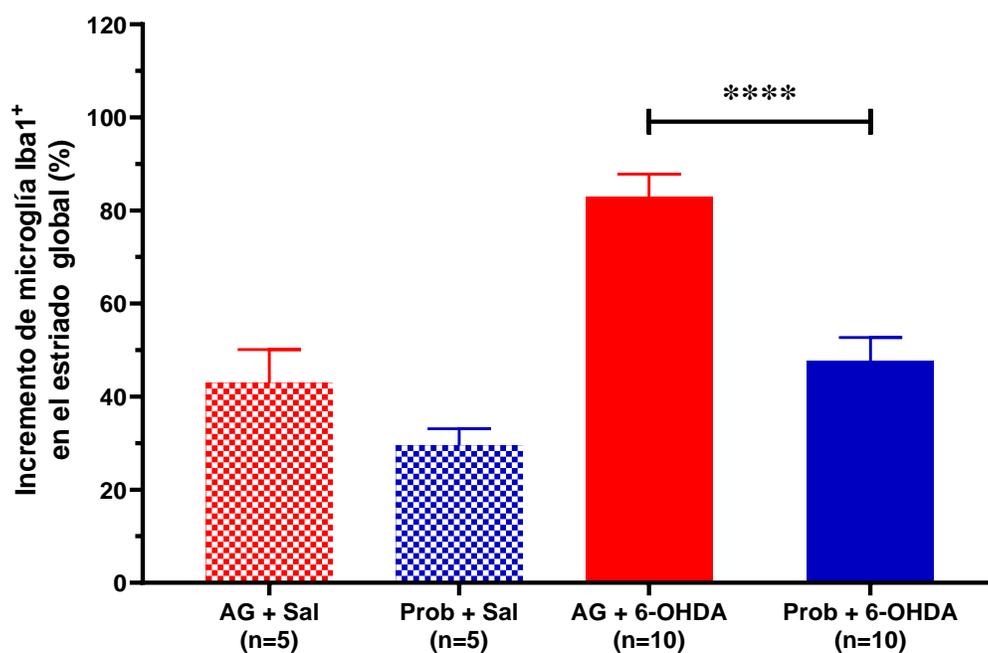
**Figura 28. Incremento porcentual de microglía Iba1<sup>+</sup> en la zona ventral al sitio de inyección en el estriado.** Cada barra representa el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis. ANOVA de dos vías, *post hoc* Bonferroni ( $*p = 0.0171$ ).

En el estriado lateral, el ANOVA de dos vías señaló diferencias significativas para el factor lesión:  $F(1,26) = 21.34$ ,  $p < 0.0001$  y para la interacción de ambos factores:  $F(1,26) = 8.420$ ,  $p = 0.0099$ , pero no para el factor tratamiento:  $F(1,26) = 3.489$ ,  $p = 0.0731$ . La prueba *post hoc* de Bonferroni manifestó diferencias significativas entre los grupos que recibieron 6-OHDA (ver pie de la figura 29). El incremento para el grupo inyectado con 6-OHDA que recibió AG fue de  $93.74 \pm 10.06\%$  y para el grupo de probióticos fue  $53.47 \pm 5.08\%$ ; los valores para los grupos inyectados con solución salina fueron  $30.24 \pm 3.10\%$  y  $38.97 \pm 6.06\%$  para los grupos de AG y probióticos, respectivamente.



**Figura 29. Incremento porcentual de microglía Iba1+ en la zona lateral al sitio de inyección en el estriado.** Cada barra representa el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis. ANOVA de dos vías, *post hoc* Bonferroni (\*\*\*)  $p = 0.0007$ ).

Para el análisis global (promedio de todas las zonas), el ANOVA de dos vías señaló diferencias significativas para los factores lesión:  $F(1,26) = 25.70$ ,  $p < 0.0001$  y tratamiento:  $F(1,26) = 17.98$ ,  $p = 0.0002$ ; pero no para la interacción de ambos factores:  $F(1,26) = 3.581$ ,  $p = 0.0696$ . La prueba *post hoc* de Bonferroni manifestó diferencias significativas entre los grupos que recibieron 6-OHDA (ver pie de la figura 30). El incremento para el grupo inyectado con 6-OHDA que recibió AG fue de  $82.88 \pm 4.95\%$  y para el grupo de probióticos fue  $47.73 \pm 4.96\%$ ; los valores para los grupos inyectados con solución salina fueron  $42.98 \pm 7.13\%$  y  $29.52 \pm 3.60\%$  para los grupos de AG y probióticos, respectivamente.

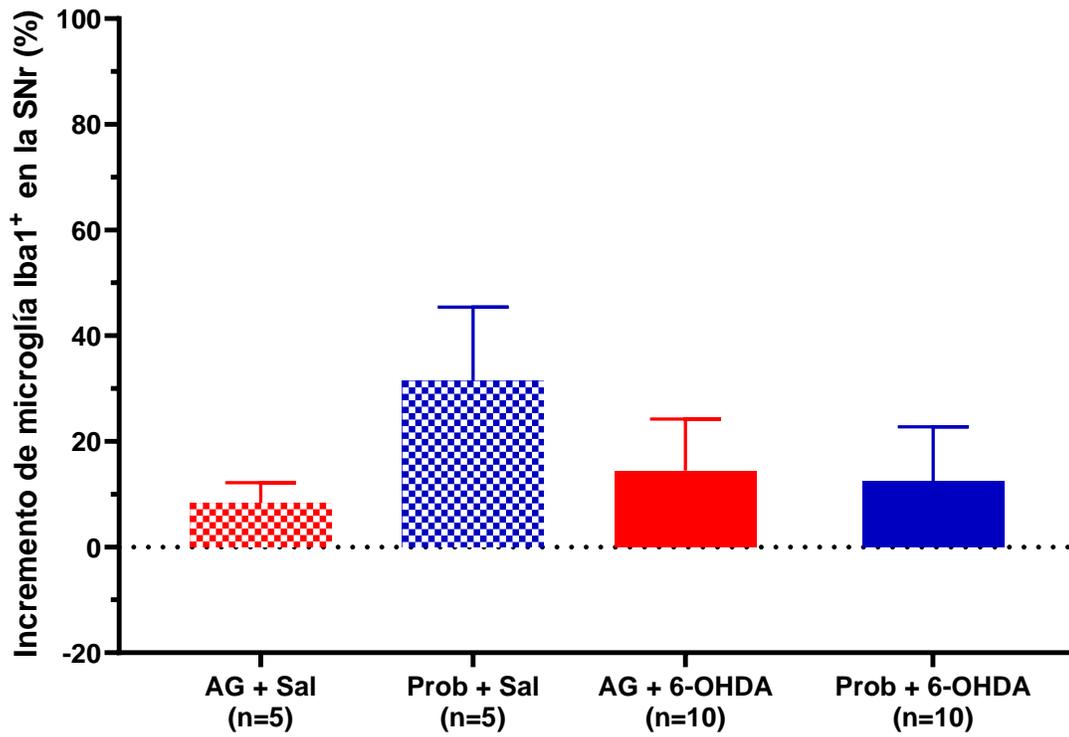


**Figura 30. Incremento porcentual global de microglía Iba1<sup>+</sup> en el cuerpo estriado derecho (lesionado).** Se presenta el promedio de incremento de la microglía en las 3 zonas seleccionadas del estriado. Cada barra representa el promedio ± EE del número de animales indicado entre paréntesis. ANOVA de dos vías, *post hoc* Bonferroni (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

### **Inmunohistoquímica para Iba1 en la sustancia *nigra*.**

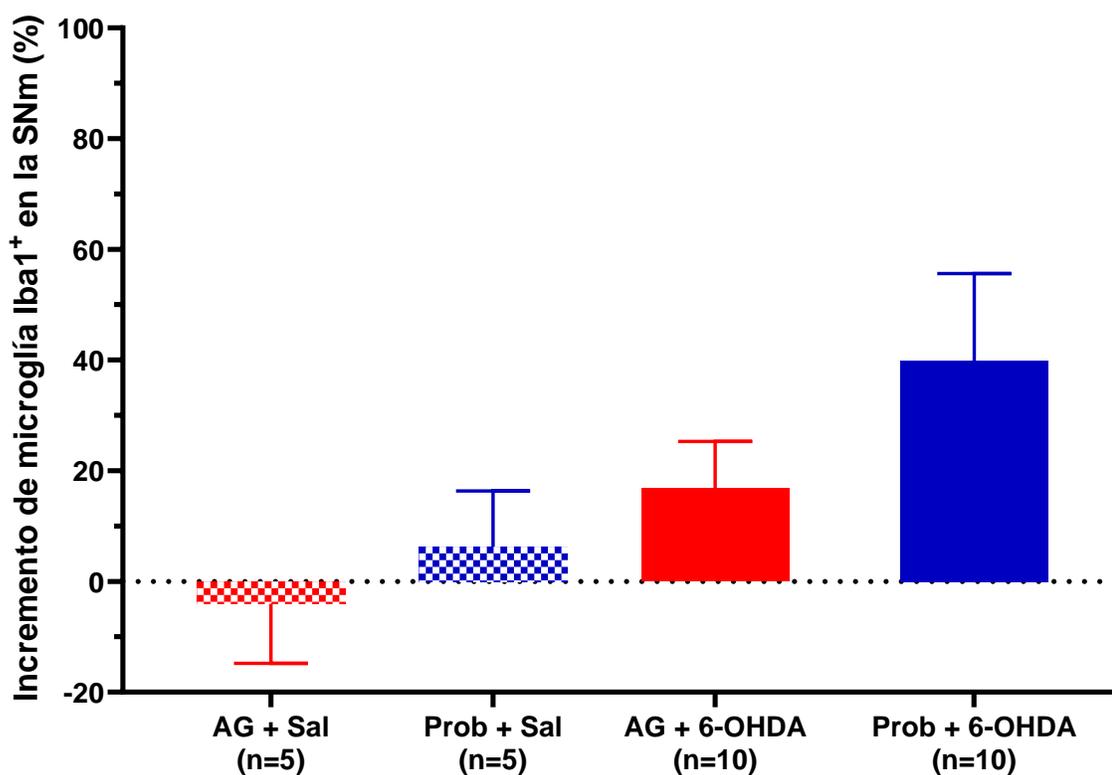
*El tratamiento con probióticos no produjo un efecto significativo en el número de la microglía Iba1<sup>+</sup> en la SNpc.*

Se contabilizaron los somas de células Iba1<sup>+</sup> en las áreas de mayor pérdida de somas dopaminérgicos (TH<sup>+</sup>), identificadas en las rebanadas adyacentes, como se describió en la metodología. Se calculó el cambio porcentual de la microglía Iba1<sup>+</sup> respecto al hemisferio izquierdo (sano). El análisis se realizó por zonas (rostral, medial, caudal) y también de manera global. En la SNpc rostral, el ANOVA de dos vías no señaló diferencias significativas para los factores lesión:  $F(1,26) = 0.320$ ,  $p = 0.5763$ , tratamiento:  $F(1,26) = 0.875$ ,  $p = 0.3582$  o la interacción de ambos factores:  $F(1,26) = 1.225$ ,  $p = 0.2784$ . La prueba *post hoc* de Bonferroni no encontró diferencias entre los grupos que recibieron la inyección con 6-OHDA (ver pie de la figura 31). El incremento para el grupo inyectado con 6-OHDA que recibió AG fue de  $14.49 \pm 9.71\%$  y para el grupo de probióticos fue  $12.56 \pm 10.18\%$ ; los valores para los grupos inyectados con solución salina fueron  $8.39 \pm 3.80\%$  y  $31.42 \pm 14.01\%$  para los grupos de AG y probióticos, respectivamente.



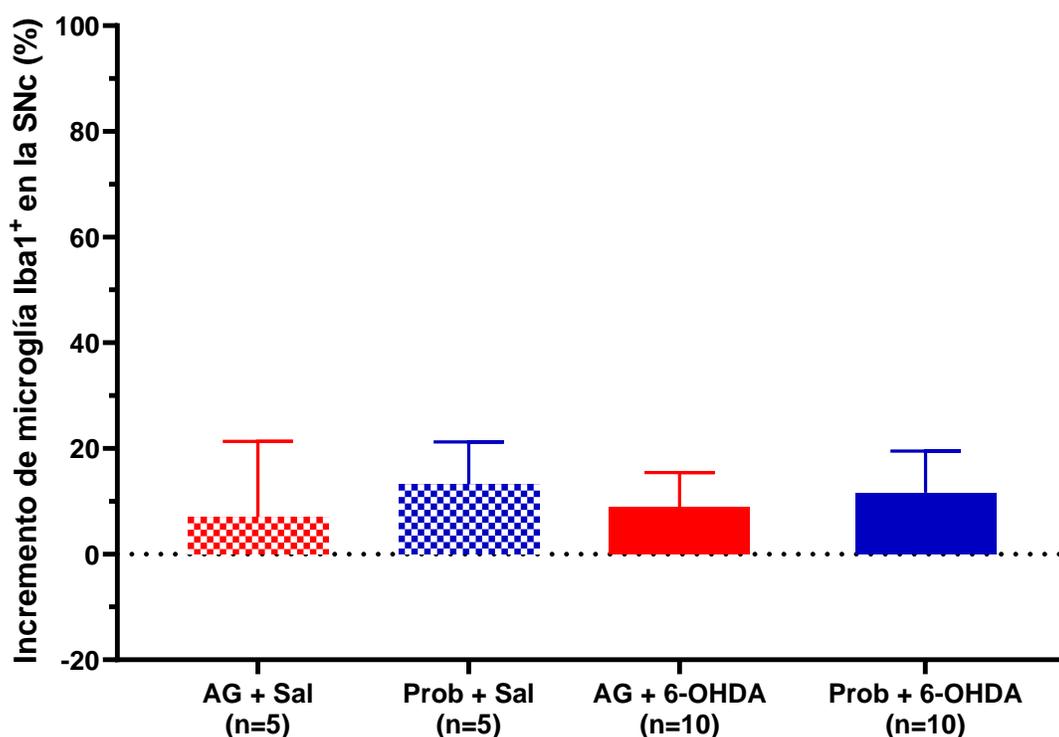
**Figura 31. Incremento porcentual de microglía Iba1<sup>+</sup> en la SNpc rostral del hemisferio lesionado.** Cada barra representa el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis.

En la SNpc medial, el ANOVA de dos vías no señaló diferencias significativas para los factores lesión:  $F(1,26) = 3.861$ ,  $p = 0.0602$ , tratamiento:  $F(1,26) = 1.452$ ,  $p = 0.2391$  o la interacción de ambos factores:  $F(1,26) = 0.2116$ ,  $p = 0.6494$ . La prueba *post hoc* de Bonferroni no encontró diferencias entre los grupos que recibieron la inyección con 6-OHDA (ver pie de la figura 32). El incremento para el grupo inyectado con 6-OHDA que recibió AG fue de  $16.81 \pm 8.48\%$  y para el grupo de probióticos fue  $39.85 \pm 15.77\%$ ; los valores para los grupos inyectados con solución salina fueron  $-4.02 \pm 10.77\%$  y  $6.29 \pm 10.07\%$  para los grupos de AG y probióticos, respectivamente.



