



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

“Evaluación del Efecto de Metabolitos de la Microbiota Intestinal sobre la respuesta del
Inflamosoma NLRP3 en un Modelo de Neurodegeneración Celular asociado a la
Enfermedad de Parkinson”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias en Neurometabolismo

Presenta

Medico General Juan Carlos Ferreira Alcántara

Dirigido por:

Dra. En C. Mardey Liceth Cuellar Núñez

Co-Director:

M. en C. Nelly Jovana Pastén Castrejón

Querétaro, Qro. a 24 de septiembre de 2025

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Maestría en Ciencias en Neurometabolismo

“Evaluación del Efecto de Metabolitos de la Microbiota Intestinal sobre la respuesta del
Inflamosoma NLRP3 en un Modelo de Neurodegeneración Celular asociado a la
Enfermedad de Parkinson”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias en Neurometabolismo

Presenta

Medico General Juan Carlos Ferreira Alcántara

Dirigido por:

Dra. En C. Mardey Liceth Cuellar Núñez

Co-dirigido por:

M. en C. Nelly Jovana Pastén Castrejón

Dra. En C. Mardey Liceth Cuellar Núñez

Presidente

M. en C. Nelly Jovana Pastén Castrejón

Secretario

Dra. En C. Ma. Elena Villagrán Herrera

Vocal

Dra. En C. María del Carmen Mejía Vázquez

Suplente

Dra. En C. Ana Isabel Burguete García

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

México

Dedicatorias

Para ti, querida Remedios Skinfiel González, quien sin lugar a dudas creyó fielmente en mí, incluso en ese último momento, y que como mayor atributo me enseñaste el jamás rendirme ni dejar de perseguir mis sueños, sin tu inspiración y sin ese deseo de encontrar algo relevante en la medicina y las ciencias que pudiera ayudar a personas que como tu lo viviste, cursan con la Enfermedad de Parkinson tal vez no estuviera escribiendo estas líneas el día de hoy, donde siembro el resultado de todo lo que alguna vez me hiciste prometer. Donde sea que hoy estes, esto es desde lo más profundo de mí, un trabajo inspirado en ti, y que se que logrará ayudar a muchas personas a luchar contra esta enfermedad.

Para la Dra. Liceth Cuellar Núñez, intachable, siempre valiente, honrada y siempre presente, quien dedico horas de esfuerzo para que este proyecto saliera adelante, incluso durante la madrugada. Quien me enseñó en este periodo de trabajo en conjunto, que hacer investigación no se trata solo de dar indicaciones detrás de un escritorio, sino que, implica la dedicación, entrega y acompañamiento significativo para que los estudiantes se sientan cómodos, respetados y honrados con el tiempo que invierten en sus proyectos, no como obligación, sino, con la misma pasión, la pasión de un infante que tiene un hambre voraz por querer descubrir el mundo. Le agradezco de todo corazón, el hecho de que, en este viaje, más que ser solo una profesora, es y siempre será aquella que creyó en mí, con un proyecto que se diseñó y creo desde cero y que, con trabajo en conjunto, e incluso con el miedo de ser un área que con anterioridad nunca había trabajado, creyó en mí, creyó en lo que tenía en mente y me dio toda la pauta para crear todo lo que hemos logrado y presentado el día de hoy. Genuinamente y desde lo más profundo de mi corazón, le agradezco, por mostrarme la humanidad y la humildad de la Investigación, pero por sobre todas las cosas, el calor reconfortante de crecer en un núcleo académico donde busca que sus alumnos crezcan, que honren la lealtad, el compañerismo, y que nunca se traicionen como equipo de trabajo. Le agradezco por ser esa calidez y por ser más que un profesor más, una compañera valiosa de aquí en adelante, en mi camino en Investigación.

Para la Dra. Jovana Pastén, indomable, increíble y siempre innovadora. Quien me enseñó el valor de la investigación desde la humanidad, la humildad y el amor por lo que se hace, no

por el número de publicaciones o el número de estudiantes que se tiene en asesoramiento. Le agradezco su calidez, su apoyo y su esencia noble. Agradezco todos esos momentos donde me diste soporte cuando todo se volvía difícil en este viaje. Agradezco tu calidez humana y tus lecciones sobre nunca pasar por sobre los demás solo por un grado académico o una posición institucional. Te agradezco tu eterna presencia, tu transmisión de valores, educación emocional, tu resiliencia y también, el que me mostrarás que el camino de la Investigación no es una militarización jerárquica asignada por títulos en una institución, sino horas de trabajo en laboratorio, pasión por lo que se hace y fe ciega, aun cuando crees que las cosas no saldrán como las esperas. Gracias por permitirme ser su primer alumno titulado y al igual que la Dra. Liceth, creer en todos mis sueños y mis ambiciones, proporcionándome todos los medios necesarios para lograrlos. La llevó conmigo, siempre en mi corazón, gracias, por tanto.

Para la Dra. Villagrán, quien, desde su sinceridad, fue la primera docente en creer en mí y ver todo mi potencial, agradezco estos 10 años de trabajo en conjunto, agradezco que, durante todo este tiempo, más que equipo, ya seamos como una familia. Gracias desde lo más profundo de mi corazón, porque, fue esa persona que creyó en mí desde el principio de mi carrera, fue usted quien me mostro el camino de lo correcto, lo honrado, lo humilde y, sobre todo, la pasión por la investigación, pasión que, a través de mi recorrido académico, y como me lo mostro mucho tiempo usted, se pierde cuando uno se olvida de su nombre y adopta un título como identidad. Luchadora innata en contra de las injusticias, personaje altamente protector y fiel a su equipo de trabajo, luchadora imparable, y también, una madre académica, con la que aprendí desde mis primeros días en la facultad los principios de la ética y también de la moral, quien me enseñó a trabajar con bichos raros y quien me enseñó que a veces en lo más ignorado, es donde esta toda verdad. Quien me enseñó a agarrar y calibrar una pipeta por primera vez, quien me enseñó a leer un ELISA, pero por, sobre todo, quien me enseñó a ser un humano cálido y de grandes valores, y que me enseñó que, en investigación, más que los grados académicos, importa el alma, el empeño, la dedicación y la pasión.

Para la Dra. Carmen Mejía, quien en tan poco tiempo creyó en mi capacidad de sacar este proyecto adelante, y miro en mí la capacidad de lograr grandes cosas. Agradezco a usted el

apoyo brindado, no solo material, sino también académico, resolviendo mis dudas incluso a altas horas de la noche o fines de semana, e inclusive, investigando a la par de mí para poder resolver esas dudas, siempre tan puntuales y específicas que le proponía durante estas arduas horas de trabajo. también agradezco cada comentario tan enriquecedor y bien fundado durante los exámenes de evaluación de este proyecto, sin su perspicaz vista metodológica, no tendríamos la posibilidad de presentar el día de hoy los resultados de este tan ambicioso proyecto.

Para la Dra. Sofía Díaz, ilustre docente del Instituto de Neurobiología, que aun sin conocerme, y sin tener necesidad alguna de hacerlo, su autenticidad y pasión me brindo grandes elementos que me permitieron llevar a cabo este proceso de investigación tan apasionante que culmina hoy, le agradezco tanto por creer en mis capacidades y en mi ambición y por proporcionarme los elementos necesarios para hacer crecer este proyecto aún más de lo que ya era, y muchos ingenuamente creyeron que no se podría acabar por no vez de manera perspicaz, la capacidad de los estudiantes que se encuentran a su alrededor.

Para la Dra. Guadalupe López, integra científica, noble persona, excelente docente, pero lo más importante, una gran humanidad y humildad, quien, en este viaje me ha apoyado, aun sin ser parte directa de los evaluadores, sino que lo ha hecho por su gran amor por su profesión. Gran ejemplo de perseverancia y resiliencia, gran académica, con valores tan grandes, que ha logrado opacar a otros por su valor, por su trabajo, por su honestidad, pero, sobre todo, por su honradez. De corazón agradezco todo su apoyo, y también todas esas horas de laboratorio en las que estuvo ahí para mí.

Para mis padres, quienes han sido mi sostén durante todos estos años y que sin lugar a dudas han alimentado más el cumplir mis sueños como nadie más. Este trabajo es para ustedes también, donde resalto la naturaleza del esfuerzo que ha conllevado que yo este el día de hoy estudiando un posgrado y que busquen seguir alimentando esas ganas de crecer que tengo sin dudarlos en forma alguna.

A mi equipo de trabajo, quien más que simplemente amigos, se volvieron una familia, y me sostuvo incluso en esos momentos de crisis donde creía no poder más. Infinitamente

agradecido con cada uno de ustedes por el apoyo y soporte que en estos 24 meses me brindaron sin dudar.

A mis estudiantes, por creer en mí y ver desde otra perspectiva que la medicina va más allá de solo ver la enfermedad de un paciente a través de signos y síntomas, sino entender de manera profunda y humana, y desde una visión realmente científica, lo que sucede en realidad con cada uno de nuestros pacientes en la práctica diaria.

Agradecimientos

A Fondos de Proyectos Especiales de Rectoría, FOPER (Edición 2025) por el apoyo financiero, Facultad de Medicina (UAQ) e Instituto de Neurobiología (UNAM, Campus Juriquilla), por el apoyo en la realización de los experimentos.

Índice

Dedicatorias	3
Agradecimientos	7
Índice	8
Índice de cuadros	11
Índice de Imágenes.....	12
Abreviaturas y siglas	14
Resumen	15
Abstract	16
Introducción	17
Planteamiento del problema.....	17
Justificación	17
Antecedentes	18
Panorama general de la Enfermedad de Parkinson.....	18
Vida rural.....	21
Envejecimiento y cambios fisiológicos asociados	21
Factores de susceptibilidad para el desarrollo de la PD.....	22
Factores protectores para el desarrollo de la PD	22
Actividad física.....	22
Consumo de cafeína	22
Consumo de nicotina	23
Diagnóstico de la PD	23
Cuadro clínico de la enfermedad	23
Estudios diagnósticos.....	24
Estudios de imagen:.....	24
Estudios genéticos:	25
Análisis de líquido cefalorraquídeo y sangre:	25
Fisiopatología de la PD	26
Fundamentos neuropatológicos de la PD	27
Teoría de la disfunción mitocondrial	29

Teoría oxidativa	30
Teoría neuroinflamatoria	30
Teoría del modelo priónico-like	31
Teoría microbiológica	32
Inflamosoma NLRP3: generalidades.....	34
Estructura molecular del Inflamosoma NLRP3	35
Mecanismos de señalización del inflamosoma NLRP3	37
Métodos de inhibición del inflamosoma NLRP3	38
Proceso de Oligomerización del NLRP3	39
Implicaciones del inflamosoma NLRP3 en la PD	40
Fisiología del eje microbioma-intestino- cerebro	42
Modelos experimentales.....	48
Disbiosis y PD	49
Interacciones fisiológicas entre el eje microbioma-intestino-cerebro	51
Implicación de la microbiota en la fisiopatología de la PD (Ilustración 12).....	52
Activación del inflamosoma NLRP3 mediada por la microbiota intestinal.....	60
Panorama futuro de la terapéutica de la PD.....	65
Hipótesis.....	66
Objetivos	66
Objetivo general:.....	66
Objetivos específicos:	66
Materiales y Métodos o Metodología	67
Diseño.	67
III.1.1. Definición del universo.	67
III.1.2. Tamaño de las muestras.	67
III.1.3. Definición de las unidades de observación.	67
III.1.4. Definición del grupo control.	68
III.1.5. Criterios de inclusión.	68
III.1.6. Criterios de exclusión.....	68
III.1.7. Criterios de eliminación.....	69
III.1.8. Definición de variables y unidades de medida.	69
III.1.9. Selección de las fuentes, métodos, técnicas y recolección de la información.....	73

III.1.9.1. Selección de las fuentes	73
III.1.9.2. Métodos y técnicas.....	74
Etapa I. Desarrollo de cultivos celulares.....	74
Etapa II. Formación de medio rico en metabolitos bacterianos.	75
Etapa III. Identificación de viabilidad celular en cultivo de células de neuroblastoma estirpe SK-N-SH inmortalizado inducidas a protocolo de excitotoxicidad mediado por citocinas mediante técnicas colorimétricas.	77
Etapa IV. Diseño de modelos de acoplamiento molecular (modelos <i>in silico</i>) e integración de vías de señalización relacionadas a la regulación de la actividad del Inflamosoma NLRP3.	77
Etapa V. Análisis estadístico	78
III.1.10. Prueba piloto.	78
III.1.11. Definición del plan de procesamiento y definición de la información.....	78
III.1.12. Consideraciones éticas.....	79
Resultados y discusión.....	82
Etapa I. Desarrollo de cultivos celulares.....	83
Etapa II. Formación de medio rico en metabolitos bacterianos y análisis de viabilidad celular por ensayo colorimétrico.....	86
Etapa III. Ensayo de acoplamiento molecular <i>in silico</i> y descripción de vías de señalización vinculadas a la Enfermedad de Parkinson.	100
Conclusiones	111
Referencias bibliográficas	114

Índice de cuadros

Tabla 1. Diversidad de moléculas neuroactivas y neurotransmisores aislados a partir de varias especies microbianas.....	46
---	----

Índice de Imágenes.

Ilustración 1. Epidemiología de la PD.	19
Ilustración 2. Ejemplificación gráfica del proceso fisiopatológico clave de la enfermedad y su relación con factores de riesgo y protección para el desarrollo de la enfermedad.	20
Ilustración 3. Mecanismos de degradación de la α -syn y su relación con el modelo fisiopatológico estándar de la PD.....	29
Ilustración 4. Teorías fisiopatológicas intracelulares implicadas en el desarrollo de la PD.	33
Ilustración 5. Teorías fisiopatológicas extracelulares implicadas en el desarrollo de la PD.	34
Ilustración 6. Estructura molecular del Inflamosoma NLRP3.....	39
Ilustración 7. Relación entre la microbiota y el desarrollo de la Enfermedad de Parkinson. Creada con Biorender.com, Autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creada a partir de (Berthouzoz et al., 2023).....	45
Ilustración 8. Papel de la microbiota en la regulación del eje microbiota-intestino-cerebro.	46
Ilustración 9. Cambios microbiológicos ocurridos en la disbiosis relacionada a la PD y sus efectos sobre la fisiopatología de la enfermedad..	55
Ilustración 10. Procesos fisiopatológicos relacionados a la disbiosis y su relación con el desarrollo de la Enfermedad de Parkinson.....	57
Ilustración 11. Cambios en el microbioma intestinal y su interrelación con la presencia de manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Parkinson.....	58
Ilustración 12. Composición microbiológica de la microbiota en sujetos con Enfermedad de Parkinson.....	59
Ilustración 13.....	60
Ilustración 14. Representación esquemática de estudio tipo MWAS realizado por Wallen-ZD y cols. (2022) para determinar las relaciones metagenómicas existentes en pacientes con PD..	61
Ilustración 15. Interrelación del microbioma y las rutas fisiopatológicas implicadas en el desarrollo de la PD.....	62
Ilustración 16. Mecanismos y vías de señalización de los receptores tipo TOLL 2 y 4, y sus implicaciones en los fenómenos de neuroinflamación y activación microglial.....	63
Ilustración 17. Vía metabólica del TMAO y sus implicaciones en el desarrollo de la PD y otras enfermedades neurodegenerativas.....	64
Ilustración 18. Terapias microbiológicas y sus mecanismos terapéuticos en la PD.	65
Ilustración 19. Caracterización morfológica de cultivos celulares mediante microscopia de contraste de fases.....	84
Ilustración 20. Gráfico de dispersión que muestra la distribución del área celular y su relación con la morfología de la estirpe de neuroblastoma humano SK-N-SH.	85
Ilustración 21. Efecto de Caspasa-1 y cotratamientos con AGCC sobre la viabilidad celular de RAW 264.7	88

Ilustración 22. Efecto de Caspasa-1 y cotratamientos con AGCC sobre la viabilidad celular de SK-N-SH.	89
Ilustración 23. Efecto aislado de los Ácidos Grasos de cadena Corta sobre la viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7.	90
Ilustración 24. Evaluación de la viabilidad celular en cultivo de Neuroblastoma SK-N-SH tratados con ácidos grasos de cadena corta (AGCC).	91
Ilustración 25. Efecto de LPS de <i>P. mirabilis</i> y AGCC en RAW 264.7.	92
Ilustración 26. Efecto de LPS de <i>Akkermansia muciniphila</i> y cotratamientos con AGCC sobre la viabilidad celular de RAW 264.7.	93
Ilustración 27. Efecto de LPS de <i>A. muciniphila</i> y AGCC en RAW 264.7.	94
Ilustración 28. Efecto de LPS de <i>A. muciniphila</i> y AGCC sobre la viabilidad de SK-N-SH.	95
Ilustración 29. Efecto de cadaverina y AGCC sobre la viabilidad de SK-N-SH.	96
Ilustración 30. Efecto de TMAO y AGCC sobre la viabilidad de RAW 264.7.....	97
Ilustración 31. Efecto de cadaverina y AGCC sobre la viabilidad de RAW 264.7.....	98
Ilustración 32. Efecto de TMAO y AGCC sobre la viabilidad de SK-N-SH.....	99
Ilustración 33. Acoplamiento Molecular de Cadaverina con GPCR6A y su implicación en la activación del Inflamosoma NLRP3.	103
Ilustración 34. Esquematización de vías de señalización reguladas por Cadaverina.....	103
Ilustración 35. Acoplamiento Molecular de TMAO con SIRT3 y su implicación en la activación del Inflamosoma NLRP3.	104
Ilustración 36. Esquematización de vías de señalización reguladas por TMAO. A la izquierda se observa el complejo enzimático de diferentes especies bacterianas asociadas a la síntesis de TMAO y disbiosis en sujetos con PD. A la derecha se observan las diferentes vías moleculares activadas por la TMAO implicadas en la regulación del inflamosoma NLRP3 y su implicación en la PD.....	104
Ilustración 37. Análisis de acoplamiento molecular de metabolitos bacterianos sobre ABCB1/MDR1 y vía propuesta de translocación neurotóxica asociada a activación de NLRP3.	107
Ilustración 38. Análisis de acoplamiento molecular de metabolitos bacterianos sobre ABCG2 y vía propuesta de activación del inflamasoma NLRP3.	110

Abreviaturas y siglas

EP: Enfermedad de Parkinson.