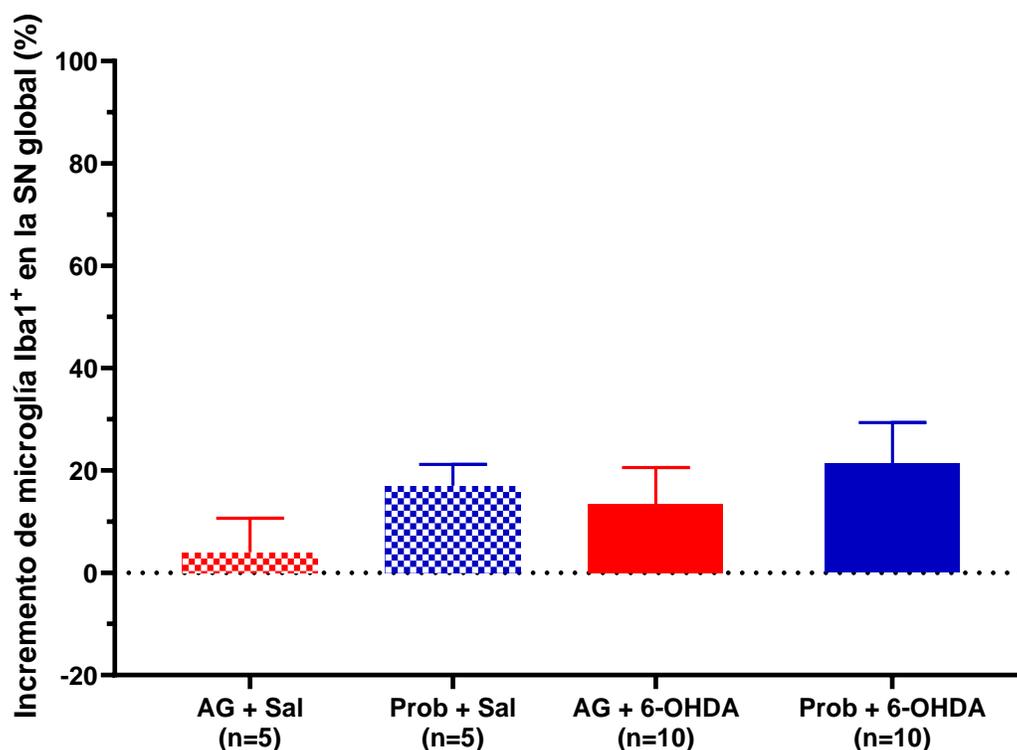
**Figura 32. Incremento porcentual de microglía Iba1+ en la SNpc medial del hemisferio lesionado.** Cada barra representa el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis.

En la SNpc caudal, el ANOVA de dos vías no señaló diferencias significativas para los factores lesión:  $F(1,26) = 0.0001$ ,  $p = 0.9914$ , tratamiento:  $F(1,26) = 0.237$ ,  $p = 0.6303$  o la interacción de ambos factores:  $F(1,26) = 0.0359$ ,  $p = 0.8511$ . La prueba *post hoc* de Bonferroni no encontró diferencias entre los grupos que recibieron la inyección con 6-OHDA (ver pie de la figura 33). El incremento para el grupo inyectado con 6-OHDA que recibió AG fue de  $8.88 \pm 6.54\%$  y para el grupo de probióticos fue  $11.63 \pm 7.87\%$ ; los valores para los grupos inyectados con solución salina fueron  $7.028 \pm 14.30\%$  y  $13.28 \pm 7.96\%$  para los grupos de AG y probióticos, respectivamente.



**Figura 33. Incremento porcentual de microglía Iba1<sup>+</sup> en la SNpc caudal del hemisferio lesionado.** Cada barra representa el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis.

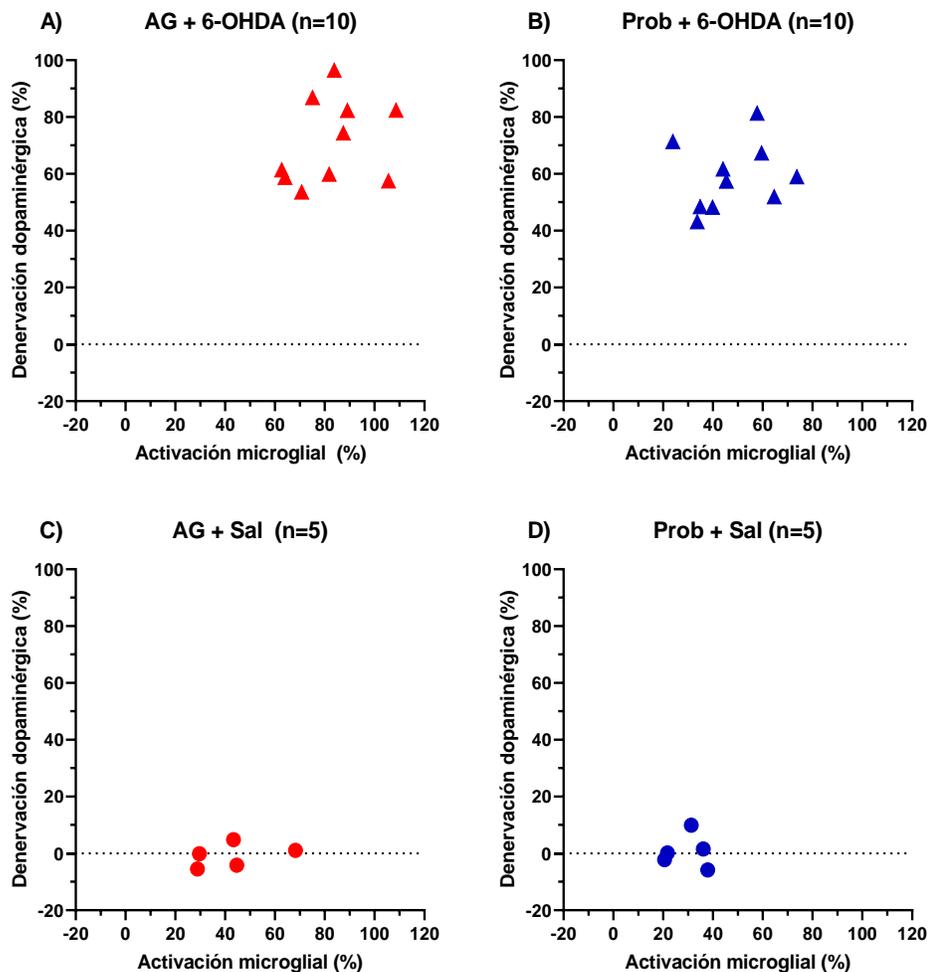
Para el análisis global (promedio de todas las zonas), el ANOVA de dos vías no señaló diferencias significativas para los factores lesión:  $F(1,26) = 0.699$ ,  $p = 0.4107$ , tratamiento:  $F(1,26) = 1.626$ ,  $p = 0.2135$  o la interacción de ambos factores:  $F(1,26) = 0.0940$ ,  $p = 0.7616$ . La prueba *post hoc* de Bonferroni no encontró diferencias entre los grupos que recibieron la inyección con 6-OHDA (ver pie de la figura 34). El incremento para el grupo inyectado con 6-OHDA que recibió AG fue de  $13.39 \pm 7.18\%$  y para el grupo de probióticos fue  $21.34 \pm 8.04\%$ ; los valores para los grupos inyectados con solución salina fueron  $4.01 \pm 6.64\%$  y  $17.00 \pm 4.17\%$  para los grupos de AG y probióticos, respectivamente.



**Figura 34. Incremento porcentual de microglía Iba1<sup>+</sup> en la SNpc global del hemisferio lesionado.** Cada barra representa el promedio ± EE del número de animales indicado entre paréntesis.

## Correlación entre la activación de la microglía y la denervación dopaminérgica

El aumento de células Iba1<sup>+</sup> no se correlaciona con la pérdida de área TH<sup>+</sup> en el estriado en ningún grupo de tratamiento. (ver pie de figura 35).



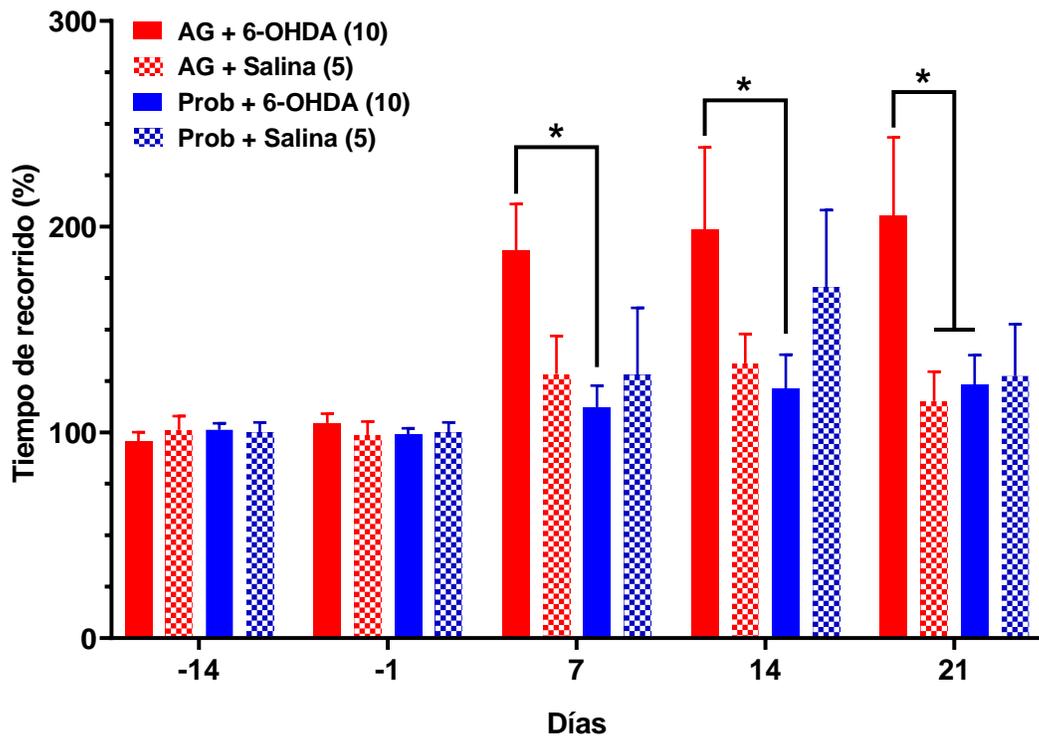
**Figura 35. Correlación entre la denervación dopaminérgica (pérdida de inmunorreactividad a TH<sup>+</sup>) y la activación microglial (incremento de la microglía Iba1<sup>+</sup>) en el estriado lesionado.** Cada punto representa la intersección de los valores de una rata inyectada con 6-OHDA y tratada con aceite de girasol (A) o probiótico (B); o inyectada con solución salina y tratada con aceite de girasol (C) o probiótico (D). El número de animales se encuentra entre paréntesis. Correlación de Pearson (A)  $r = 0.561$ ;  $p = 0.058$ ; (B)  $r = 0.333$ ;  $p = 0.193$ ; (C)  $r = 0.3776$ ;  $p = 0.2655$ ; (D)  $r = -0.0129$ ;  $p = 0.4918$ .

## Pruebas conductuales

### *Pasarela estrecha elevada*

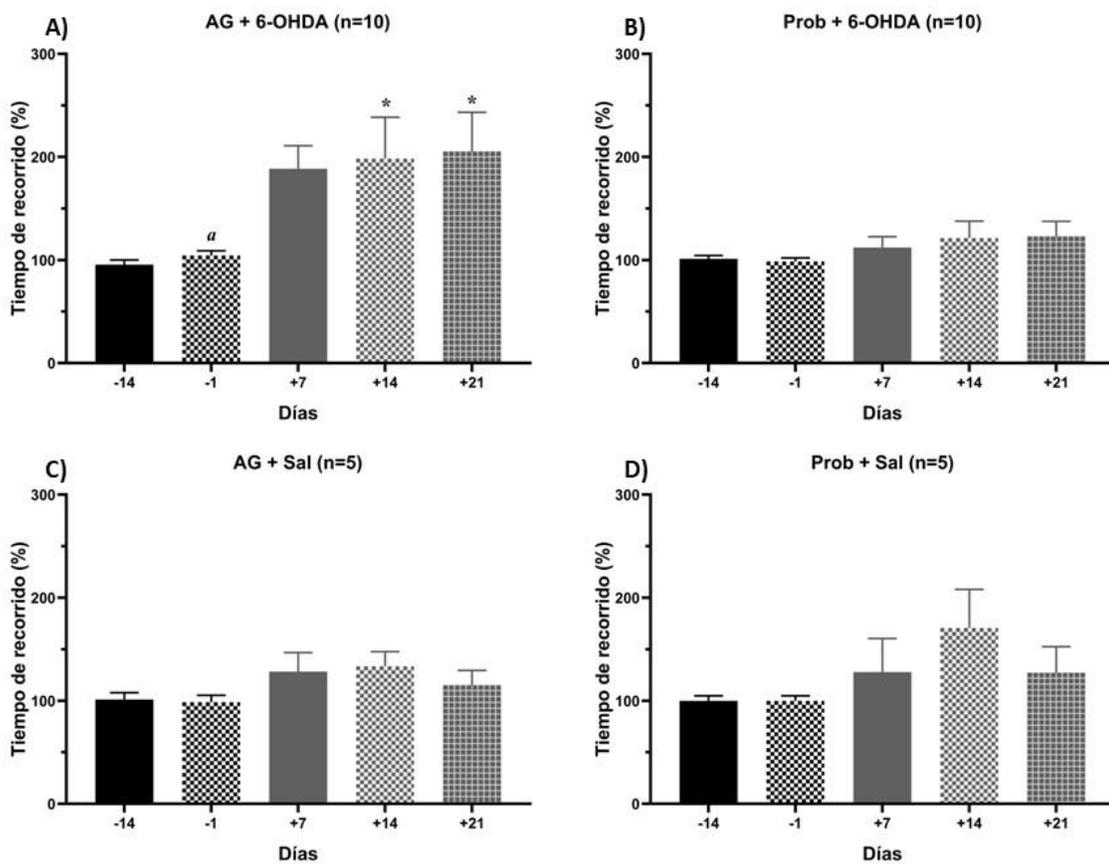
*El tratamiento con probióticos inhibe la bradicinesia causada por la lesión con 6-OHDA, preservando el tiempo de recorrido en la pasarela estrecha elevada.*

Los resultados se presentan en porcentaje, para lo cual se consideró el promedio de los días -14 y -1 como el 100% y los tiempos de todos los días se expresaron en función de este valor. El ANOVA de dos vías señaló diferencias significativas para los factores tratamiento:  $F(3, 130) = 6.052, p = 0.0007$  y día:  $F(4,130) = 5.103, p = 0.0008$ ; pero no para la interacción de ambos factores:  $F(12,130) = 1.162, p = 0.3173$ . La prueba *post hoc* de Tukey manifestó diferencias en el tiempo de recorrido entre los grupos AG+ 6-OHDA y Prob + 6-OHDA los días 7 y 14 ( $p < 0.05$ ). El día 21 hubo diferencias entre los grupos AG + 6-OHDA vs. Prob + 6-OHDA y los grupos AG + 6-OHDA vs. AG + Salina ( $p < 0.05$ ) (Fig. 36). El valor porcentual del tiempo de recorrido previo a la lesión para el grupo AG + 6-OHDA fue de  $100 \pm 4.6\%$ , el cual incrementó a  $188.6 \pm 22.4\%$ ,  $198.5 \pm 40.1\%$  y  $205.4 \pm 38.0\%$  los días 7, 14 y 21, respectivamente. Para el grupo Prob + 6-OHDA el valor previo a la lesión fue de  $100 \pm 3.2\%$ , aumentando a  $112.2 \pm 10.6\%$ ,  $121.4 \pm 16.4\%$  y  $123.1 \pm 14.5\%$  los días 7, 14 y 21, respectivamente.