PD: Parkinson Disease.

AD: Alzheimer Disease.

SNpc: Sustancia Nigra Pars Compacta.

NLRP3: NOD Like Receptor Protein 3.

MTS: Metiltetrazolio.

P. mirabilis: *Proteus mirabilis*.

A. muciniphila: *Akkermansia muciniphila*.

TMAO: Óxido de trimetilamina.

α -syn: α -sinucleína.

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta.

D1R: Receptor dopaminérgico tipo 1.

D2R: Receptor dopaminérgico tipo 2.

A2R: Receptor de adenosina tipo 2..

SIRT3: Sirtuina 3.

PARK: Parkina.

PERK: Proteína cinasa de membrana del retículo endoplásmico.

PINK1: Cinasa 1 inducida por PTEN.

GABA: Ácido gab-aminobútirico.

SNC: Sistema nervioso central.

SNE: Sistema nervioso entérico.

SNP: Sistema nervioso periférico.

Resumen

Introducción. La enfermedad de Parkinson comprende la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente a nivel mundial, caracterizada por neurodegeneración a nivel de las células neuronales dopaminérgicas a nivel de la *Pars Compacta* de la *sustancia nigra* a nivel mesencefálico inducido por un incremento en la agregación de una proteína reguladora de tránsito sináptico, mitocondrial y citosólico denominada α -sinucleína. Se reconoce la participación de complejos moleculares del sistema inmune en el proceso de neurodegeneración, de los cuales se destaca el Inflamosoma NLRP3, implicado en la síntesis y maduración de interleucinas proinflamatorias por medio de reconocimiento de patrones moleculares. La microbiota intestinal juega un papel en la regulación de dicho complejo inflamatorio a partir de diferentes metabolitos bacterianos, favoreciendo la progresión de la enfermedad. **Objetivo:** Se evaluó el efecto de metabolitos derivados de la microbiota intestinal y su efecto sobre la respuesta del inflamosoma NLRP3 en un modelo de neurodegeneración celular. **Materiales y métodos.** Se llevó a cabo la reconstitución y cultivo celular de células de estirpe monocito-macrofágicas RAW 264.7 y de neuroblastoma inmortalizado estirpe SK-N-SH para evaluar el efecto de la administración de diferentes metabolitos bacterianos (ácidos grasos de cadena corta, cadaverina, óxido de trimetilamina y lipopolisacárido de *P. mirabilis* y *A. muciniphila*) con el fin de evaluar su efecto en la vía de activación del inflamosoma NLRP3 y evaluar el grado de degeneración celular en células de neuroblastoma por métodos de viabilidad celular colorimétricas a partir del uso de MTS. **Resultados.** Se observó un incremento en la actividad de la vía canónica y alternativa del Inflamosoma NLRP3 posterior a la administración de diferentes metabolitos bacterianos derivados de la microbiota intestinal y un decremento en la viabilidad celular por medio de técnicas colorimétricas con MTS tetrazolio dosis dependiente a la concentración asignada de 0.5, 5, 50 y 250 μ g para cada uno de los metabolitos estudiados, así mismo se observó un efecto citoprotector en los ensayos con tratamiento adyuvante con ácidos grasos de cadena corta butirato y acetato a dosis medias y altas.

Abstract

Introduction. Parkinson's disease is the second most prevalent neurodegenerative disease worldwide, characterized by neurodegeneration at the level of dopaminergic neuronal cells at the level of the *Pars Compacta* of the *substantia nigra* at the mesencephalic level induced by an increase in the aggregation of a synaptic, mitochondrial and cytosolic transit regulatory protein called α -synuclein. The participation of molecular complexes of the immune system in the process of neurodegeneration is recognized, of which the NLRP3 Inflammasome, involved in the synthesis and maturation of proinflammatory interleukins through molecular pattern recognition, stands out. The intestinal microbiota plays a role in the regulation of this inflammatory complex from different bacterial metabolites, favoring the progression of the disease. **Objective:** The effect of metabolites derived from the gut microbiota and their effect on the NLRP3 inflammasomal response in a model of cellular neurodegeneration was evaluated. **Materials and methods.** Cell reconstitution and cell culture of cells of monocyte-macrophage lineage RAW 264.7 and immortalized neuroblastoma lineage SK-N-SH were carried out to evaluate the effect of the administration of different bacterial metabolites (short-chain fatty acids, cadaverine, trimethylamine oxide and lipopolysaccharide of *P. mirabilis* and *A. muciniphila*) in order to evaluate its effect on the NLRP3 inflammasome activation pathway and to evaluate the degree of cell degeneration in neuroblastoma cells by colorimetric cell viability methods from the use of MTS. **Results.** An increase in the activity of the canonical and alternative pathway of the NLRP3 Inflammasome, after the administration of different bacterial metabolites derived from the intestinal microbiota, and a decrease in cell viability was observed by means of colorimetric techniques with MTS tetrazolium, dose-dependent dose at the assigned concentration of 0.5, 5, 50 and 250 μ g for each of the metabolites studied. A cytoprotective effect was also observed in trials with adjuvant treatment with short-chain fatty acids, butyrate and acetate at medium and high doses.

Introducción

La enfermedad de Parkinson (PD por sus siglas al inglés) comprende la segunda causa de enfermedad neurodegenerativa más prevalente a nivel mundial, solo por debajo de la Enfermedad de Alzheimer (AD, por sus siglas al inglés), y que, en algunos casos, dependiendo de la progresión de la enfermedad, puede extrapolarse un fenotipo combinado denominado PD-Demencia afectando alrededor de diez millones de personas anualmente, siendo el 10% de origen idiopático y de presentación temprana, mientras que el otro 90% corresponde a un origen secundario (Berthouzoz et al., 2023; Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020; Poewe et al., 2017).

Planteamiento del problema

Actualmente la Enfermedad de Parkinson comprende la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente a nivel mundial, solo por debajo de la Enfermedad de Alzheimer; se reconoce que el eje fisiopatológico de la enfermedad se centra en procesos inmunológicos, en los cuales la microbiota intestinal regula fenómenos que se presentan décadas previas al desarrollo de los cambios a nivel cerebral y la aparición de los síntomas motores de la enfermedad. ¿Los cambios en los metabolitos generados por la microbiota juegan un papel central en el desarrollo de los procesos neuroinflamatorios regulados por el inflamósoma NLRP3 implicados en el pródromo de la enfermedad y su instauración temprana?

Justificación

La enfermedad de Parkinson ha presentado un avance significativo en el entendimiento de su fisiopatología durante la última década, demostrándose un rol importante regulado por la microbiota, ya que, a partir de sus diferentes procesos metabólicos basales, juega una implicación directa en el desarrollo de agregados de α -syn a nivel neuro enteral y con relación a los mecanismos disruptores de integridad de membrana previamente señalados, se ha observado la capacidad de trans migración de estos agregados hacia la SNpc. Así mismo, dado que la microbiota juega un papel regulador en la inmunotolerancia, se ha asociado su papel en la activación de mecanismos autoinmunes involucrados en los procesos

de neuroinflamación y neurodegeneración celular. Por tal motivo, es importante dirigir la investigación de área básica hacia esta área con el fin de orientar el desarrollo de fármacos, sustancias bioactivas, psicobióticos específicos y técnicas de terapia microbiológicas que tengan la capacidad de regular y restaurar la función de la microbiota, favoreciendo así el cese del proceso de autoinmunidad, permitan prolongar el tiempo de ausencia de la sintomatología motora y a su vez, favorecer el control y regresión de los síntomas no motores de la enfermedad. (Aho et al., 2021; Varesi et al., 2022; Zhang et al., 2023)

Antecedentes

Panorama general de la Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (PD por sus siglas al inglés) comprende la segunda causa de enfermedad neurodegenerativa más prevalente a nivel mundial, solo por debajo de la Enfermedad de Alzheimer (AD, por sus siglas al inglés), y que, en algunos casos, dependiendo de la progresión de la enfermedad, puede extrapolarse un fenotipo combinado denominado PD-Demencia afectando alrededor de diez millones de personas anualmente, siendo el 10% de origen idiopático y de presentación temprana, mientras que el otro 90% corresponde a un origen secundario (Ilustración 1) (Berthouzoz et al., 2023; Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020; Poewe et al., 2017).

Los síntomas de esta enfermedad comienzan gradualmente a partir de manifestaciones muy leves hasta muy intensas, presentándose entre ellas tremor, bradicinesia y alteraciones posturales, alteraciones de la marcha y a su vez, se acompaña de deterioro en las funciones cognitivas y del comportamiento. (Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020; Rutsch et al., 2020).

La incidencia de la enfermedad a nivel mundial se ha reportado de 5 a 35 casos de la enfermedad por cada 100.000 habitantes anualmente. La presentación de la enfermedad es rara antes de los 50 años, sin embargo, a partir de la sexta a novena década de la vida, se ha observado un incremento en su incidencia de 5 a 10 veces la basal. (Poewe et al., 2017)

Respecto a la prevalencia global de la enfermedad, se estima que el 0.3% de la población cursa con PD, sin embargo, en poblaciones mayores de 80 años, esta prevalencia aumenta a más del 3% global. (Poewe et al., 2017)

En cuanto a la mortalidad, esta no se ha observado modificada en la primera década del curso de la enfermedad, sin embargo, posterior a esta, se ha observado un incremento doble de mortalidad en estos pacientes en relación con la población general. (Poewe et al., 2017)

Se ha estimado que un incremento en la tasa de presentación de la enfermedad se duplique en un periodo de tiempo comprendido desde 2005 hasta el 2030. Así mismo, se ha observado que el ajuste de días perdidos asociados a discapacidad en estos pacientes presentó un incremento doble entre 1990 y el 2010. (Poewe et al., 2017)

Respecto a diferencias epidemiológicas de la enfermedad, esta, tiene una mayor tasa de presentación en hombres respecto a mujeres, y a su vez, se ha encontrado una correlación directa entre los efectos protectores estrogénicos en la mujer y el desarrollo tardío de la PD. (Poewe et al., 2017)

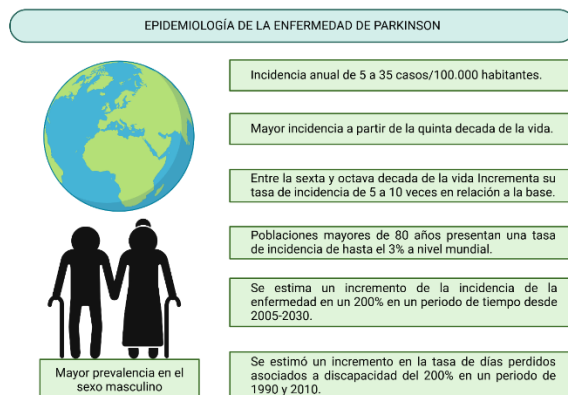


Ilustración 1. Epidemiología de la PD. En la actualidad se reconoce a la PD como la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente a nivel mundial, describiéndose una prevalencia de hasta el 3% en geriátricos mayores de 80 años. Se reconoce que dicha enfermedad es significativamente más prevalente en población masculina, donde se ha visto un efecto protector por parte del componente estrogénico en la población femenina. Se ha estimado que para el año 2030, la tasa de presentación de la enfermedad se duplicará en relación con la tasa publicada en 2005. De la misma manera, se ha observado un incremento directamente proporcional en la tasa de días perdidos asociados a discapacidad en sujetos que cursan con la PD. Ilustración creada con Biorender.com, Autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creado a partir de (Poewe et al., 2017).

Dentro del espectro de la PD se ha identificado que el principio fisiopatológico clave de la enfermedad se centra en la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas localizadas a nivel de la *Pars Compacta* de la *Sustancia Nigra* (SNpc por sus siglas al inglés) a nivel mesencefálico, así como de las neuronas productoras de ácido γ -aminobutírico a nivel de los ganglios basales a través de procesos neurodegenerativos diversos los cuales favorecen el desarrollo de alteraciones relacionadas al control y coordinación de los movimientos. (Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020; Rutsch et al., 2020). Dentro del desarrollo de la enfermedad, se han reconocido algunos factores predisponentes, factores de riesgo y factores protectores para el desarrollo de la enfermedad, de los cuales pueden ser clasificables como modificables y no modificables (Ilustración 2). (Berthouzoz et al., 2023; Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020)

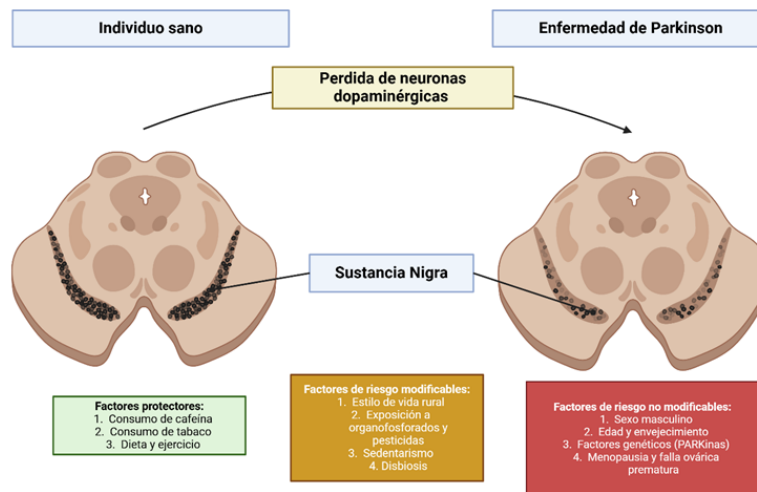


Ilustración 2. Ejemplificación gráfica del proceso fisiopatológico clave de la enfermedad y su relación con factores de riesgo y protección para el desarrollo de la enfermedad. El envejecimiento aumenta la permeabilidad de las barreras biológicas, permitiendo que neurotoxinas y proinflamatorios ingresen al sistema nervioso. Paralelamente, factores como metales pesados, pesticidas y metabolitos intestinales causan disfunción mitocondrial y estrés oxidativo. Estos eventos promueven un estado severo y crónico de neuroinflamación y excitotoxicidad impulsada por las células gliales. Como resultado final, este microambiente destructivo desencadena la degeneración irreversible de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra. Creado con Biorender.com, autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creado a partir de (Berthouzoz et al., 2023; Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020).

Vida rural

El antecedente de vida rural cobra relevancia en el desarrollo de la PD ya que se asocia al consumo de metales pesados en agua no tratada, así como exposición a pesticidas como Paraquat, cuyo papel fisiopatológico se encuentra implicado en el bloqueo del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y con ello, inducción de estrés oxidativo por formación de radicales libres. El desarrollo de un estado de estrés oxidativo y una disminución en la función del glutatión peroxidasa por alteración en la utilización de oxígeno produce una disfunción celular del sistema inmunológico. (Berthouzoz et al., 2023; Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020)

Envejecimiento y cambios fisiológicos asociados

En relación al envejecimiento, se ha determinado como factor de riesgo no modificable ya que se encuentra implicado en el aumento de la permeabilidad de la barrera hematointestinal y hematoencefálica que permite el paso de moléculas estimulantes del sistema nervioso central y la migración de moléculas proinflamatorias a través de estos sistemas de barrera que favorecen la excitotoxicidad a nivel neuronal e inducen un aumento en la actividad de la respuesta inflamatoria crónica no regulada, favoreciendo así la neurotoxicidad y lesión tisular de las células neuronales. (Berthouzoz et al., 2023; Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020)

Dentro de los mismos procesos de envejecimiento, se ha encontrado una relación directa entre el desarrollo de la PD y la disminución en la exposición de estrógenos ováricos y a su vez, existe una correlación directa entre pacientes que cursan con falla ovárica prematura debido a este mismo principio, ya que se ha descrito en la literatura que la presencia de estradiol a nivel sérico favorece la recaptura y biosíntesis de dopamina, lo que favorece que en el sexo femenino la presencia de manifestaciones motoras se presenten de manera tardía en relación con el sexo masculino. (Berthouzoz et al., 2023; Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020)

Factores de susceptibilidad para el desarrollo de la PD

Se han descrito otros factores asociados al desarrollo de la enfermedad, que se describen como factores de susceptibilidad, entre los que se destacan la edad avanzada, ser sujeto del sexo masculino, presentar mutaciones genéticas a nivel de las parkinas (PARK por sus siglas en inglés), contar con antecedentes heredofamiliares de PD, esto relacionado primordialmente a una reducción en la concentración o presencia de defectos estructurales en los receptores D1:D2 principalmente en el sexo masculino. (Berthouzoz et al., 2023; Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020)

Factores protectores para el desarrollo de la PD

Dentro de la literatura se han descrito factores protectores relevantes para la presentación de la PD, entre los que destacan el realizar actividad física, las concentraciones de uratos séricos, el consumo de cafeína, tabaco y alcohol. (Berthouzoz et al., 2023; Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020)

Actividad física

La literatura reporta que existe una correlación directa entre el desarrollo de actividad física y los niveles séricos de uratos, los cuales favorecen un estado antioxidante a través de la activación de la vía del Nrf2/ARE, vía que brinda protección contra la pérdida de neuronas dopaminérgicas. (Berthouzoz et al., 2023; Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020)

Consumo de cafeína

La cafeína tiene un efecto antagonista sobre los receptores de alta afinidad a adenosina A1R y A2AR, favoreciendo la disminución en los niveles de citocinas proinflamatorias e inhibiendo sus efectos proinflamatorios y proapoptóticos. Así mismo se ha observado una disminución en la actividad de la microglía con relación a su grado de reactividad celular, liberación de glutamato y liberación de citocinas proinflamatorias. (Berthouzoz et al., 2023; Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020)

Consumo de nicotina

La nicotina inhibe la formación de filamentos de alfa sinucleína y reduce la formación de radicales libre por la enzima mono amino oxidasa B, misma que se encuentra implicada en el metabolismo de la dopamina. (Berthouzoz et al., 2023; Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020)