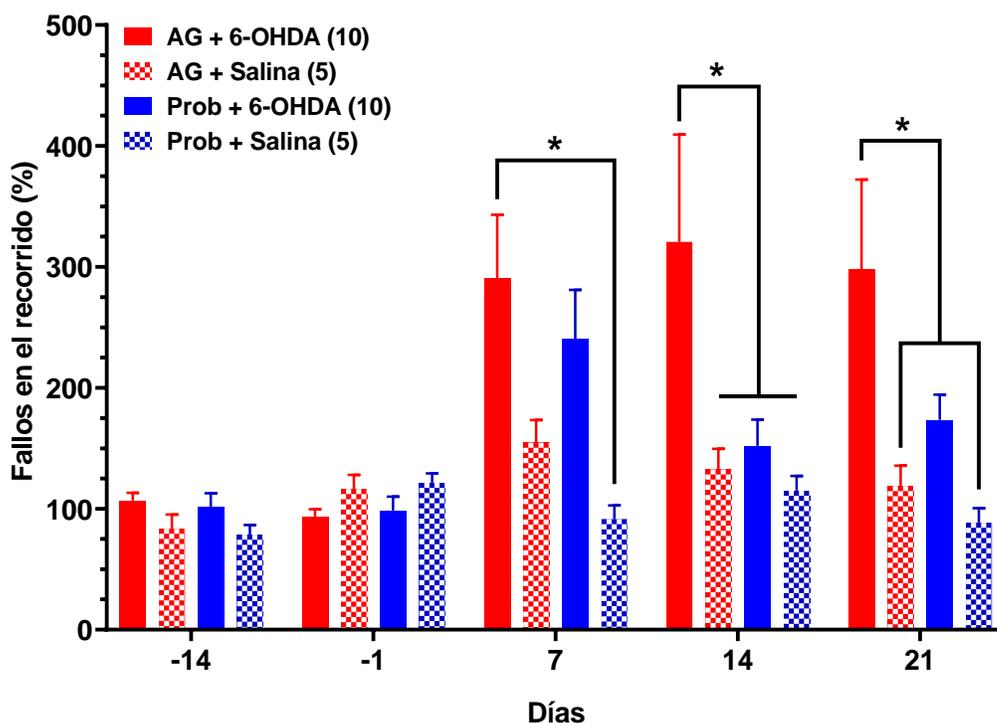
**Figura 36. Tiempos de recorrido de la pasarela estrecha elevada expresados en porcentaje.** Se presenta el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis. Los asteriscos denotan diferencias significativas ( $*p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba *post hoc* de Tukey.

En cada grupo, se realizó un ANOVA de medidas repetidas de una vía para comparar los cambios porcentuales en el tiempo de recorrido durante el desarrollo de la lesión dopaminérgica con respecto al día -1, previo a la cirugía de lesión o falsa lesión. El análisis del grupo AG + 6-OHDA señaló diferencias significativas:  $F(4,36) = 5.190$ ,  $p = 0.002$ . La prueba *post hoc* de Dunnett indicó diferencias en los días 14 ( $p < 0.05$ ) y 21 ( $p < 0.05$ ), en comparación con el día -1 (Fig. 37A). No se encontraron diferencias en el tiempo de recorrido para los demás grupos (Fig. 37B, C y D).



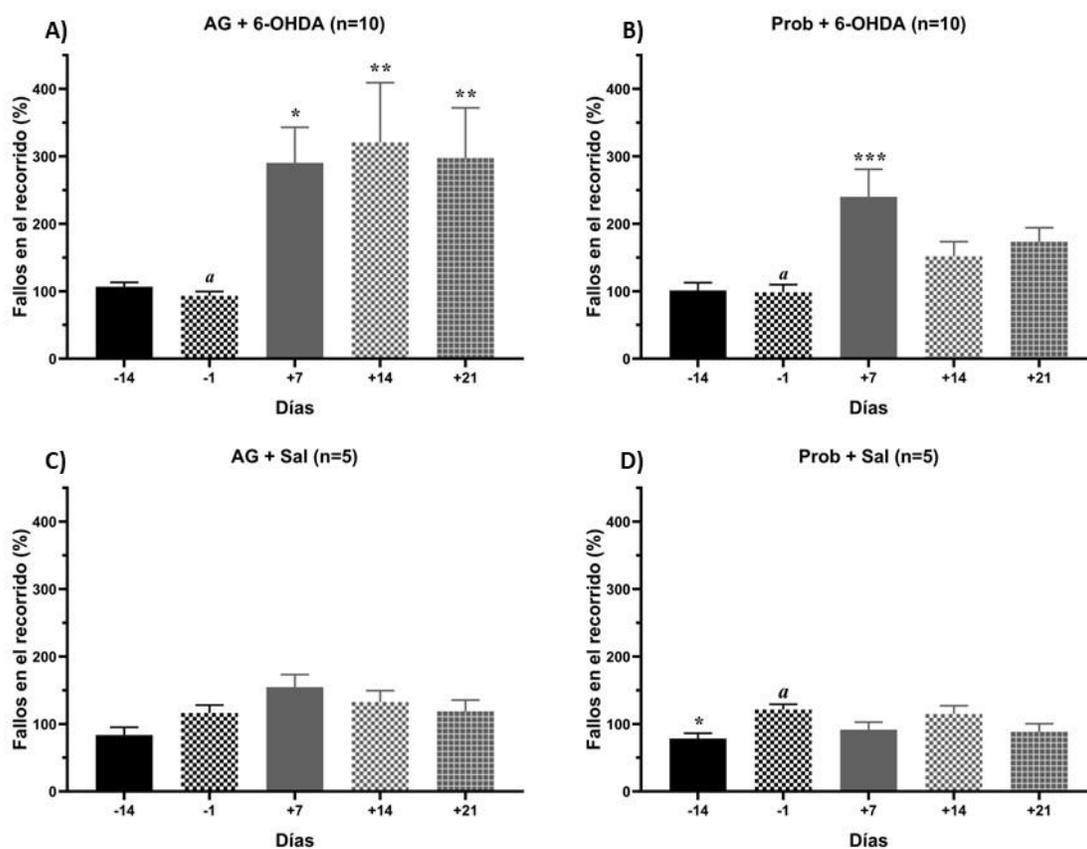
**Figura 37. Curso temporal de los porcentajes de los tiempos de recorrido en la prueba de la pasarela estrecha elevada.** Se presenta el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis para los grupos AG + 6-OHDA (A), Prob + 6-OHDA (B), AG + Sal (C) y Prob + Sal (D). Los asteriscos denotan diferencias significativas ( $*p < 0.05$ ) con respecto al día -1 (señalado con a) considerado como el grupo de referencia para la prueba *post hoc* de Dunnett.

El tratamiento con probióticos atenúa la incoordinación motora causada por la lesión con 6-OHDA, disminuyendo el número de fallos en el recorrido en la pasarela estrecha elevada. Considerando que entre los animales de un mismo grupo hubo una gran variabilidad en el número de fallos en la pasarela en los ensayos previos a la lesión, los resultados de todos los días fueron expresados en porcentaje, considerando el promedio de los días -14 y -1 como el 100%. El ANOVA de dos vías señaló diferencias significativas para los factores tratamiento:  $F(3,130) = 8.015$ ,  $p < 0.0001$  y día:  $F(4,130) = 4.135$ ,  $p = 0.0035$ , no así para la interacción de ambos factores:  $F(12,130) = 1.640$ ,  $p = 0.0882$ . La prueba *post hoc* de Tukey manifestó diferencias entre los grupos AG + 6-OHDA y Prob + Salina el día 7 ( $p < 0.05$ ); entre el grupo AG + 6-OHDA y todos los demás grupos el día 14 ( $p < 0.05$ ), así como entre el grupo AG + 6-OHDA y ambos grupos a los que se administró solución salina ( $p < 0.05$ ) en el día 21 (Fig. 38). El valor porcentual de los fallos cometidos en el recorrido de la pasarela elevada antes de la lesión para el grupo AG + 6-OHDA fue de  $100 \pm 6.4\%$  aumentando a  $290.6 \pm 52.5\%$ ,  $320.7 \pm 88.7\%$  y  $297.6 \pm 74.5\%$  los días 7, 14 y 21, respectivamente. El porcentaje de fallos prelesión del grupo Prob + 6-OHDA fue de  $100 \pm 11.4\%$ , que aumentó a  $240.4 \pm 40.6\%$ ,  $151.9 \pm 21.7\%$  y  $173.5 \pm 20.8\%$  los días 7, 14 y 21, respectivamente.



**Figura 38. Fallos en el recorrido de la pasarela estrecha elevada expresados en porcentaje.** Se presenta el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis. Los asteriscos denotan diferencias significativas ( $*p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba *post hoc* de Tukey.

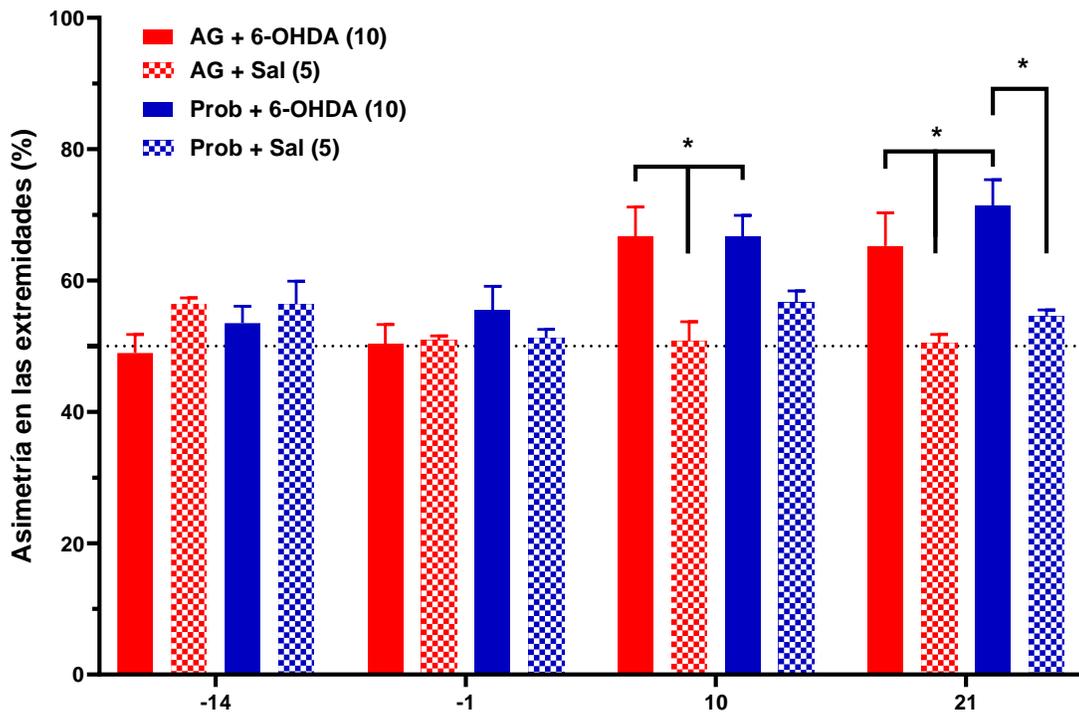
En cada grupo, se realizó un ANOVA de medidas repetidas de una vía para comparar los cambios porcentuales en los fallos durante el desarrollo de la lesión dopaminérgica con respecto al día -1, previo a la cirugía de lesión o falsa lesión. El análisis resultó significativo para los grupos AG + 6-OHDA:  $F(4,36) = 6.604$ ,  $p = 0.0004$ , Prob + 6-OHDA:  $F(4,36) = 6.798$ ,  $p = 0.0003$  y Prob + Sal:  $F(4,16) = 3.310$ ,  $p = 0.0372$ . Considerando el día -1 como referente, la prueba *post hoc* de Dunnett, reveló diferencias significativas en el grupo AG + 6-OHDA (Fig. 39A) en los días 7 ( $p < 0.05$ ), 14 ( $p < 0.01$ ) y 21 ( $p < 0.01$ ); en el grupo Prob + 6-OHDA (Fig. 39B) sólo en el día 7 ( $p < 0.001$ ) y en el grupo Prob + Sal (Fig. 39D) en el día -14 ( $p < 0.05$ ).



**Figura 39. Curso temporal de los fallos en el recorrido expresados en porcentaje en la pasarela elevada.** Se presenta el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis para los grupos AG + 6-OHDA (A), Prob + 6-OHDA (B), AG + Sal (C) y Prob + Sal (D). Los asteriscos denotan diferencias significativas ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ), en comparación con el día -1 (señalado con la letra **a**), de acuerdo a la prueba *post hoc* de Dunnett.

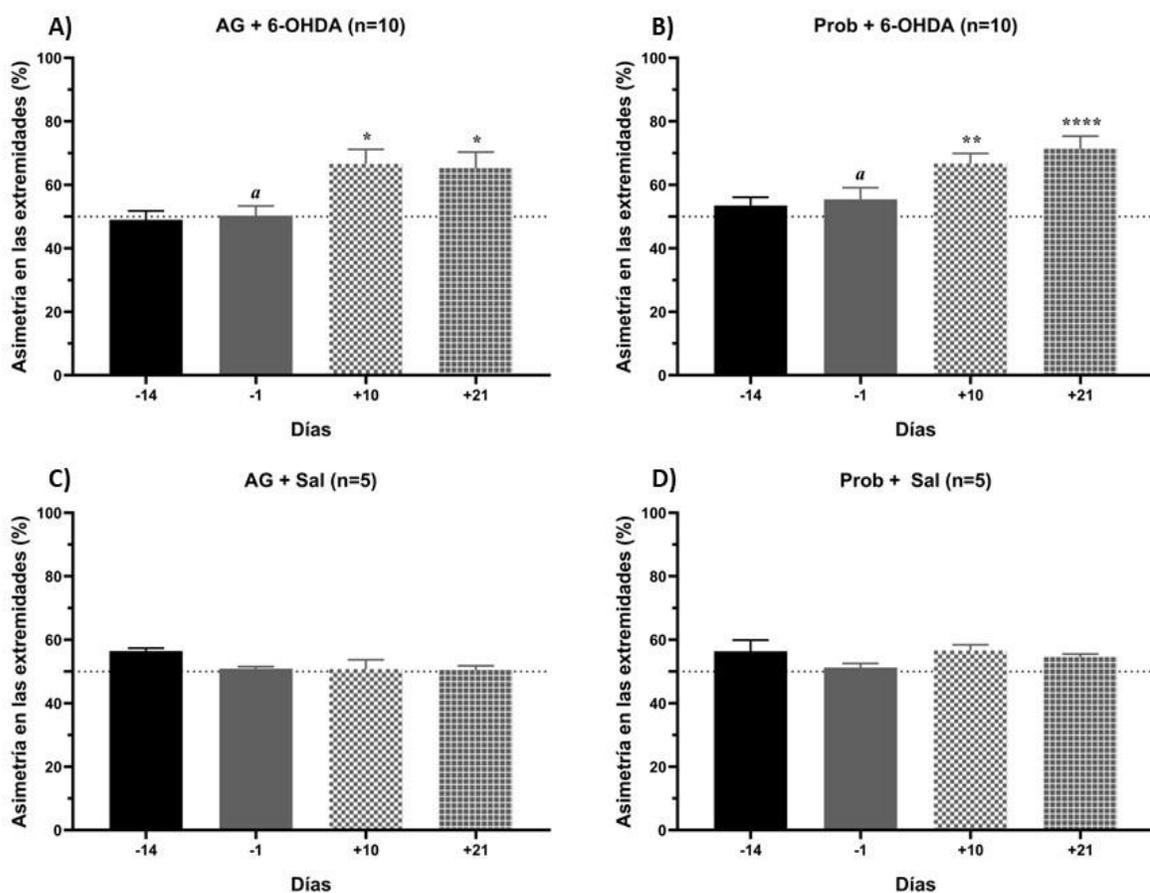
### *Cilindro*

El tratamiento con probióticos no tuvo efecto en el desarrollo de la asimetría en el uso de las patas delanteras, en los animales con hemiparkinsonismo inducido con 6-OHDA en el estriado derecho. Para calcular el porcentaje de la asimetría motora se consideró el número de contactos de las extremidades anteriores y se empleó la siguiente fórmula:  $[(\text{Apoyos de las extremidades ipsilaterales} + (\text{Apoyo de ambas extremidades}/2)] \times 100$ ; un resultado cercano a 50 % implica el uso indistinto (simétrico) de las extremidades, a medida que el valor se hace superior a 50 % supone una mayor dependencia de la extremidad anterior ipsilateral a la lesión. El ANOVA de dos vías señaló diferencias significativas para el factor tratamiento:  $F(3,104) = 4.868$ ,  $p = 0.0033$  y día:  $F(3,104) = 5.017$ ,  $p = 0.0027$ , no así para la interacción de ambos factores:  $F(9,104) = 2.316$ ,  $p = 0.0204$ . La prueba *post hoc* de Tukey indicó diferencias significativas entre el grupo AG + Salina vs. Los dos grupos lesionados con 6-OHDA ( $p < 0.05$ ) en los días 10 y 21; la diferencia en el porcentaje de asimetría también fue significativa el día 21 para los grupos Prob + 6-OHDA y Prob + Sal ( $p < 0.05$ ) (Fig. 40). El porcentaje de asimetría en la prueba del cilindro para el grupo AG + 6-OHDA fue de  $49.0 \pm 8.9\%$ ,  $50.3 \pm 9.5\%$ ,  $66.6 \pm 14.5\%$  y  $65.3 \pm 15.9\%$  para los días -14, -1, 10 y 21, respectivamente. Para el grupo Prob + 6-OHDA el porcentaje de asimetría fue  $53.5 \pm 8.1\%$ ,  $55.5 \pm 11.6\%$ ,  $66.7 \pm 10.1\%$  y  $71.4 \pm 12.4\%$  para los días -14, -1, 10 y 21, respectivamente.



**Figura 40. Porcentaje de asimetría en el uso de las patas delanteras en la prueba del cilindro.** La línea punteada horizontal en el eje de las ordenadas representa el uso equitativo de ambas extremidades anteriores. Los asteriscos denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la *prueba post hoc* de Tukey.

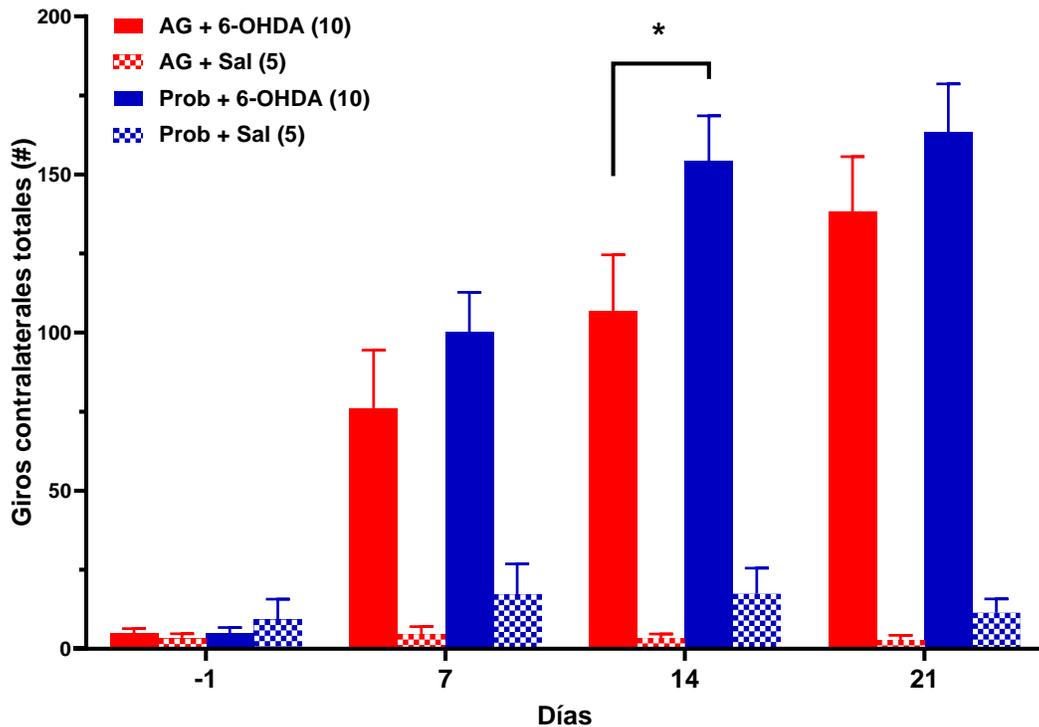
En cada grupo, se realizó un ANOVA de medidas repetidas de una vía para comparar los cambios porcentuales en la asimetría motora durante el desarrollo de la lesión dopaminérgica con respecto al día -1, previo a la cirugía de lesión o falsa lesión. El ANOVA de medidas repetidas para el grupo AG + 6-OHDA resultó significativa:  $F(3,27) = 5.309$ ,  $p = 0.0052$ . En comparación con el día -1, la prueba *post hoc* de Dunnett indicó diferencias significativas en el grupo AG + 6-OHDA (Fig. 41A) en los días 10 y 21 ( $p < 0.05$ ) y en el grupo Prob + 6-OHDA en los días 10 ( $p < 0.01$ ) y 21 ( $p < 0.001$ ) (Fig. 41B).



**Figura 41. Curso temporal de los porcentajes de asimetría en la prueba del cilindro.** Se presenta el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis para los grupos AG + 6-OHDA (A), Prob + 6-OHDA (B), AG + Sal (C) y Prob + Sal (D). La línea punteada horizontal en el eje de las ordenadas representa el uso simétrico de ambas extremidades anteriores. Los asteriscos denotan diferencias significativas ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $****p < 0.0001$ ) en comparación con el día -1 (señalado con la letra **a**), de acuerdo a la prueba *post hoc* de Dunnett.

### *Giro inducido por apomorfina*

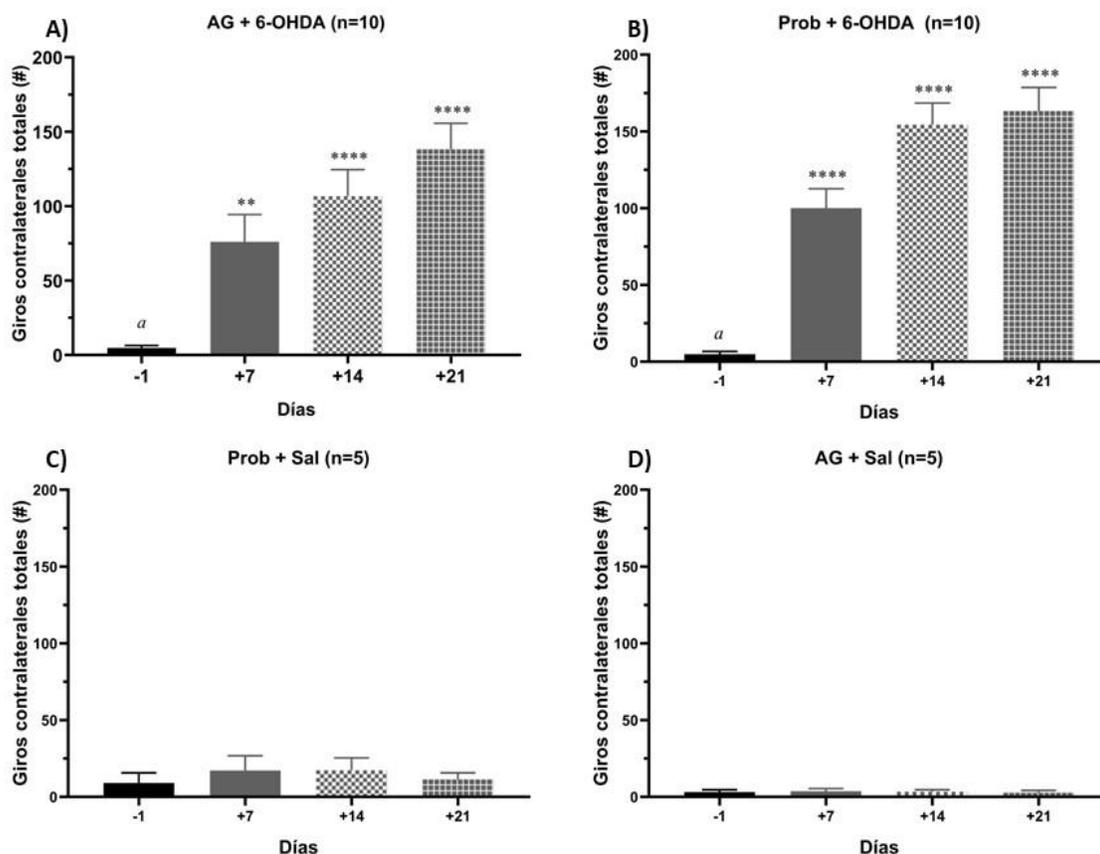
Comparado con el grupo AG + 6-OHDA, el tratamiento con probióticos aumentó el número de giros contralaterales inducidos por apomorfina en las pruebas realizadas después de la lesión con 6-OHDA. El ANOVA de dos vías señaló diferencias significativas para los factores tratamiento:  $F(3,104) = 49.10$ ,  $p < 0.0001$ , día:  $F(3,104) = 20.62$ ,  $p < 0.0001$  y la interacción de ambos factores  $F(9,104) = 6.947$ ,  $p < 0.0001$ . La prueba *post hoc* de Tukey indicó diferencias significativas entre los grupos lesionados con 6-OHDA y solución salina en todos los días ( $p < 0.01$ ). Para los grupos AG + 6-OHDA y Prob + 6-OHDA la diferencia fue significativa el día 14 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 42). El número giros contralaterales postlesión para el grupo AG + 6-OHDA fue de  $4.8 \pm 1.6$ ,  $76.1 \pm 18.3$ ,  $106.8 \pm 17.8$  y  $138.2 \pm 17.5$  para los días -1, 7, 14 y 21, respectivamente. Para el grupo Prob + 6-OHDA fue de  $4.9 \pm 1.8$ ,  $100.1 \pm 12.6$ ,  $154.4 \pm 14.1$  y  $163.3 \pm 15.4$  para los días -1, 7, 14 y 21, respectivamente.



**Figura 42. Giros contralaterales inducidos por apomorfina (0.25 mg/kg s.c.).** Se realizó un ensayo previo a la cirugía estereotáxica y tres posteriores a ésta a intervalos semanales. Se presenta el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis. Los asteriscos denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos lesionados con 6-OHDA de acuerdo a la prueba *post hoc* de Tukey.

En cada grupo, se realizó un ANOVA de medidas repetidas de una vía para comparar los cambios en el total de giros inducidos por apomorfina durante el desarrollo de la lesión dopaminérgica con respecto al día -1, previo a la cirugía de lesión o falsa lesión. El ANOVA de medidas repetidas resultó significativa para los grupos AG + 6-OHDA  $F(3,27) = 18.03$ ,  $p < 0.0001$  y Prob + 6-OHDA  $F(3,27) = 57.48$ ,  $p < 0.0001$ . Al comparar con los giros del día -1, la prueba *post hoc* de Dunnett señaló diferencias en los días 7, 14 y 21, tanto en el grupo AG + 6-OHDA (Fig. 43A) como en el grupo Prob + 6-OHDA (Fig. 43B). En los grupos con falsa

lesión, la administración de apomorfina no indujo aumentos significativos en el total de giros contralaterales con respecto al día -1 (Fig. 43C y 443D).



**Figura 43. Curso temporal de los giros inducidos por apomorfina.** Se presenta el promedio  $\pm$  EE del número de animales indicado entre paréntesis para los grupos AG + 6-OHDA (A), Prob + 6-OHDA (B), AG + Sal (C) y Prob + Sal (D). Los asteriscos denotan diferencias significativas (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ), en comparación con el día -1 (señalado con la letra *a*), de acuerdo a la prueba *post hoc* de Dunnett.

## DISCUSIÓN

Los probióticos reducen la degeneración dopaminérgica y la neuroinflamación en el estriado, pero no en la sustancia nigra.

Los resultados obtenidos señalan que la administración crónica de los probióticos *L. rhamnosus* LGG y *B. lactis* BB12 a ratas Wistar ejerce un efecto neuroprotector en el estriado lesionado con 6-OHDA, reduciendo la pérdida del área inmunorreactiva a TH y disminuyendo el reclutamiento de la microglía Iba1<sup>+</sup>, lo cual concuerda con hallazgos en otros modelos de EP.

En un estudio en ratones a los que se administró MPTP o rotenona, los grupos que recibieron durante 30 días el tratamiento con una mezcla de probióticos administrada en el agua de beber y constituida de *L. rhamnosus* GG, *B. animalis lactis* y *L. acidophilus*, a una cantidad aproximada de  $2 \times 10^6$  UFC de cada uno, tuvieron una menor pérdida de células TH<sup>+</sup> en la SNpc y de sus axones en el estriado, al igual que un menor reclutamiento de microglía Iba1<sup>+</sup> en la SNpc; los investigadores no reportaron Iba1<sup>+</sup> en el estriado <sup>85</sup>.

En un estudio más reciente realizado por Hsieh *et al.* (2020), en ratones modificados genéticamente mediante la eliminación del factor de transcripción mitocondrial A (*Tfam*) en las neuronas dopaminérgicas, que produce una deficiencia de la cadena respiratoria mitocondrial emulando el desarrollo progresivo de la EP, se encontró que el tratamiento desde la octava semana de edad con una mezcla de probióticos constituida por *B. Bifidum*, *B. longum*, *L. rhamnosis*, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* LP28, *Lactococcus lactis sub. Lactis*,  $1 \times 10^{10}$  UFC en total, durante 16 semanas administrados mediante una dieta líquida, también disminuyó la pérdida de somas TH<sup>+</sup> en la SNpc, en comparación del grupo tratado con placebo; en esta investigación no se reportaron marcadores de activación glial. <sup>86</sup>

Es importante señalar que las investigaciones de Hsieh *et al.* (2020), Srivastav *et al.* (2019) y el presente trabajo, tienen en común la administración de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* LGG, a la cual se le han atribuido los principales efectos neuroprotectores, manifestados por una menor pérdida de dopamina en el estriado, una reducción en el reclutamiento de microglía Iba1 y un aumento en los factores neurotróficos, como el BDNF y el GDNF<sup>85</sup>.

Se ha sugerido que esta actividad neuroprotectora está relacionada a la producción de metabolitos bioactivos entre los que destacan los AGCC, en particular el acetato, el propionato y el butirato.

Estudios en modelos de EP han manifestado el efecto neuroprotector del butirato proponiendo que su mecanismo incluye la reducción en la expresión genética de intermediarios inflamatorios, como el TNF $\alpha$  o la IL-1 $\beta$ <sup>100</sup>, lo que contribuiría a explicar el menor número de células Iba1<sup>+</sup> en el estriado de las ratas que recibieron el tratamiento con *L. rhamnosus* LGG y *B. lactis* BB-12 en esta investigación.