Diagnóstico de la PD

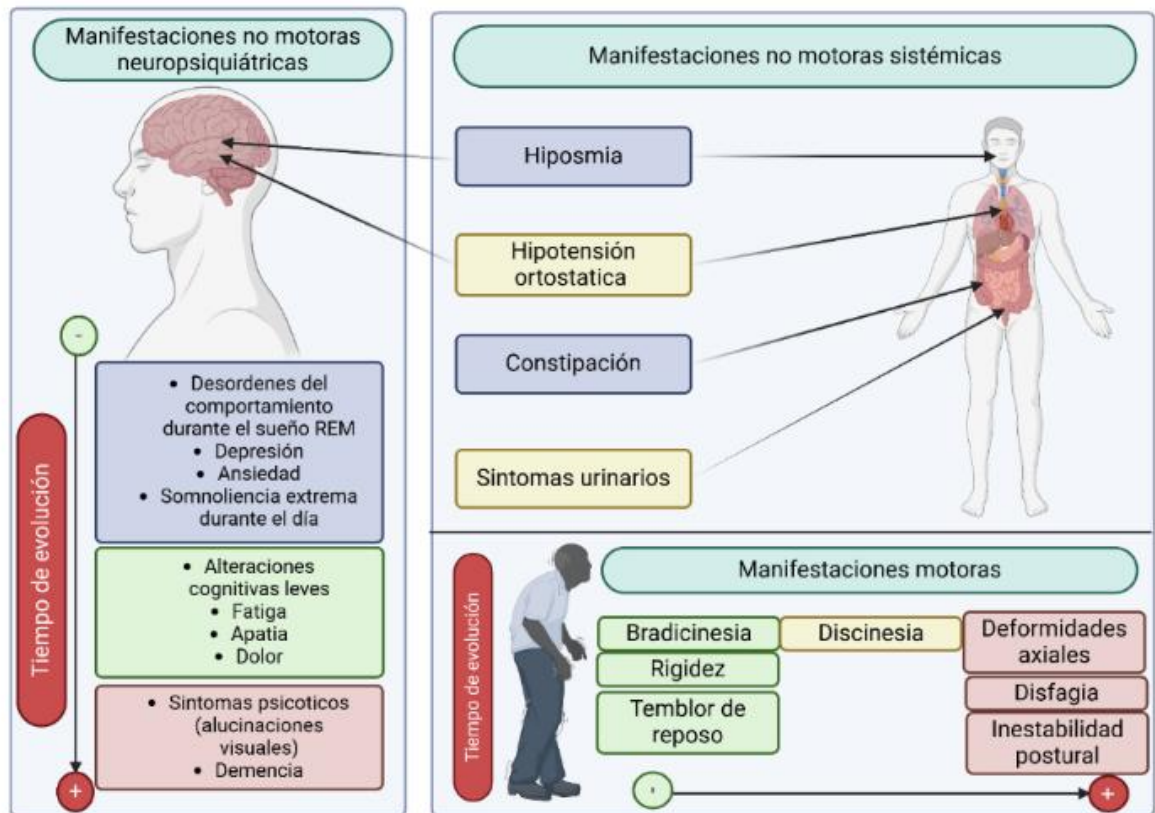
El diagnóstico se basa principalmente a la presencia de síntomas motores, respuesta positiva a pruebas terapéuticas con administración de GABA y la presencia de síntomas no motores (Ilustración 2). (Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020)

Cuadro clínico de la enfermedad

La PD es clínicamente definido por la presencia de bradicinesia y al menos unos de los componentes motores cardinales adicionales de la enfermedad, los cuales comprenden la rigidez y el temblor de reposo. La instauración de las manifestaciones motoras usualmente es de manera unilateral y asimétrica, persistiendo así en la mayoría de la enfermedad. (Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020; Poewe et al., 2017)

La PD de instauración temprana es comúnmente definido como aquella enfermedad instaurada antes de los 45 años y en los que >10% de los casos se asocia a bases genéticas individuales, por este motivo más del 40% de estos cuadros se instauran antes de los 30 años. (Poewe et al., 2017)

Los síntomas no motores involucran múltiples funciones, incluyendo desordenes del sueño, alteraciones en la regulación de los ciclos circadianos, desordenes cognitivos (disfunción ejecutiva frontal, déficits de memoria recordatoria, demencia y alucinaciones), desordenes del comportamiento y afecto, disautonomía, principalmente hipotensión ortostática, disfunción urogenital, constipación e hiperhidrosis, así como síntomas sensitivos, predominantemente la hiposmia y dolor. El papel primordial de los síntomas no motores se engloba en que pueden anteceder la instauración de los síntomas motores clásicos años o décadas antes que estos. (Poewe et al., 2017)



***Ilustración 2. Manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Parkinson.** En esta figura se muestran los diferentes síntomas motores y no motores de la enfermedad. En base a la clave de colores, los síntomas dentro de un recuadro azul cian comprenden aquellos síntomas prodrómicos de la enfermedad. Los síntomas de los estadios leves de la enfermedad se encuentran dentro de recuadros verdes, los síntomas relacionados a estadios intermedios de la enfermedad en recuadros amarillos y los síntomas relacionados a estadios avanzados se localizan dentro de recuadros de color rojo. Creado con Biorender.com, autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creado a partir de (Poewe et al., 2017)*

Estudios diagnósticos

Estudios de imagen:

La visualización de la depleción dopaminérgica estriatal en pacientes con PD usando ^{18}F L-DOPA y PET fue uno de los primeros estudios de neuroimagen molecular empleados para el diagnóstico de la enfermedad en los primeros años de la década de 1980. (Poewe et al., 2017)

La tomografía computarizada por emisión de positrones (SPECT) empleando ¹²³I-ioflupano fue aprobado como de uso rutinario en la clínica ya que permite diferenciar entre PD y enfermedades mimetizadoras de la misma que no están asociadas con disfunción de las terminales presinápticas nigroestriales. (Poewe et al., 2017)

Las imágenes de resonancia magnética nuclear ayudan a la identificación de parkinsonismo sintomático, y varias de estas técnicas de imagen pueden revelar cambios específicos a nivel de los ganglios basales y estructuras infratentoriales en parkinsonismos atípicos. Las técnicas avanzadas y el procesamiento de las imágenes, incluyendo imágenes por difusión de pesos moleculares, imágenes volumétricas, imágenes automatizadas y multimodales del volumen cortical han sido exploradas para incrementar la eficacia diagnóstica de la PD en contra de otros tipos de parkinsonismos degenerativos. (Poewe et al., 2017)

Estudios genéticos:

Las formas genéticas de la enfermedad solo comprenden un pequeño porcentaje de los casos totales de la enfermedad en la práctica clínica, por lo que los estudios genéticos no son parte rutinaria en los procesos diagnósticos de la enfermedad, a excepción de pacientes en los que existan factores de riesgo relacionados como historia familiar sugerente, instauración temprana de la enfermedad o manifestaciones clínicas específicas de la enfermedad como distonía como principal síntoma de esta. La implicación de los estudios genéticos en la práctica clínica rutinaria está limitada por la baja penetrancia y expresión variable, por lo que las variaciones genéticas como hallazgo de estos estudios no tienen un impacto sobre las decisiones en las prácticas terapéuticas de la enfermedad. (Poewe et al., 2017)

Análisis de líquido cefalorraquídeo y sangre:

Diferentes estudios han relacionado diferentes concentraciones de proteínas en LCR, principalmente α -syn en pacientes con PD con relación a controles sanos, sin embargo, se ha demostrado que la sensibilidad y especificidad de estas son subóptimas y no tienen evidencia de beneficio diagnóstico en la PD. Al contrario, se ha demostrado que los biomarcadores moleculares son altamente específicos y sensibles para este propósito. (Poewe et al., 2017)

Fisiopatología de la PD

Hasta el día de hoy se reconoce la implicación de factores genéticos y ambientales implicados en el desarrollo de la PD, dentro de los más importantes, destaca el desarrollo, agregación y depósito intracelular de la α -sinucleína (α -syn por sus siglas en inglés). Esta comprende una proteína presináptica de 140 aminoácidos, cuyo mecanismo de acción no es del todo comprendido, pero se ha relacionado directamente a funciones ocurridas en el citosol, mitocondria y núcleo celular, probablemente relacionadas a funciones de tráfico vesicular dentro de la dinámica sináptica, función mitocondrial, tráfico intracelular y posible potencial de actividad como chaperona. Dentro de la fisiopatología de la PD, se ha definido que esta molécula se encuentra involucrada en la disrupción de las funciones sinápticas y muerte neuronal, la cual a partir de un mal plegamiento y su polimerización hacia protofilamentos ejercen efectos neurotóxicos secundario a su depósito en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra a manera de inclusiones intracitoplasmáticas denominadas cuerpos de Lewy, induciendo así una respuesta inflamatoria caracterizada por gliosis reactiva. La homeostasis intracelular de la α -syn es mediada por medio de la funcionalidad del sistema ubiquitina-proteasoma y el sistema de autofagia lisosomal (LAS por sus siglas en inglés), los cuales han mostrado una relación directa entre la velocidad de degradación de la α -syn y el desarrollo de los ensamblados oligoméricos (Ilustración 3). (Poewe et al., 2017; Rutsch et al., 2020; Shi et al., 2023)

Existen otras teorías fisiopatológicas involucradas en el desarrollo de la PD, las cuales se centran en el estudio de la mitocondria como centro de disrupción inflamatoria, teorías

centradas en procesos oxidativos a nivel neuro dopaminérgico, patrones neuroinflamatorios, modelos de migración similar a enfermedad priónica y dentro de las más recientes teorizaciones, se ha recalcado la importancia de la microbiota en la regulación y desarrollo de la enfermedad (Ilustraciones 4 y 5). (Choi et al., 2018; Costa et al., 2023; Hirayama & Ohno, 2021; Jia et al., 2023; Pajares et al., 2020; Pan-Montojo et al., 2012; Pascale et al., 2020; Poewe et al., 2017; Rutsch et al., 2020; Salim et al., 2023; Shandilya et al., 2022; Wallen et al., 2022; Zhu et al., 2022)

Hoy en día se sabe que la PD no solo afecta al CNS, sino que también ocurren cambios patológicos a nivel del ENS, reconociéndose que estos ocurren mucho antes de que se presenten las modificaciones a nivel del CNS. Se ha descrito en modelos murinos la presencia de daño neuronal y glial a nivel del ENS, así mismo, se ha observado degeneración atrófica de las neuronas en el plexo mientérico y submucoso, con evidencia de depósitos de a-syn en pacientes que cursan con PD en etapas tempranas. Se ha descrito en diferentes modelos experimentales que inclusive, el ENS muestra mucho mayor sensibilidad a la A30P a-syn que el propio CNS (Zhang et al., 2023).