Se ha demostrado que el butirato atenúa la producción y secreción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos estimulados con lipopolisacárido.<sup>101</sup> La reducción de la producción de estos mediadores se atribuye al efecto inhibitorio sobre la vía de señalización del NF- $\kappa$ B o mediante su efecto inhibitorio sobre las HDAC.<sup>102</sup>

En líneas celulares de colon se ha reportado la reducción en la actividad de NF- $\kappa$ B a través de la activación del receptor GPR109a mediante el butirato; esto ocurre mediante la acción de  $\beta$  arrestina que evita la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , lo que resulta en la inhibición de NF- $\kappa$ B.<sup>103,104</sup>

Considerando que las células de la microglía son macrófagos residentes del SNC,<sup>7,36</sup> las cuales se han reportado que poseen receptores GPR109a<sup>102</sup> y que el butirato es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica,<sup>105</sup> es posible que

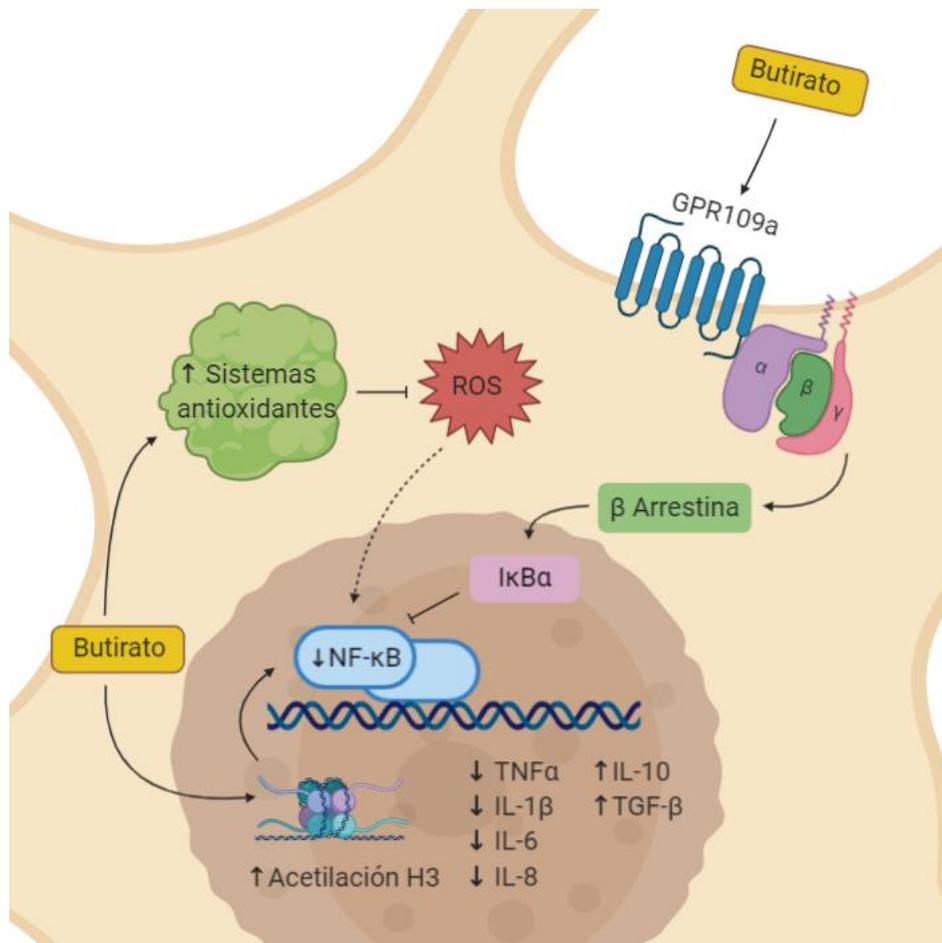
la inhibición de NF- $\kappa$ B limite el proceso inflamatorio y la neurodegeneración (Figura 44).<sup>102,104</sup>

Por otra parte, se ha demostrado que el butirato tiene una actividad moduladora en la acetilación de las histonas, una modificación postraducciona que influye en la propensión de un gen para ser transcrito o reprimido.<sup>106</sup> Este efecto se debe a su capacidad de inhibir a las HDAC,<sup>75,100</sup> un grupo de enzimas encargadas de la eliminación de grupos acetilo en residuos de lisina de las histonas, lo que resulta en condensación de la cromatina y disminución de la transcripción de genes.<sup>107</sup>

En humanos se han descrito 18 enzimas con actividad HDAC (numeradas convencionalmente HDAC1 a la 18), las cuales se han agrupado en 4 clases divididas en 2 categorías basadas en análisis filogenético molecular de sus estructuras primarias, su ubicación en la célula y su homología con las enzimas de levadura RPD3 y HDA1. La primera categoría, también llamada clásica se compone de las clases I, II y IV, cuya actividad depende de iones de Zinc ( $Zn^{+2}$ ); la segunda categoría también conocida como sirtuinas, incluye a la clase III cuya función depende del dinucleótido de adenina y nicotidamida ( $NAD^+$ ).<sup>108-110</sup>

Se ha demostrado que el butirato es capaz de inhibir las HDAC clase I y II. Las HDCA1 y 2 pertenecen a la clase I y se localizan en el núcleo de células de diversos tejidos.<sup>111,112</sup> Entre las funciones descritas de las HDAC1 y 2 están el desarrollo y función de la neuroglía, las neuronas y las sinapsis; también participan en la proliferación celular y en la respuesta al daño del DNA.<sup>109</sup>

En la microglía, la inhibición de las HDAC mediante el butirato aumenta la acetilación del residuo de la lisina en la posición de la Histona 3 (H3K9ac), dando como resultado un aumento en la producción de mediadores antiinflamatorios como IL-10 y causando una reducción de la transcripción de genes proinflamatorios como *Stat1* y *Tnf- $\alpha$*  (Figura 44).<sup>113</sup>



**Figura 44. Efectos del butirato en la regulación de la actividad inflamatoria en la microglía.** El butirato es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer un efecto directo sobre la microglía y, mediante diversos mecanismos, limitar la respuesta inflamatoria.<sup>103,104,112,113</sup>

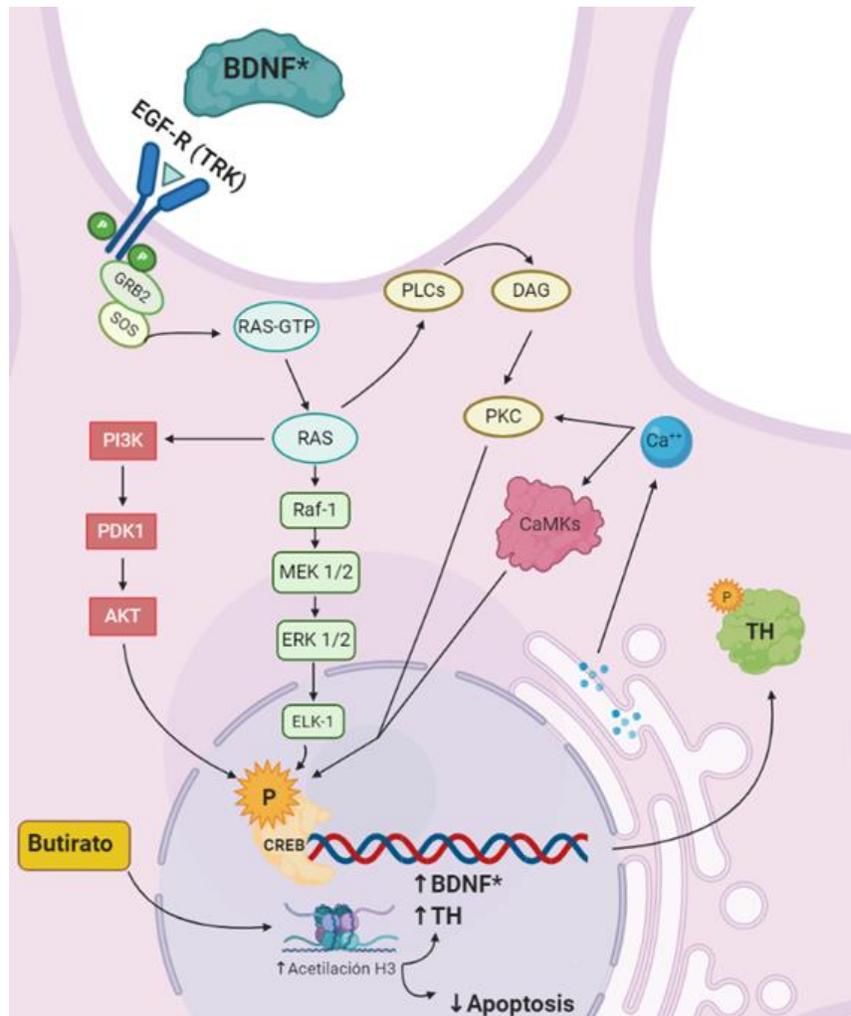
El efecto neuroprotector del butirato también se ha observado en cultivos de células dopaminérgicas derivadas de humano y de rata, donde inhibió la muerte celular inducida con la neurotoxina dopaminérgica MPP<sup>+</sup>, mediante el aumento de la acetilación de histonas.<sup>114</sup> En el modelo de EP inducido con rotenona en *Drosophila*, el butirato evitó la reducción de dopamina en el cerebro, inhibió la disfunción motora y la mortalidad temprana.<sup>111</sup> En el modelo de EP inducido con 6-OHDA en ratas, la inyección intraperitoneal de butirato de sodio (300 mg/kg) durante 14 días evitó las disfunciones motoras y, comparados con el grupo que

recibió el placebo, disminuyó la pérdida de axones dopaminérgicos en el estriado; inhibió la reducción de las concentraciones de DA y BDNF a causa de la neurotoxina; además de aumentar la acetilación de la histona H3.<sup>75</sup> Por otra parte se ha demostrado que la  $\alpha$ -SYN puede reducir la acetilación de esta histona y que este efecto tóxico es reducido por inhibidores de la HDAC, como el butirato.<sup>115</sup>

Otro grupo de evidencias plantean un mecanismo neuroprotector alternativo del butirato, mediante su capacidad para inducir un aumento en la producción de factores neurotróficos, como el BDNF y el GDNF.<sup>75,85,100</sup> Mediante la acción regulatoria del butirato para aumentar la acetilación alrededor de los promotores de factores neurotróficos, por lo tanto, aumentar su transcripción.<sup>116–118</sup>

El BDNF participa en la supervivencia y función correcta de las neuronas de los ganglios basales, éste factor neurotrófico se sintetiza en el cuerpo celular de las neuronas de la SNpc y es transportado de manera anterógrada al estriado, donde contribuye a la potenciación a largo plazo, modula el transporte de mRNA, su traducción en la sinapsis, además de regular las fases de iniciación y elongación en la síntesis de proteínas.<sup>119,120</sup>

El BDNF activa a la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) por fosforilación mediante al menos dos vías de señalización, la proteína quinasa tipo IV dependiente de calcio / calmodulina y mediante la vía Ras.<sup>121</sup> La fosforilación del CREB aumenta la síntesis de múltiples proteínas, entre ellas la tirosina hidroxilasa,<sup>122</sup> lo cual podría explicar la mayor inmunoreactividad a TH en el estriado de las ratas tratadas con probióticos encontrado en este trabajo (Figura 45).



**Figura 45. Efectos del butirato en la preservación de las neuronas dopaminérgicas.** Se ha reportado que el butirato aumenta la síntesis de BDNF, el cual es capaz de activar vías de señalización que favorecen la supervivencia celular y aumentan la síntesis de TH.<sup>121,122</sup>

Las cepas *L. rhamnosus* GG y *B. lactis* BB12 no se consideran especies productoras de butirato porque no poseen los genes *buk* y *but* que codifican a las enzimas que se usan habitualmente como marcadores de cepas butirogénicas;<sup>123</sup> sin embargo, existe evidencia que señala a los *L. rhamnosus* como posibles potenciadores del crecimiento de cepas butirogénicas.<sup>124</sup> Por su parte *B. lactis* BB12 podría contribuir a la producción de butirato mediante los productos de su metabolismo, principalmente acetato y lactato, los cuales podrían ser empleados por las cepas que tienen la capacidad de sintetizar butirato a partir de éstos.<sup>125,126</sup>

Se ha reportado que la mayor parte del butirato producido se debe a las interacciones dentro del ecosistema microbiano en el intestino, en donde los intermediarios producidos por el metabolismo de lactobacilos y bifidobacterias empleados en esta investigación servirían de sustratos para que otras cepas del filo *Firmicutes* como *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Roseburia* spp. *Eubacterium* spp. *Anaerostipes* spp. y *Butyrivicoccus pullicaecorum*,<sup>125</sup> sinteticen butirato mediante la condensación de acetyl CoA y la actividad de las enzimas butirato quinasa y butiril-CoA transferasa.<sup>123,127,128</sup>

En el estudio de Srivastav *et al.*<sup>85</sup> los animales tratados con probióticos tuvieron mayores concentraciones de butirato en el cerebro, y de histona H3 acetilada; en este mismo estudio se administró butirato por vía oral a los ratones, lo que resultó en una menor pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y de su correspondiente inervación estriatal causados por el MPTP, también se redujo la activación de la microglía y la astrogía en la SNpc, pero no se reportaron efectos de la activación glial en el estriado.<sup>85</sup> Los factores neurotróficos BDNF y GDNF también aumentaron en los grupos que recibieron el tratamiento con butirato <sup>85</sup>. En apoyo de esta idea, en un estudio previo se demostró que la administración de butirato de sodio vía intraperitoneal protegió a las ratas de los déficit cognitivos causados por la inyección intraestriatal de 6-OHDA, en la etapa previa a las alteraciones motoras <sup>129</sup>.

Otros autores han demostrado que *L. rhamnosus* LGG inhibe la apoptosis inducida por citoquinas mediante el bloqueo de la quinasa MAP p38, lo cual es producido también por otras cepas de lactobacilos, pero esta capacidad es mayor en *L. rhamnosus* LGG.<sup>130</sup> En estudios posteriores se aislaron mediante SDS-PAGE dos proteínas del sobrenadante del *L. rhamnosus* LGG, *L. casei* 334, *L. casei* 393 y *L. acidophilus* en el medio de cultivo *Lactobacillus* MRS; estas proteínas ejercían un efecto antiapoptótico y fueron denominadas proteínas de secreción mayor 1 y 2 (Msp1 y Msp2) por las discrepancias en sus pesos moleculares, 75 kDA y 40 kDA, respectivamente.<sup>131,132</sup> Cada una de estas proteínas demostró promover el crecimiento de células epiteliales intestinales humanas y de ratón, reducir la inflamación crónica en un modelo de colitis inducida con oxazolona y causar la fosforilación del receptor para el factor de crecimiento epidérmico promoviendo la activación de Akt (vía de señalización intracelular que promueve la supervivencia y el crecimiento celular).<sup>131,132</sup> Sin embargo, hasta la fecha aún no hay evidencias de que Msp1 y Msp2 viajen por la sangre y penetren al SNC, por lo que si contribuyen al mecanismo neuroprotector de los probióticos, éste podría deberse a una atenuación de la respuesta inmune inflamatoria a nivel intestinal, que indirectamente inhibiría la activación glial y la muerte de neuronas en el SNC.

Cabe destacar que existe información que propone que la modificación de la microbiota hacia cepas productoras de butirato podría ser de mayor utilidad para los pacientes con EP, en lugar de la administración oral del butirato, ya que además de su efecto protector sobre el SNC, se obtendrían beneficios deseables en la regulación de la permeabilidad intestinal, la respuesta inflamatoria y la liberación de hormonas enteroendocrinas.<sup>133</sup>

Similar a los estudios realizados por Hsieh *et al.* (2020) y Srivastav *et al.* (2019) en los que se evalúa el efecto neuroprotector de los probióticos en modelos de EP en ratones,<sup>85,86</sup> en la sustancia *nigra* hubo en promedio una menor pérdida

de somas dopaminérgicos en el grupo tratado con probióticos y lesionado con 6-OHDA, sin embargo, esta diferencia no fue significativa.

El efecto de la inyección intraestriatal de 6-OHDA depende de la dosis y el sitio de lesión.<sup>48</sup> Al administrarse la neurotoxina 6-OHDA en el estriado, causa la lesión retrógrada de los somas dopaminérgicos, emulando las etapas tempranas de la EP,<sup>93</sup> en los que la extensión de la degeneración de los somas en la SNpc podría ser limitada si la lesión estriatal fue pequeña.<sup>134</sup>

Un hallazgo importante del presente estudio fue el aumento significativo en la microglía Iba1<sup>+</sup> en tres regiones localizadas a 500 µm del punto del estriado donde se inyectó la 6-OHDA, lo cual concuerda con un estudio previo el cual muestra una imagen donde se puede apreciar el aumento de la microglía Iba1<sup>+</sup> alrededor de la trayectoria de la aguja con la cual se inyectó 6-OHDA en el estriado, excepto que las células no se cuantificaron.<sup>135</sup> En esta investigación, la activación microglial cercana al sitio de aplicación de la 6-OHDA fue de menor magnitud en las ratas que consumieron crónicamente los probióticos *L. rhamnosus* LGG y *B. Lactis* BB-12. Aunque no investigamos si la 6-OHDA causó también activación de la astrología (GFAP<sup>+</sup>), Kitamura *et al.*<sup>135</sup> si proporcionaron evidencia de que eso ocurre, por lo que faltaría estudiar si los probióticos son capaces de inhibir su activación inducida por la neurotoxina.

En cuanto a la activación de microglía Iba1<sup>+</sup> en la SNpc, no encontramos diferencias entre los grupos lesionados con 6-OHDA y los controles, lo cual contrasta con los hallazgos de un estudio en ratas Wistar realizado por Kitamura *et al.* (2010), a las cuales se les inyectó 6-OHDA en tres regiones del estriado (3 µg por sitio) encontrando que 10 días después ocurrió un aumento significativo de la microglía Iba1<sup>+</sup> en la SNpc.<sup>135</sup> Lo anterior pudo deberse a que la lesión abarcó una zona mayor en el estriado y que los marcadores de activación glial fueron medidos 10 días después de la administración de 6-OHDA, tiempo en el cual la respuesta inflamatoria causada por esta neurotoxina sigue activo,<sup>49,54,136</sup>

mientras que en este trabajo la fijación del cerebro para realizar la inmunohistoquímica de Iba1 se realizó 22 días después de la administración de la neurotoxina, momento en el cual la respuesta inflamatoria microglial en la SNpc pudo haber disminuido.<sup>49</sup>

Los probióticos reducen las alteraciones motoras en las pruebas de la pasarela elevada, pero no la asimetría en la exploración vertical en el cilindro

Lesiones unilaterales del sistema dopaminérgico nigroestriado ocasionan una marcada asimetría en el desempeño motor. En roedores esto se manifiesta como bradicinesia, incoordinación motora y dificultad en el uso de las extremidades contralaterales a la lesión.<sup>137</sup> El tratamiento con *L. rhamnosus* LGG y *B. Lactis* BB12 redujo la bradicinesia (tiempo de recorrido) y la incoordinación motora (fallos) que las ratas manifestaron en la pasarela estrecha elevada después de la lesión con 6-OHDA, lo cual probablemente se debió a la menor pérdida de innervación dopaminérgica en el estriado observada en el presente estudio.<sup>94</sup> Lo anterior concuerda con el efecto protector de la combinación de *L. rhamnosus* LGG, *B. animalis lactis* y *L. acidophilus* que atenuaron las deficiencias motoras de los ratones a los que se les indujo parkinsonismo con MPTP o rotenona.<sup>85</sup>

En el trabajo realizado por Srivastav *et al.* (2019), se observó que los ratones con parkinsonismo inducido con MPTP realizaron un menor número de exploraciones verticales de las paredes del cilindro, efecto que fue inhibido en el grupo que recibió tratamiento con probióticos. En contraste, en el presente estudio, las ratas tratadas con probióticos no mostraron reducción de la asimetría motora en la prueba del cilindro posterior a la denervación dopaminérgica unilateral. Esta aparente discrepancia podría deberse al hecho de que en el presente trabajo se indujo una lesión dopaminérgica unilateral en un área restringida del estriado de las ratas y la variable medida fue la asimetría en el uso de la pata ipsilateral a la lesión, mientras que en el estudio de Srivastav *et al.*<sup>85</sup> la lesión dopaminérgica fue bilateral y generalizada a todas las neuronas dopaminérgicas del cerebro de los ratones, por lo que en vez de medir la asimetría motora se cuantificó el

número de eventos de exploración vertical con las dos patas anteriores en las paredes del cilindro.

Los probióticos aumentan los giros inducidos por apomorfina

La prueba de giros inducidos por apomorfina se usa comúnmente para evaluar la magnitud de la pérdida de neuronas dopaminérgicas en el sistema nigroestriatal de ratas y ratones.<sup>138</sup> Sin embargo es importante señalar que la intensidad del comportamiento giratorio es un mal predictor de la disfunción motora; esto se explica debido a variaciones individuales de la lesión, a conductas compensatorias que desarrollan los animales posteriores a la lesión dopaminérgica y a variaciones neuroanatómicas únicas de cada rata.<sup>139</sup>

Existe evidencia que señala que la rotación está determinada por la supersensibilidad de los receptores dopaminérgicos D2, que a su vez depende de la magnitud de la denervación dopaminérgica del estriado.<sup>97</sup> El sitio del cuerpo estriado en el que se produce la pérdida de inervación dopaminérgica es un factor que influye en la intensidad de los giros inducidos con apomorfina, siendo la zona dorsolateral la más determinante, mientras que la extensión de la lesión a otras zonas como el estriado ventral o el núcleo *accumbens* podría contribuir, aunque no de la misma manera.<sup>137</sup>

En concordancia con lo anterior, nosotros encontramos que la lesión dopaminérgica en el estriado dorsolateral causada por la 6-OHDA condicionó que la apomorfina produjese giros contralaterales en comparación con aquellas ratas que recibieron solución salina; sin embargo, contrario a lo que predice la teoría, el tratamiento con probióticos favoreció un aumento del número de giros inducidos por apomorfina, a pesar de que la denervación dopaminérgica en el estriado fue menor en este grupo.

Para explicar este hallazgo hay que considerar que tras la interrupción de la comunicación dopaminérgica a causa de la inyección unilateral de 6-OHDA existe una mayor expresión del receptor D2 y un mejor acoplamiento entre éste y las

proteínas G, lo que contribuye a explicar el desarrollo de la supersensibilidad dopaminérgica.<sup>140,141</sup>

Hay evidencia de que en ratas Sprague-Dawley lesionadas unilateralmente con 6-OHDA, la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 con quinpirol causa giros contralaterales y activa la cascada de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) en el cuerpo estriado lesionado.<sup>142</sup> En esta misma investigación se demostró que la inhibición selectiva de la señalización de ERK redujo el número de giros contralaterales inducidos con quinpirol. Los autores concluyeron que el desequilibrio en la señalización de la vía ERK entre ambos hemisferios del cerebro es un paso necesario para que se manifieste la hiperactividad locomotora que ocasiona el comportamiento rotatorio inducido por la activación del receptor D2.<sup>142</sup> En base a lo anterior, cabe la posibilidad de que el tratamiento con *L. rhamnosus* y *B. Lactis* pudo ejercer una acción facilitadora de la vía de señalización ERK mediada por los receptores dopaminérgicos D2 supersensibilizados por la denervación dopaminérgica, la cual solo se atenuó parcialmente por el tratamiento con los probióticos. En apoyo a esta idea, se encuentra documentado que los probióticos en particular *L. rhamnosus*, son capaces de incrementar la síntesis de BDNF en el cerebro.<sup>85</sup> Así, al unirse este factor neurotrófico con su receptor activaría la vía de señalización RAS-ERK a través de las MAP kinasas.<sup>143-146</sup> Con base a lo anterior, se puede proponer la hipótesis de que el tratamiento con probióticos aumenta la síntesis de BDNF, favoreciendo la señalización de la vía RAS-ERK en los receptores D2 supersensibles, lo que aumentaría los giros inducidos por apomorfina en el grupo tratado con probióticos, incluso cuando el área de la denervación dopaminérgica en el estriado haya sido menor que en el grupo tratado con el placebo (aceite de girasol). Esta hipótesis amerita verificación en futuros estudios.

En el estriado cerca del 90% de las neuronas son GABAérgicas y por su morfología se conocen como neuronas espinosas medianas (SPN). Las SPN participan en la regulación de la conducta motora, a través de las sinapsis que

sus axones establecen con distintos núcleos del circuito de los ganglios de la base.<sup>147</sup> Aproximadamente el 50% de las SPN expresan preferentemente receptores dopaminérgicos de tipo D1 y utilizan sustancia P como co-transmisor; estas neuronas proyectan sus axones en la llamada vía directa, que hace sinapsis con las neuronas de la sustancia *nigra pars reticulata* y el segmento interno del del globo pálido.<sup>148</sup> La otra mitad de las SPN expresan principalmente receptores dopaminérgicos D2 y emplean encefalina como co-transmisor; estas neuronas forman la vía indirecta que hace sinapsis con el segmento interno del globo pálido.<sup>148</sup> Ambos conjuntos de SPN disparan potenciales de acción ante el estímulo del glutamato, neurotransmisor excitador liberado por las aferentes de neuronas corticales y talámicas.<sup>148</sup> Sin embargo, la excitación glutamatérgica de las SPN se modulan contrariamente por la dopamina, dependiendo del tipo de receptores que predominan en cada una; en las SPN de la vía directa la activación de los receptores D1 (acoplado a una proteína  $G_{s/olf}$ ) favorece la excitabilidad mediada por el glutamato, mientras que en las SPN de la vía indirecta la activación de los receptores D2 (acoplados a proteínas  $G_{i/o}$  y  $G_q$ ) inhibe la excitabilidad inducida por glutamato.<sup>147,149</sup> A pesar de que la dopamina produce acciones opuestas en las SPN de las vías directa e indirecta, sus efectos globales en el control motor son sinérgicos, es decir, permite que los movimientos voluntarios se realicen de manera ordinaria y fluida.<sup>148</sup> La pérdida de inervación dopaminérgica desencadena cambios neuroplásticos que alteran la forma de codificación de la información en el circuito de los ganglios de la base, que se traducen en las alteraciones motoras típicas de la EP.<sup>148</sup>

En el modelo empleado en esta investigación, tras la lesión dopaminérgica intraestriatal, la reducción de DA causa alteraciones en la excitabilidad intrínseca y las conexiones sinápticas, que en las primeras 3 semanas se observan principalmente en las SPN de la vía indirecta; sin embargo, dado que no se administraron los probióticos por un plazo mayor no se evaluó su influencia sobre la respuesta homeostática a largo plazo (más de dos meses) en que la

adaptación se manifiesta en ambas vías (directa e indirecta) reduciendo el desequilibrio entre éstas y minimizando la fisiopatología que se considera subyace a los síntomas hipocinéticos, permitiendo observar mejorías en el desempeño motor.<sup>149</sup>

#### Efectos del tratamiento con probióticos en pacientes con EP

La información de los efectos de la suplementación con probióticos en pacientes con EP es bastante limitada. Durante el curso de la presente investigación se publicaron dos ensayos clínicos aleatorizados doble ciego, en los que a los pacientes con EP se les dio tratamiento diariamente con una mezcla de *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*, y *L. fermentum* ( $2 \times 10^9$  UFC de cada uno) durante 12 semanas. En el primer estudio la suplementación con probióticos redujo la expresión de IL-1, IL-8 y TNF- $\alpha$ ; además aumentó el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y el receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR- $\gamma$ ), todos los anteriores en células mononucleares de sangre periférica.<sup>82</sup>

En el segundo reporte disponible, la suplementación con los mismos probióticos y a las mismas dosis logró reducir los trastornos del movimiento (The Movement Disorders Society-Unified Parkinson's Disease Rating Scale), así como los marcadores inflamatorios (proteína C reactiva) y de estrés oxidativo (malondialdehído); a la vez que aumentó los niveles de antioxidantes (glutación) en el plasma.<sup>83</sup>

Es importante señalar que, en contraste con estos ensayos clínicos, los estudios preclínicos para evaluar el efecto neuroprotector de los probióticos se realizaron en modelos animales que suelen emular las etapas tempranas del desarrollo de la EP, y su administración inició de manera previa a la aplicación de la neurotoxina usada para inducir la degeneración dopaminérgica.

Tomando en conjunto los resultados obtenidos en este trabajo, los dos estudios en roedores<sup>85,86</sup> y los estudios clínicos antes citados,<sup>82,83</sup> se puede sugerir que los probióticos son capaces de reducir los trastornos del movimiento, aumentar los factores de crecimiento, la reducir la inflamación y el estrés oxidativo en la EP.<sup>82,83,85,86</sup>

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo surgen una serie de cuestionamientos para continuar la investigación, los cuales podrían ayudar a dilucidar los posibles mecanismos del efecto neuroprotector observado, por ejemplo:

- ¿Qué cambios ocurren en la composición de la microbiota intestinal y su metabolismo con el tratamiento individual de *L. rhamnosus* LGG o *B. lactis* BB-12?
- ¿Existen otros mecanismos inexplorados que pudieran estar mediando la actividad antiinflamatoria y neuroprotectora, por ejemplo, proteínas producidas por la microbiota que sean capaces de activar a los receptores de tirosina quinasa?
- ¿La actividad neuroprotectora de los probióticos está mediada primordialmente por vías neuronales o humorales? ¿Puede la modificación de alguna de estas vías influir sobre la composición de la microbiota?
- ¿Qué cambios ocurren sobre el fenotipo y la actividad metabólica de otras células relacionadas con la fisiopatología de la EP, como los astrocitos y las SPN?
- ¿Qué modificaciones ocurren a nivel intestinal en el metabolismo de la dopamina, la serotonina, el mantenimiento de la función de barrera, la reducción de la inflamación local y el control del crecimiento de cepas patógenas que pudieran causar una disbiosis?

- ¿Los probióticos ejercen su efecto neuroprotector en etapas previas a la degeneración dopaminérgica, o son capaces de reducir la neurodegeneración una vez que ésta ya ha empezado?

### **Limitaciones**

El modelo ideal de EP debe imitar sus características patológicas y clínicas, involucrar los sistemas dopaminérgicos del sistema nervioso central y del sistema nervioso periférico; además de la sintomatología motora y no motora. Debería ser capaz de reflejar el inicio dependiente de la edad y la progresión de la neurodegeneración a través de un periodo de tiempo considerable, de manera que emule a lo observado en la EP. Sin embargo, ningún modelo animal (ya sea genético o neurotóxico) cuenta con todas estas características. El modelo de hemiparkinsonismo inducido con 6-OHDA carece de los efectos progresivos y dependientes del envejecimiento, además de no formar agregados de  $\alpha$ -SYN, sin embargo, permite ajustar la dosis y los volúmenes de inyección en distintas áreas de la vía nigroestriada, siendo quizás la inyección en el estriado la más relevante para probar terapias neuroprotectoras.