Fundamentos neuropatológicos de la PD

Dentro de las características de la enfermedad observados por histopatología, se ha descrito que la PD se centra en dos cambios principales a nivel cerebral, la pérdida neuronal en áreas específicas de la SN y la formación y acumulación de inclusiones intracitoplasmáticas de a-syn contribuyendo así a la formación de Cuerpos de Lewy. (Poewe et al., 2017)

El estudio macroscópico del tejido encefálico en biopsias de pacientes con PD no ha mostrado una relación entre la enfermedad y la presencia de atrofia, debido a que la degeneración neuronal ocurre exclusivamente en ciertos grupos celulares en regiones cerebrales específicas. En estadios tempranos de la enfermedad se ha observado que la pérdida de neuronas dopaminérgicas se restringe únicamente a la sustancia ventrolateral de la SN con afectación relativa de otros grupos dopaminérgicos a nivel mesencefálico. (Poewe et al., 2017)

En relación con los depósitos de α -syn, se ha descrito que tienden a llevar a cabo la formación de inclusiones intracitoplasmáticas en determinados grupos neuronales específicos. Los Cuerpos de Lewy comprenden grandes agregaciones de α -syn. En este concepto, la patología de Lewy ocurre inicialmente a nivel de las neuronas colinérgicas y monoaminérgicas y en neuronas constituyentes del sistema olfatorio, sin embargo, con relación a la progresión de la enfermedad, se ha observado formación de Cuerpos de Lewy en la región límbica y neocortical en pacientes con PD. (Poewe et al., 2017)

La función neuronal normal de la proteína de 140 aminoácidos, α -syn, no es del todo comprendido, pero se ha relacionado a funciones que ocurren en el citosol, mitocondria y núcleo celular, probablemente relacionada a funciones de tráfico vesicular dentro de la dinámica sináptica, función mitocondrial, tráfico intracelular y posible potencial de actividad como chaperona. La α -syn adquiere sus propiedades neurotóxicas durante un proceso patogenético en el cual los monómeros solubles inicialmente llevan a cabo la formación de oligómeros, que progresivamente se combinan en pequeños protofilamentos y eventualmente en grandes complejos fibrilares insolubles que favorecen el desarrollo de la patología de Lewy. (Poewe et al., 2017)

La homeostasis intracelular de la α -syn es mediada por medio de la funcionalidad del sistema ubiquitina-proteasoma y el sistema de autofagia lisosomal (LAS por sus siglas en inglés). La relevancia de estos dos sistemas de degradación proteolítica es debatida y se ha observado una mayor asociación en relación con la degradación de la α -syn mediada por el LAS para llevar a cabo la degradación de los ensamblados oligoméricos. Adicionalmente, se ha observado la presencia de proteasas que no son partes de estos complejos de degradación y que permiten la depuración de la α -syn a nivel extracelular. Se ha observado que el desarrollo de la PD y su asociación con el envejecimiento tienen un papel preponderante en la disfuncionalidad de estos sistemas proteolíticos, donde se ha observado que los niveles de enzimas lisosomales se encuentran reducidas a nivel de la SN, particularmente en aquellas neuronas que contienen inclusiones de α -syn. Así mismo se han observado que los marcadores de autofagia y chaperonas se encuentran disminuidas a nivel intracelular y en correlación directa se ha observado una acumulación de los autofagosomas.

Se ha descrito que los oligómeros de α -syn inhiben el sistema de ubiquitina-proteasoma, así mismo, la acumulación de α -syn puede inhibir la macroautofagia y diferentes isoformas de la α -syn, pueden reducir la función del sistema de autofagia mediado por chaperonas. (Poewe et al., 2017)

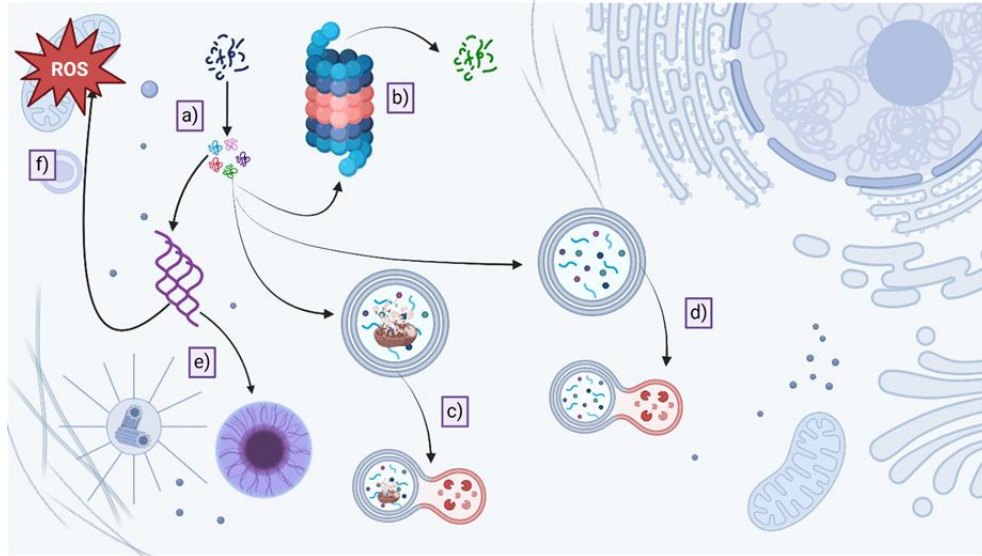


Ilustración 3. Mecanismos de degradación de la α -syn y su relación con el modelo fisiopatológico estándar de la PD. El plegamiento de la α -syn está regulado por mecanismos de degradación proteolítica, siendo el sistema ubiquitina-proteasoma uno de los iniciales. Esta proteína también induce procesos de macroautofagia que llevan a la lisis mitocondrial mediante la fusión de fagosomas y lisosomas. Para controlar su toxicidad, el sistema de autofagia lisosomal (LAS) actúa como la vía principal para la lisis y depuración de sus oligómeros. Cuando la degradación falla, los protofilamentos de α -syn se agrupan y forman depósitos intracelulares patológicos conocidos como Cuerpos de Lewy. Finalmente, la acumulación de estos agregados induce estrés oxidativo y detona procesos inflamatorios a través de la activación mitocondrial. Creado con Biorender.com, Autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creado a partir de (Poewe et al., 2017)

Teoría de la disfunción mitocondrial

La actividad del complejo I mitocondrial, el cual comprende parte de la cadena de transporte de electrones se encuentra reducida en diversos tejidos aislados a partir de pacientes con PD. PPAR γ y su coactivador 1 α (PGC1 α por sus siglas en ingles), el cual comprende un regulador maestro transcripciones, son sitios genéticos clave que se expresan a la baja en pacientes con PD. Se ha observado que la acumulación de la α -syn dentro de la mitocondria permite el déficit funcional del complejo I mitocondrial y el estrés oxidativo. La activación del PGC1 α da como resultado la reducción en la tasa de oligomerización de la α -syn y menor toxicidad en modelos in vitro, mientras que el déficit de este mismo codificador

maestro incrementa la vulnerabilidad a la oligomerización de dicha proteína. De manera directa se ha observado que la exposición a dichos oligómeros reduce los niveles celulares de PGC1 α . (Poewe et al., 2017)

Teoría oxidativa

Se ha demostrado que las neuronas dopaminérgicas nigrales son particularmente vulnerables a los cambios metabólicos y oxidativos por diferentes razones. La primera se relaciona directamente con la longitud de axones amielínicos, con un alto número de sinapsis (estimadas en 1-2.4 millones de sinapsis por neurona dopaminérgica nigral), lo cual les confiere un estado metabólicamente activo. En segundo lugar, se ha observado que tienen una vía autocrina de señalización mediada por calcio intracelular y la extrusión de este a expensas de energía. En tercero, se ha observado que incrementos en la dopamina y sus metabolitos pueden causar estrés oxidativo tóxico, que, en asociación con el estrés mitocondrial y la depleción lisosomal y disfunción del sistema LAS, comprenden vías patológicas en la PD que se encuentran íntimamente ligadas. (Poewe et al., 2017)