En este proyecto se administraron probióticos en un periodo de tiempo previo a la lesión y posterior a ésta por lo que no es posible dilucidar cuál es la temporalidad necesaria para ejercer neuroprotección en este modelo.

## CONCLUSIONES

En el modelo de hemiparkinsonismo inducido en ratas macho adultas mediante la inyección de 6-OHDA en el estriado dorsolateral, la administración crónica de los probióticos *Lactobacillus rhamnosus* LGG y *Bifidobacterium lactis* BB-12:

1. Disminuyó la pérdida de inervación dopaminérgica en el estriado, pero no tuvo efecto en la disminución de los somas dopaminérgicos en la sustancia *nigra*.
2. Disminuyó el reclutamiento de microglía Iba1<sup>+</sup> en el estriado, sin embargo, no tuvo efecto en el reclutamiento microglial en la sustancia *nigra*.
3. La activación de la microglía no se correlaciona con la denervación dopaminérgica en el estriado.
4. Inhibió el aumento del tiempo de recorrido y de los fallos en la prueba conductual de la pasarela estrecha elevada, indicativos de menor bradicinesia e incoordinación motora, pero no evitó el desarrollo de asimetría motora en el uso de las extremidades anteriores en la prueba del cilindro.
5. No atenuó el número de giros contralaterales inducidos por apomorfina posterior a la lesión con 6-OHDA.

Se concluye que el tratamiento crónico con *Lactobacillus rhamnosus* LGG y *Bifidobacterium lactis* BB-12 ejerce un efecto neuroprotector en el modelo de hemiparkinsonismo inducido con 6-OHDA en ratas, manifestado por una reducción del área de denervación dopaminérgica, una menor activación de la microglía en el estriado y una reducción de la bradicinesia e incoordinación motora durante la caminata.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martínez-Fernández. R, Gasca-Salas C. C, Sánchez-Ferro Á, Ángel Obeso J. Actualización en la enfermedad de Parkinson. Rev Médica Clínica Las Condes. 2016;27:363–79.
2. Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. Lancet. 2015;386:896–912.
3. Noyce AJ, Bestwick JP, Silveira-Moriyama L, Hawkes CH, Giovannoni G, Lees AJ, et al. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. Annals of Neurology. 2012;72:893–901.
4. Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: Its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. Neurobiology of Disease. 2010;37:510–8.
5. Przedborski S. Neuroinflammation and Parkinson ' s disease. Clinical Neurology. 2007;83:535-551
6. Duke DC, Moran LB, Pearce RKB, Graeber MB. The medial and lateral substantia nigra in Parkinson's disease: mRNA profiles associated with higher brain tissue vulnerability. Neurogenetics. 2007;8:83–94.
7. Long-Smith CM, Sullivan AM, Nolan YM. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. Progress in Neurobiology. 2009;89:277–87.
8. Martínez-Gómez A. Comunicación entre células gliales y neuronas I. Astrocitos, células de Schwann que no forman mielina y células de Schwann perisinápticas. Med e Investig. 2014;2:75–84.
9. Saha RN, Pahan K. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. Neurochem Int. 2006;49:154–63.
10. Joe EH, Choi DJ, An J, Eun JH, Jou I, Park S. Astrocytes, microglia, and Parkinson's disease. Experimental Neurobiology; 2018;27:77–87.
11. Liddle RA. Parkinson's disease from the gut. Brain Research. 2018;1693:201–6.
12. Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. The gut-brain axis: Interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. Ann Gastroenterol. 2015;28:203–9.
13. Wang HX, Wang YP. Gut microbiota-brain axis. Chinese Medical Journal. 2016;129:2373–80.
14. Vinolo M, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. Nutrients. 2011;3:858–76.
15. Degrootola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. Inflamm Bowel Dis. 2016;22:1137–50.

16. Wang Y, Kasper LH. The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*. Academic Press Inc. 2014;38:1–12.
17. Kelly JR, Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G, Hyland NP. Breaking down the barriers: The gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015;9:1-20.
18. Walker AW, Lawley TD. Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacological Research*. 2013;69:75–86.
19. Wang H, Lee IS, Braun C, Enck P. Effect of probiotics on central nervous system functions in animals and humans: A systematic review. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. 2016;22:589–605.
20. Rogers GB, Keating DJ, Young RL, Wong ML, Licinio J, Wesselingh S. From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: Mechanisms and pathways. *Molecular Psychiatry*. 2016;21:738–48.
21. Goetz CG. The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1:1-15
22. Parra-Medina E, Arankowsky-Sandoval G, Salazar-Ceballos J, Góngora-Alfaro J. Latencia diagnóstica en la enfermedad de Parkinson y su relación con los síntomas prodrómicos motores y no motores. *Eneurobiología*. 2019;10:1–8.
23. Benito-León J. Epidemiology of Parkinson's disease in Spain and its contextualisation in the world. *Rev Neurol*. 2018;66:125–34.
24. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves T. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. 2014;29:1583–90.
25. Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*. 2007;68:384–6.
26. Sánchez V. La enfermedad que pondrá a temblar a México [Internet]. Agencia Informativa Conacyt. 2017 [cited 2019 Nov 13].
27. Rodríguez-Violante M, Velásquez-Pérez L, Cervantes-Arriaga A. Incidence rates of Parkinson's disease in Mexico: Analysis of 2014-2017 statistics. *Rev Mex Neurocienc*. 2019;20:136–40.
28. Gómez-Chavarín M, Roldan-Roldan G, Morales-Espinoza R, Pérez-Soto G, Torner-Aguilar C. Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson. *Arch Neurociencias*. 2012;17:26–34.
29. Masters C, Kril J, Halliday G, Collins S, Pamphlett R, Hill A, et al. Overview and recent advances in neuropathology: Part 2: Neurodegeneration. *Pathology*. 2011;43:93–102.

30. Wang L, Das U, Scott D, Tang Y, McLean P, Roy S.  $\alpha$ -Synuclein multimers cluster synaptic vesicles and attenuate recycling. *Curr Biol*. 2014;24:2319–26.
31. Hasegawa M, Fujiwara H, Nonaka T, Wakabayashi K, Takahashi H, Lee VMY, et al. Phosphorylated  $\alpha$ -synuclein is ubiquitinated in  $\alpha$ -synucleinopathy lesions. *J Biol Chem*. 2002;277:49071–6.
32. AIDakheel A, Kalia LV, Lang AE. Pathogenesis-Targeted, Disease-Modifying Therapies in Parkinson Disease. *Neurotherapeutics*. 2014;11:6–23.
33. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat*. 2015;9:1–9.
34. Rocha N, De Miranda A, Teixeira A. Insights into neuroinflammation in Parkinson's disease: From biomarkers to anti-inflammatory based therapies. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1-12
35. Davis E, Foster T, Thomas W. Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Research Bulletin*. 1994 34:73–8.
36. Lull M, Block M. Microglial Activation and Chronic Neurodegeneration. *Neurotherapeutics*. 2010;7:354–65.
37. Náchter-Carda V. La microglía y su función inmunitaria en el sistema nervioso. *Dialnet*. 1995;1:173–189.
38. Parra I, Martínez I, Ramírez-García G, Tizabi Y, Mendieta L. Differential Effects of LPS and 6-OHDA on Microglia's Morphology in Rats: Implications for Inflammatory Model of Parkinson's Disease. *Neurotox Res*. 2020;37:1-11.
39. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic Inflammation and Oxidative Stress as a Major Cause of Age- Related Diseases and Cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2009;3:73–80.
40. Ros-Bernal F, Hunot S, Herrero MT, Parnadeau S, Corvol JC, Lu L, et al. Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:6632–7.
41. Luquin Piudo MR. Modelos experimentales de enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol*. 2000;3:60-66
42. Jonsson G, Sachs C. Effects of 6-hydroxydopamine on the uptake and storage of noradrenaline in sympathetic adrenergic neurons. *Eur J Pharmacol*. 1970;9:141–55.
43. Ungerstedt U. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*. 1968;5:107–10
44. Ávila-Luna A, Bueno-Nava A, Para D. Los ganglios basales: la participación dopaminérgica estriatal. 2014;3:19–24.

45. Glinka YY, Youdim MBH. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol Environ Toxicol.* 1995;292:329–32.
46. Jonsson G. Studies on the mechanisms of 6-hydroxydopamine cytotoxicity. *Med Biol.* 1976;54:406–20.
47. Rodriguez-Pallares J, Parga J, Muñoz A, Rey P, Guerra M, Labandeira-García J. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: The role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurochem.* 2007;103:145–56.
48. Hernandez B, Nadella D, Rovirosa-Hernandez R, Zavala-Flores M, Jarquin L, Rosas C de J. Animal Model of Parkinson Disease: Neuroinflammation and Apoptosis in the 6-Hydroxydopamine-Induced Model. *Animal Model of Parkinson Disease: Neuroinflammation and Apoptosis in the 6-Hydroxydopamine-Induced Model. Experimental Animal Models of Human Diseases - An Effective Therapeutic Strategy.* 2018;17:375-394
49. Walsh S, Finn D, Dowd E. Time-course of nigrostriatal neurodegeneration and neuroinflammation in the 6-hydroxydopamine-induced axonal and terminal lesion models of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience.* 2011;175:251–61.
50. Ungerstedt U. Adipsia and Aphagia after 6-Hydroxydopamine Induced Degeneration of the Nigro-striatal Dopamine System. *Acta Physiol Scand.* 1971;82:95–122.
51. Ferro M, Bellissimo M, Anselmo-Franci J, Angellucci M, Canteras N, Da Cunha C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J Neurosci Methods.* 2005;148:78–87
52. Yuan H, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods.* 2005;144:35–45.
53. Kirik D, Rosenblad C, Björklund A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol.* 1998;152:259–77.
54. Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: An evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Experimental Neurology.* Academic Press Inc. 2002;175:303–17.
55. Pérez-Pardo P, Hartog M, Garssen J, Kraneveld AD. Microbes Tickling Your Tummy: the Importance of the Gut-Brain Axis in Parkinson's Disease. *Curr Behav Neurosci Reports.* 2017;4:361–8.

56. Gold A, Turkalp ZT, Munoz DG. Enteric alpha-synuclein expression is increased in Parkinson's disease but not Alzheimer's disease. *Mov Disord*. 2013;28:237–41.
57. Chandra R, Hiniker A, Kuo YM, Nussbaum RL, Liddle RA.  $\alpha$ -Synuclein in gut endocrine cells and its implications for Parkinson's disease. *JCI insight*. 2017;15:1-13.
58. Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH, Voigt RM, Shaikh M, Jaglin JA, et al. Increased Intestinal Permeability Correlates with Sigmoid Mucosa alpha-Synuclein Staining and Endotoxin Exposure Markers in Early Parkinson's Disease. *PLoS One*. 2011;6:1-10
59. Clairembault T, Leclair-Visonneau L, Coron E, Bourreille A, Le Dily S, Vavasseur F, et al. Structural alterations of the intestinal epithelial barrier in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2015;10:3-12.
60. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015;21:8836–47.
61. Tan AH, Mahadeva S, Thalha AM, Gibson PR, Kiew CK, Yeat CM, et al. Small intestinal bacterial overgrowth in Parkinson's disease. *Park Relat Disord*. 2014;20:535–40.
62. Gabrielli M, Bonazzi P, Scarpellini E, Bendia E, Lauritano EC, Fasano A, et al. Prevalence of Small Intestinal Bacterial Overgrowth in Parkinson's Disease. *Mov Disord*. 2011;26:889–92.
63. Dukowicz AC, Lacy BE, Levine GM. Small intestinal bacterial overgrowth: A comprehensive review. *Gastroenterology and Hepatology*. 2007;3:112–22.
64. Gerhardt S, Mohajeri MH. Changes of colonic bacterial composition in parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Nutrients*. 2018;10:1-23
65. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11:506–14.
66. Pandey KR, Naik SR, Vakil B V. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*. 2015;52:7577–87.
67. Toscano M, De Grandi R, Pastorelli L, Vecchi M, Drago L. A consumer's guide for probiotics: 10 golden rules for a correct use. *Digestive and Liver Disease*. 2017;49:1177–84.
68. Rodríguez JM. Probióticos: Del laboratorio al consumidor. *Nutr Hosp*. 2015;31:33–47.
69. Slover CM. Lactobacillus: a Review. *Clin Microbiol News*. 2008;30:23–7.

70. Mesquita AR, Silveira LP, Cruz Filho IJ, Lima VF, Silveira Filho, Araujo AA, et al. Metabolism and physiology of Lactobacilli: a review. *J Environ Anal Prog.* 2017;2:115.
71. O'Callaghan A, van Sinderen D. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Frontiers in Microbiology.* 2016;7:1-23.
72. Hole M. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition.* 2003;1:5604–5612
73. Erdman SE. Gut microbiota: Microbes offer engineering strategies to combat cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.* 2016.;13:125–6.
74. Ghaisas S, Maher J, Kanthasamy A. Gut microbiome in health and disease: Linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases. *Pharmacology and Therapeutics.* 2016;158:52–62.
75. Sharma S, Taliyan R, Singh S. Beneficial effects of sodium butyrate in 6-OHDA induced neurotoxicity and behavioral abnormalities: Modulation of histone deacetylase activity. *Behav Brain Res.* 2015;291:306–14.
76. Bermúdez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr Metab.* 2012;61:160–74.
77. Wang Q, Liu Y, Zhou J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Translational Neurodegeneration.* BioMed Central Ltd. 2015;4:1-9.
78. Wang Y, Wu Y, Wang Y, Xu H, Mei X, Yu D, et al. Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients.* 2017;9:521
79. Cassani E, Privitera G, Pezzoli G, Pusani C, Madio C, Iorio L, et al. Use of probiotics for the treatment of constipation in Parkinson's disease patients. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2011;57:117–21.
80. Georgescu D, Ancusa OE, Georgescu LA, Ionita I, Reisz D. Nonmotor gastrointestinal disorders in older patients with Parkinson's disease: Is there hope? *Clin Interv Aging.* 2016;11:1601–8.
81. Barichella M, Pacchetti C, Bolliri C, Cassani E, Iorio L, Pusani C, et al. Probiotics and prebiotic fiber for constipation associated with Parkinson disease. *Neurology.* 2016;87:1274–80.
82. Borzabadi S, Oryan S, Eidi A, Aghadavod E, Kakhaki RD, Tamtaji OR, et al. The effects of probiotic supplementation on gene expression related to inflammation, insulin and lipid in patients with Parkinson's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arch Iran Med.* 2018;21:289–95.
83. Tamtaji OR, Taghizadeh M, Daneshvar Kakhaki R, Kouchaki E, Bahmani F, Borzabadi S, et al. Clinical and metabolic response to probiotic administration in people with Parkinson's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Nutr.* 2019;38:1031–5.

84. Felice VD, Quigley EM, Sullivan AM, O’Keeffe GW, O’Mahony SM. Microbiota-gut-brain signalling in Parkinson’s disease: Implications for non-motor symptoms. *Parkinsonism and Related Disorders*. 2016;27:1–8.
85. Srivastav S, Neupane S, Bhurtel S, Katila N, Maharjan S, Choi H, et al. Probiotics mixture increases butyrate, and subsequently rescues the nigral dopaminergic neurons from MPTP and rotenone-induced neurotoxicity. *J Nutr Biochem*. 2019;69:73–86.
86. Hsieh TH, Kuo CW, Hsieh KH, Shieh MJ, Peng CW, Chen YC, et al. Probiotics alleviate the progressive deterioration of motor functions in a mouse model of Parkinson’s disease. *Brain Sci*. 2020;10:1-13.
87. Coghlan LG, Lee DR, Psencik B, Weiss D. Practical and effective eradication of pinworms (*Syphacia muris*) in rats by use of fenbendazole. *Lab Anim Sci*. 1993;43:481–7.
88. Keen R, Macinnis M, Guilhardi P, Chamberland K, Church R. The lack of behavioral effects of fenbendazole: a medication for pinworm infection. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2005;44:17–23.
89. Perumal AS, Gopal VB, Tordzro WK, Cooper TB, Cadet JL. Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain. *Brain Res Bull*. 1992;29:699–701.
90. Cadet JL, Katz M, Jackson-Lewis V, Fahn S. Vitamin E attenuates the toxic effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats: Behavioral and biochemical evidence. *Brain Res*. 1989;476:10-15.
91. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition*. Elsevier Acad Press. 2007;170:547–612.
92. West MO, Carelli RM, Pomerantz M, Cohen SM, Gardner JP, Chapin JK, et al. A region in the dorsolateral striatum of the rat exhibiting single-unit correlations with specific locomotor limb movements. *J Neurophysiol*. 1990;64:1233–46.
93. Przedbroski S, Leviver M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, et al. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*. 1995;67:631–47.
94. Allbutt HN, Henderson JM. Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson’s disease. *J Neurosci Methods*. 2007;159:195–202.
95. Elgueta D, Contreras F, Prado C, Montoya A, Ugalde V, Chovar O, et al. Dopamine receptor D3 expression is altered in CD4+ T-cells from Parkinson’s disease patients and its pharmacologic inhibition attenuates the motor impairment in a mouse model. *Front Immunol*. 2019;10:1–17.

96. Schallert T, Tillerson JL. Intervention Strategies for Degeneration of Dopamine Neurons in Parkinsonism. In: Central Nervous System Diseases. Humana Press; 2000. p. 131–51.
97. Marshall JF, Ungerstedt U. Supersensitivity to apomorphine following destruction of the ascending dopamine neurons: Quantification using the rotational model. *Eur J Pharmacol.* 1977;41:361–7.
98. Ungerstedt U. 6-Hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine pathway: The turning syndrome. *Pharmacol Ther Part B Gen Syst.* 1976;2:37–40.
99. Mori MA, Delattre AM, Carabelli B, Pudell C, Bortolanza M, Staziaki PV, et al. Neuroprotective effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the 6-OHDA model of Parkinson's disease is mediated by a reduction of inducible nitric oxide synthase. *Nutr Neurosci.* 2018;21:341–51.
100. Bourassa MW, Alim I, Bultman SJ, Ratan RR. Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health? *Neurosci Lett.* 2016;625:56–63.
101. Chang P, Haob L, Offermanns S, Medzhitova R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *PNAS.* 2014;11:2247–2252.
102. Reyes R, Zhang Z, Gao L, Asatryan L. Microbiome meets microglia in neuroinflammation and neurological disorders. *Neuroinflammation.* 2020;20:215–33.
103. Thangaraju M, Cresci GA, Liu K, Ananth S, Gnanaprakasam JP, Browning DD, et al. GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer Res.* 2009;69(7):2826–32.
104. Chai J, Digby J, Choudhury R. GPR109A and vascular inflammation. *Curr Atheroscler Rep.* 2013;15(5):1-10.
105. Parker A, Fonseca S, Carding S. Gut microbes and metabolites as modulators of blood-brain barrier integrity and brain health. *Gut Microbes.* 2020;11(2):135–57.
106. Santos A, Lindner A. Protein Posttranslational Modifications: Roles in Aging and Age-Related Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 5716409:1-17
107. Sriraks R, Limpaboon T. Histone deacetylases and their inhibitors as potential therapeutic drugs for cholangiocarcinoma -cell line findings. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2013;14(4):2503–8.
108. Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect.* 2014;6(4):1-26

109. Lawlor L, Yang XB. Harnessing the HDAC–histone deacetylase enzymes, inhibitors and how these can be utilised in tissue engineering. *Int J Oral Sci.* 2019;11(2):20.
110. Shukla S, Tekwani BL. Histone Deacetylases Inhibitors in Neurodegenerative Diseases, Neuroprotection and Neuronal Differentiation. *Frontiers in Pharmacology.* 2020;11(537):1-20.
111. Laurent R, O'Brien L, Ahmad S. Sodium butyrate improves locomotor impairment and early mortality in a rotenone-induced *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2013;246(1):382–90.
112. Huuskonen J, Suuronen T, Nuutinen T, Kyrölenko S, Salminen A. Regulation of microglial inflammatory response by sodium butyrate and short-chain fatty acids. *Br J Pharmacol.* 2004;141(5):874–80.
113. Patnala R, Arumugam T, Gupta N, Dheen S. HDAC Inhibitor Sodium Butyrate-Mediated Epigenetic Regulation Enhances Neuroprotective Function of Microglia During Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol.* 2017;54(8):6391–411.
114. Kidd SK, Schneider JS. Protection of dopaminergic cells from MPP+-mediated toxicity by histone deacetylase inhibition. *Brain Res.* 2010;1354:172–8.
115. Kontopoulos E, Parvin J, Feany M. A-Synuclein Acts in the Nucleus To Inhibit Histone Acetylation and Promote Neurotoxicity. *Hum Mol Genet.* 2006;15(20):3012–23.
116. Barichello T, Generoso JS, Simões LR, Faller CJ, Ceretta RA, Petronilho F, et al. Sodium Butyrate Prevents Memory Impairment by Re-establishing BDNF and GDNF Expression in Experimental Pneumococcal Meningitis. *Mol Neurobiol.* 2015;52:734–40.
117. Varela RB, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Mariot E, Dal-Pont GC, Amboni RT, et al. Sodium butyrate and mood stabilizers block ouabain-induced hyperlocomotion and increase BDNF, NGF and GDNF levels in brain of Wistar rats. *J Psychiatr Res.* 2015;61:114–21.
118. Wu X, Chen PS, Dallas S, Wilson B, Block ML, Wang CC, et al. Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2008;11:1123–34.
119. Leal G, Comprido D, Duarte CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology.* 2014;76:639–56.
120. Baydyuk M, Xu B. BDNF signaling and survival of striatal neurons. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:1–10.
121. Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME. CREB: A major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron.* 1997;19:1031–47.

122. Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D. Neuroscience. 5th ed. SA Inc. 2015:759 .
123. Vital M, Karch A, Pieper DH. Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans: an Overview Using Omics Data. *mSystems*. 2017;2:43–51.
124. Canani RB, Sangwan N, Stefka AT, Nocerino R, Paparo L, Aitoro R, et al. Lactobacillus rhamnosus GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J*. 2016;10:742–50.
125. Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Front Microbiol*. 2016;7(979):1-21
126. Oliveira R, Perego P, de Oliveira M, Converti A. Growth, organic acids profile and sugar metabolism of Bifidobacterium lactis in co-culture with Streptococcus thermophilus: The inulin effect. *Food Res Int*. 2012;48(1):21–7.
127. Stilling RM, van de Wouw M, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? *Neurochem Int*. 2016;99:110–32.
128. Morrison DJ, Mackay WG, Edwards CA, Preston T, Dodson B, Weaver LT. Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate? *Br J Nutr*. 2006;96:570–7.
129. Rane P, Shields J, Heffernan M, Guo Y, Akbarian S, King JA. The histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, alleviates cognitive deficits in pre-motor stage PD. *Neuropharmacology*. 2012;62:2409–12.
130. Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2002;277:50959–65.
131. Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK, Polk DB. Soluble Proteins Produced by Probiotic Bacteria Regulate Intestinal Epithelial Cell Survival and Growth. *Gastroenterology*. 2007;132:562–75.
132. Yan F, Polk DB. Characterization of a probiotic-derived soluble protein which reveals a mechanism of preventive and treatment effects of probiotics on intestinal inflammatory diseases. *Gut Microbes*. 2012;3:25-28.
133. Cantu-Jungles T, Rasmussen H, Hamaker B. Potential of prebiotic butyrogenic fibers in Parkinson’s disease. *Front Neurol*. 2019;10:1–8.
134. Burke R, O’Malley K. Axon Degeneration in Parkinson’s Disease. *Exp Neurol*. 2013; 246:72-83
135. Kitamura Y, Inden M, Minamino H, Abe M, Takata K, Taniguchi T. The 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal neurodegeneration

- produces microglia-like NG2 glial cells in the rat substantia nigra. *Glia*. 2010;58:1686–700.
136. Hernández-Baltazar D, Zavala-Flores L, Villanueva-Olivo A. El modelo de 6-hidroxidopamina y la fisiopatología parkinsoniana: nuevos hallazgos en un viejo modelo. *Neurología. Spanish Society of Neurology*; 2017;32:533–9.
  137. Björklund A, Dunnett S. The amphetamine induced rotation test: A re-assessment of its use as a tool to monitor motor impairment and functional recovery in rodent models of Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*. 2019;9:17–29.
  138. Hudson J, van Horne C, Strömberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, et al. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res*. 1993;626:167–74.
  139. Metz G, Whishaw I. Drug-induced rotation intensity in unilateral dopamine-depleted rats is not correlated with end point or qualitative measures of forelimb or hindlimb motor performance. *Neuroscience*. 2002;111(2):325–36.
  140. Arnt J, Hyttel J. Differential involvement of dopamine D-1 and D-2 receptors in the circling behaviour induced by apomorphine, SK & F 38393, pergolide and LY 171555 in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Psychopharmacology*. 1985;85:346–52.
  141. Hu XT, Wachtel SR, Galloway MP, White FJ. Lesions of the nigrostriatal dopamine projection increase the inhibitory effects of D1 and D2 dopamine agonists on caudate-putamen neurons and relieve D2 receptors from the necessity of D1 receptor stimulation. *J Neurosci*. 1990;10:2318–29.
  142. Cai G, Zhen X, Uryu K, Friedman E. Activation of extracellular signal-regulated protein kinases is associated with a sensitized locomotor response to D2 dopamine receptor stimulation in unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurosci*. 2000;20:1849–57.
  143. Curtis J, Finkbeiner S. Sending signals from the synapse to the nucleus: Possible roles for CaMK, Ras/ERK, and SAPK pathways in the regulation of synaptic plasticity and neuronal growth. *J Neurosci Res*. 1999;58:88–95.
  144. Santos AR, Comprido D, Duarte CB. Regulation of local translation at the synapse by BDNF. *Prog Neurobiol*. 2010;92:505–16.
  145. Stornetta RL, Zhu JJ. Ras and Rap signaling in synaptic plasticity and mental disorders. *Neuroscientist*. 2011;17:54–78.

146. Zhong J. RAS and downstream RAF-MEK and PI3K-AKT signaling in neuronal development, function and dysfunction. *Biol Chem.* 2016;397:215–22.
147. Gerfen C, Surmeier D. Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. *Annu Rev Neurosc.* 2011;34(1):441–66.
148. Obeso J, Marín C, Rodríguez-Oroz C, Blesa J, Benitez-Temiño B, Mena-Segovia J, et al. The basal ganglia in Parkinson's disease: Current concepts and unexplained observations. *Ann Neurol.* 2008;64:30–46.
149. Zhai S, Shen W, Graves S, Surmeier D. Dopaminergic modulation of striatal function and Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 2019;126(4):411–22.

## ANEXOS

### Anexo 1. Dictamen del Comité de Ética de la Facultad de Medicina, UADY.



Mérida, Yucatán, a 23 días del mes de noviembre de 2018.

Dra. Irma Isela Aranda González  
*Investigadora Principal*

El Comité de Ética de esta Facultad revisó el protocolo con Folio No 02-2018, titulado "Evaluación del efecto neuroprotector de probióticos sobre el modelo de Parkinson inducido mediante 6-hidroxidopamina en ratas Wistar", a desarrollarse en el Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" de la Universidad Autónoma de Yucatán, Av. Itzáes 490, CP 97000, Mérida, Yucatán.

La evaluación se basó en el protocolo de investigación, versión corregida del 30 de octubre de 2018, presentado por usted, y se ha determinado en reunión ordinaria del día de hoy que el protocolo no presenta reparos éticos. En consecuencia, el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UADY dictamina el proyecto como:

**Aprobado**

Apegándonos al Título V, Capítulo Único, Artículo 109 de la Ley General de Salud en Materia de Investigación acerca de dar seguimiento a los dictámenes; deberá informar al comité los avances del protocolo cada semestre a partir de la fecha de hoy. Formato disponible en nuestro sitio web.

Su proyecto estará vigente hasta el 30 de noviembre de 2019, de acuerdo con el cronograma que presenta, sin embargo, la vigencia estará sujeta a que los informes semestrales sean cumplidos en tiempo y forma.

En caso de modificación del protocolo aprobado, deberá solicitar al Comité de Ética la aprobación de dichas modificaciones.

Es responsabilidad de usted comunicar al CEI:

- Cualquier enmienda del protocolo que pudiera afectar el bienestar de los participantes en la investigación.
- La terminación o suspensión prematura del estudio, las razones y los resultados obtenidos.
- Ingresos o bajas de investigadores colaboradores.

Al término del estudio deberá enviar un resumen final de los resultados e informar sobre la publicación de este cuando así ocurra.

Debe tener en cuenta que el Comité de Ética puede llegar a supervisar el estudio y éste debe de estarse realizando en el lugar y tal y cual menciona el protocolo y este dictamen.

Al término del estudio, se le emitirá una carta donde se especificará que el protocolo fue aprobado y llevado a cabo con la aprobación de este Comité.

ATENTAMENTE



Dra. Ritá Esther Zapata Vázquez  
Presidenta del Comité de Ética

ccp. Coordinación de Investigación  
ccp. Archivo del Comité de Ética.

Av. Itzáes entre 59 y 59-A Apdo. Postal 1225-A C.P. 97000, Mérida, Yuc., Méx.  
Tels.: 923-32-60, 923-32-97, 928-59-85 y 928-53-29, Fax: (999) 924-05-54

## Anexo 2. Extensión de la vigencia del proyecto



COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO,  
INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN

SIST/294/19

A quien corresponda:

Me permito informarle que en los archivos del SISTPROY se ha realizado la siguiente modificación en la fecha de término de vigencia del proyecto y que a continuación se describe:

Clave: **FMED-2019-0001**  
Responsable: **Aranda González Irma Isela**  
Nombre del Proyecto: **Evaluación del efecto neuroprotector de probióticos sobre el modelo de Parkinson inducido mediante 6-Hidroxidopamina en ratas Wistar**  
Fecha de Término: **04/01/2021**

En la fecha de término mencionada en este documento, enviar el cierre del proyecto. Se expide el presente, en la Ciudad de Mérida Yucatán, el 11 de noviembre de 2019. Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"Luz, Ciencia y Verdad"

Dr. Rafael A. Rojas Herrera  
Coordinador General



Ccp Archivo

Administración Central de la UADY, Calle 55 (avenida Rafael Matos Escobedo), s/n, entre Circuito Colonias y Calle 16, Fraccionamiento del Parque, C.P. 97160, Tel. 930-0130 ext. 74114, 74115, 74119 | Mérida, Yucatán, México |

[www.uady.mx](http://www.uady.mx)