Teoría neuroinflamatoria

La neuroinflamación es probablemente un contribuidor esencial en la patogenia de la enfermedad. Las neuronas catecolaminérgicas en el tejido cerebral de pacientes con PD y neuronas dopaminérgicas en cultivo han demostrado un incremento en el sistema de proteínas MHC clase I, favoreciendo su exposición a células T citotóxicas. (Poewe et al., 2017)

La agregación de la α -syn induce la activación del sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo en la PD, así mismo, estos fenómenos de neuroinflamación pueden favorecer el plegamiento anómalo de la α -syn, favoreciendo así el desarrollo de un círculo vicioso que favorece el desarrollo de incrementos en el grado de neuroinflamación. Las células inmunes solo contribuyen al inicio o deterioro de la PD a nivel cerebral. La microglía puede fagocitar y degradar los agregados de la α -syn, por lo que en ensayos clínicos se ha observado que el uso de terapias con anticuerpos dirigidos contra la α -syn favorecen la

activación de la microglía y potencian los fenómenos de degradación de la α -syn. (Poewe et al., 2017)

Inmunológicamente se ha demostrado la existencia de un cambio en la respuesta linfoproliferativa con disminución de la concentración de linfocitos T CD4⁺, mismas en las que se observa un aumento en la síntesis de a-syn y a su vez se ha demostrado una disfunción del linfocito T CD4⁺ por efecto deletéreo de la BMAA. En base a este contexto inmunológico, se ha establecido hoy en día que, dentro de las hipótesis etiopatogénicas, la PD podría ser una enfermedad con un componente autoinmune. Modelos murinos Pink1^{-/-} que cursan con episodios de infección gastrointestinal por bacterias Gram positivas, desarrollaban mecanismos de autoinmunidad mediadas por células T CD8⁺ citotóxicas específicamente dirigidas contra mitocondrias, se asocian a daño de las neuronas dopaminérgicas. (Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020; Pascale et al., 2020; Wallen et al., 2022)

Teoría del modelo priónico-like

Braak et. al en 2007 estableció que el desarrollo de infecciones virales y priónicas pueden generar depósitos de a-syn y migrar de manera retrograda a partir del sistema neuroentérico por medio del nervio vago y a través del sistema respiratorio por medio del bulbo olfatorio hacia la sustancia nigra y generar un efecto prion-like a partir de la migración de la a-syn hasta la pars compacta de la sustancia nigra. Esto cobra vital importancia en la investigación de la patogénesis de la enfermedad, debido a que se ha observado la presencia de cuerpos de Lewy secundarios a la polimerización de la a-syn de manera temprana en biopsias de tejido intestinal, estando presente mucho antes de que estos se desarrollen a nivel del sistema nervioso central y que bajo el modelo propuesto por estos investigadores, pueden dar origen a una explicación descentralizada del SNC en relación a la patogénesis de la PD ya que la literatura demuestra que existe una migración de la a-syn en un modelo de prion-like desde el sistema neuroentérico hacia el sistema nervioso central de forma retrograda a través del trayecto del nervio vago hasta depositarse en la pars compacta de la sustancia nigra.

(Choi et al., 2018; Costa et al., 2023; Pellegrini, C et al., 2022; Hirayama & Ohno, 2021; Pajares et al., 2020; Pan-Montojo et al., 2012; Poewe et al., 2017; Rutsch et al., 2020)

Montejo y cols en 2012 demostraron que la resección de los nervios componentes de sistema simpático y parasimpático a través de hemivagotomía y simpatectomía parcial retrasaron la aparición de los síntomas motores y detienen la progresión de la enfermedad similar a PD en modelos murinos previamente tratados con rotenona. Diferentes estudios experimentales han demostrado que el desarrollo de una vagectomía temprana tiene la capacidad de reducir la tasa de presentación de la enfermedad en aproximadamente el 50%. (Choi et al., 2018; Hirayama & Ohno, 2021; Pan-Montojo et al., 2012; Rutsch et al., 2020)

Teoría microbiológica

Se ha descrito en la literatura que el microbioma tiene un papel importante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas debido a su asociación con la liberación de neurotransmisores y neuromoduladores, describiéndose así que la teoría de la disbiosis juega un papel relevante en estos procesos fisiopatológicos debido a la proliferación de bacterias productoras de lipopolisacáridos (LPS) y beta-metilamino-L-alanina (BMAA), los cuales favorecen la excitotoxicidad, activación de la microglía, daño mitocondrial y formación y depósito de los filamentos de la α -syn. Se ha identificado que el aumento en la permeabilidad de la barrera hematointestinal se correlaciona directamente con un aumento en el paso de sustancias del lumen intestinal hacia el lumen sanguíneo, favoreciendo la migración de neurotransmisores, neuro estimuladores, citocinas proinflamatorias y LPS, permitiendo un aumento en la excitotoxicidad y otros procesos ya previamente mencionados. Esto cobra relevancia ya que se ha observado que un incremento en la permeabilidad de dicha barrera hematointestinal secundaria a una reacción inflamatoria intestinal correlaciona directamente una sinergia entre la función de la IL-1 β y la polimerización de la α -syn. La presencia de lipopolisacáridos induce la expresión de los astrocitos A1 que tienen actividad neurotóxica. Se ha demostrado que estos astrocitos están involucrados en la destrucción de las células dopaminérgicas de la sustancia nigra, así mismo se ha demostrado que la microglía por efecto de la galectina-3 generan un aumento de la barrera hematoencefálica y a su vez se ha

demostrado que estas células al estar sometidas a un proceso de inflamación crónica adquieren un fenotipo fagocítico. Se ha demostrado que el BMAA tiene un efecto sobre la barrera hematoencefálica alterando la permeabilidad de esta. (Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020)

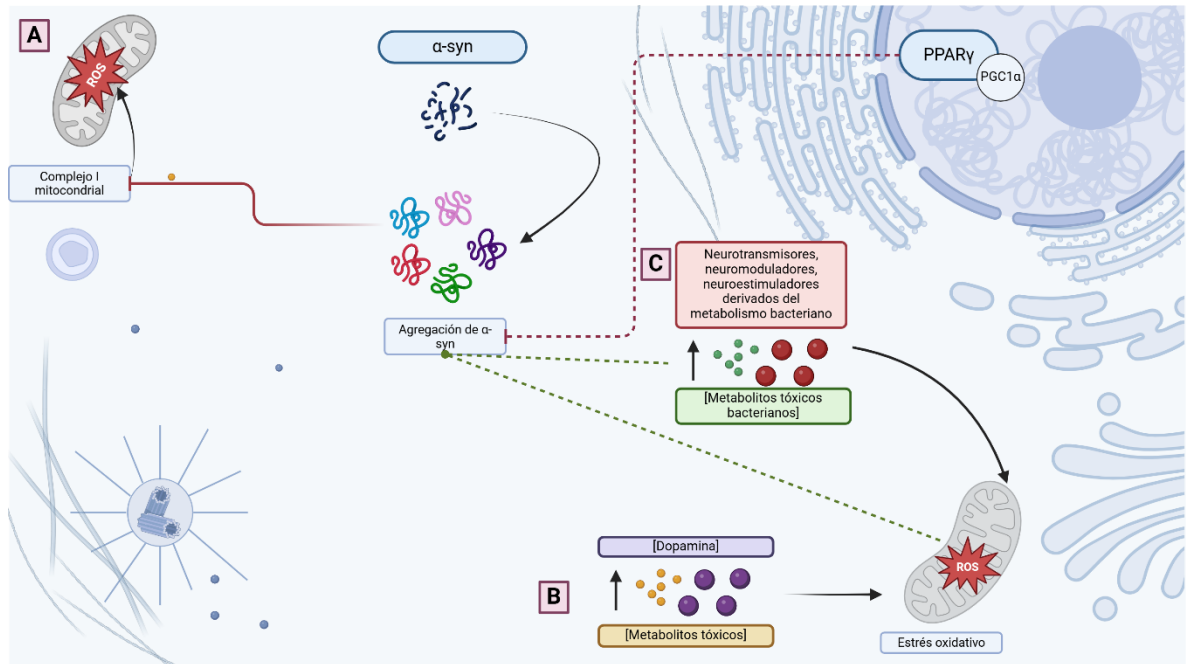


Ilustración 4. Teorías fisiopatológicas intracelulares implicadas en el desarrollo de la PD. La disfunción del complejo I mitocondrial induce **estrés oxidativo** y favorece la agregación patológica de α -sinucleína. Por su parte, las neuronas dopaminérgicas muestran una **alta vulnerabilidad** natural frente a los cambios metabólicos oxidativos. El exceso de dopamina daña la mitocondria y el sistema de degradación LAS, **potenciando la neurotoxicidad**. Simultáneamente, la disbiosis altera las barreras biológicas permitiendo el **paso de neurotoxinas bacterianas** al cerebro. Al ingresar al sistema nervioso central, estos metabolitos periféricos replican y **perpetúan el ciclo destructivo** de estrés oxidativo. Creado con Biorender.com, autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creado a partir de (Costa et al., 2023; Pajares et al., 2020; Poewe et al., 2017)

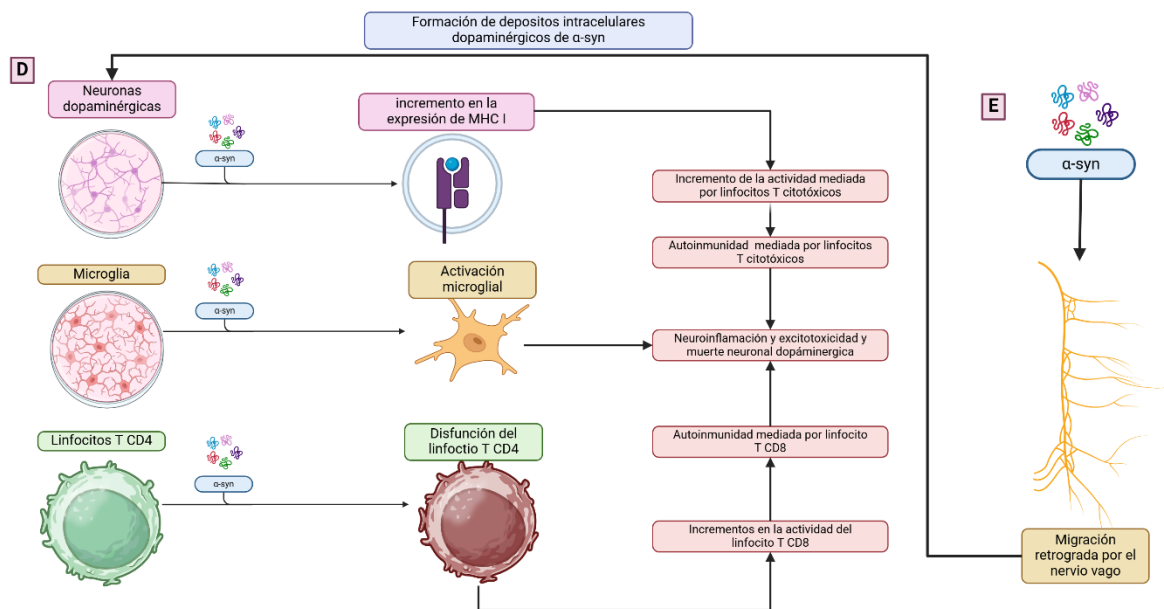


Ilustración 5. Teorías fisiopatológicas extracelulares implicadas en el desarrollo de la PD. La agregación de -sinucleína sobreexpresa el MHC I en las células dopaminérgicas, exponiéndolas a un ataque letal por parte de los linfocitos T citotóxicos. Este evento activa tanto el sistema inmune innato como adaptativo, detonando una intensa neuroinflamación crónica guiada por la microglía y autoinmunidad celular. Paralelamente, el modelo "prion-like" propone que los agregados tóxicos de -sinucleína se forman de manera inicial en el sistema neuroentérico. Desde el intestino, estas proteínas patológicas logran migrar de manera retrógrada a través del nervio vago hasta colonizar y degenerar la sustancia nigra. La validación de esta ruta ha demostrado que su interrupción anatómica puede retrasar la aparición de los síntomas motores y detener drásticamente la progresión de la enfermedad. Creado con Biorender.com, autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara, creado a partir de (Choi et al., 2018; Costa et al., 2023; Hawkes et al., 2007; Hirayama & Ohno, 2021; Pajares et al., 2020; Pan-Montojo et al., 2012; Pascale et al., 2020; Poewe et al., 2017; Rutsch et al., 2020; Wallen et al., 2022)

Se ha observado que en pacientes que cursan con PD, existe un incremento en los niveles de marcadores gliales como la proteína acidófila fibrilar glial (GFAP por sus siglas al inglés) y Sox-10, los cuales se asocian directamente con un incremento de las citocinas proinflamatorias a nivel gastrointestinal (Zhang et al., 2023).

Inflamosoma NLRP3: generalidades

El inflamosoma comprende un complejo de señalización del sistema inmune innato, que es activado en respuesta a diferentes patrones moleculares asociados a patógenos y asociados a daño (PAMPS y DAMPS respectivamente por sus siglas en inglés), las cuales comprenden moléculas de señalización al daño celular. Una vez activado el inflamosoma por la unión de estos patrones a receptores tipo NOD (NLRs por sus siglas en inglés) y receptores

tipo TOLL (TLRs por sus siglas en inglés) inducen la producción activa de citocinas proinflamatorias, siendo las de mayor interés la IL-1b y la IL-18. A través de los diferentes estudios experimentales relacionados al inflamosoma se ha reconocido que existe también una molécula adaptadora llamada proteína similar a partículas asociadas a apoptosis (ASC o Pycard por sus siglas y denominaciones en inglés), capaz de generar la activación de los procesos de piroptosis, una forma de muerte celular acelerada caracterizada por la liberación masiva de mediadores proinflamatorios. La importancia de este complejo molecular ha tomado interés dentro de la investigación científica, ya que se ha asociado su participación en la progresión de diferentes desórdenes neurológicos, entre los que destacan la esclerosis múltiple (MS por sus siglas en inglés), AD, PD, y desordenes neuropsiquiátricos (NPD por sus siglas en inglés). (Codolo et al., 2013; Poewe et al., 2017; Rutsch et al., 2020)

Se ha descrito que tanto la IL-1b como la IL-18 juegan un rol esencial dentro de las funciones fisiológicas del SNC, participando a nivel de procesos de cognición, aprendizaje y memoria, siendo especialmente abundantes a nivel del hipotálamo y el hipocampo, lo que favorece la preservación de los diferentes procesos de memoria y aprendizaje. (Rutsch et al., 2020)

Recientemente se ha identificado que un modelo de inflamosoma denominado AIM2 tiene un rol determinante en el desarrollo normal del cerebro y que es activado a partir de la presencia de daño al DNA, situación que ocurre especialmente ante situaciones de infección, trauma, pero sobre todo, ante la masiva muerte celular durante el neurodesarrollo, sin embargo, se ha descrito que su regulación no está mediada por citocinas convencionales, sino que más bien su regulación es mediada a través de gasdermina D. (Rutsch et al., 2020)

Estructura molecular del Inflamosoma NLRP3

El inflamosoma NLRP3, conocido como criopirina, comprende un sensor del sistema inmune innato, que se encarga de la maduración y liberación de citocinas proinflamatorias, entre las que se destacan a la IL-1 β e IL-18, las cuales sufren un proceso de maduración regulado por caspasa-1, en respuesta a estrés celular y daño a la membrana celular. Este inflamosoma comprende un complejo macromolecular constituido por 3 componentes

mayores, el NLRP3, el cual se encarga de inducir vías de señalización posterior a la captación de PAMPS y DAMPS; la caspasa 1, la cual permite la maduración de las citocinas proinflamatorias previamente señaladas así como el procesamiento de gasdermina D favoreciendo una regulación a la alta de procesos proinflamatorios y piroptosis y; la proteína que contiene un dominio de reclutamiento de caspasa-1 asociada a apoptosis, ASC, la cual tiene la función de actuar como puente entre la caspasa 1 y NLRP3 para llevar a cabo el funcionamiento de este complejo. Dado que este pertenece a los mecanismos de defensa del sistema inmune innato, tiene la capacidad de inducir diferentes programas transcripcionales que favorecen la expresión de citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos para favorecer la defensa dirigida al hospedador, en algunas situaciones especiales, se ha reconocido que la inmunidad innata mediada por receptores favorece la inducción de programas de muerte celular con el fin de parar la propagación de patógenos. Se ha descrito que el inflamosoma NLRP3 se encuentra expresado de manera constitutiva como un complejo supramolecular citosólico en células de linaje mieloide, células de barrera, linfocitos y neuronas. Las aberraciones genéticas que afectan al NLRP3 se han asociado directamente con enfermedades colectivamente llamadas síndromes periódicos asociados a criopirinas, que se caracterizan por ser síndromes autoinmunes dirigidos contra piel, articulaciones y sistema nervioso central. Dentro de los roles más relevantes de este inflamosoma dentro de la fisiopatología de diferentes enfermedades, se ha destacado su alta relevancia en condiciones del sistema nervioso central como la Enfermedad de Alzheimer y la Enfermedad de Parkinson (Ilustración 6) (Fu J., et.al., 2023; Banerjee S., et. al., 2022).

NLRP3 requiere de dos pasos para su activación. El primero consiste en el reconocimiento de PAMPS y DAMPS o citocinas que favorezcan diferentes procesos proinflamatorios que inducen una regulación al alza de la expresión de la vía de transcripción mediada por NF- κ B, favoreciendo la transcripción al alta del NLRP3, el cual requiere de diferentes mutaciones postranscripcionales como la ubiquitinación, fosforilación y SUMOilación para ser activada. El segundo paso requiere de un flujo eléctrico mediado por cargas iónicas a través del eflujo de potasio a través de canales dependientes de ATP al líquido extracelular. Posterior a su activación, el NLRP3 inicia un reclutamiento de diferentes

subcomplejos constitutivos del inflamosoma y lleva a cabo la activación de caspasas inflamatorias por procesos proteolíticos, que inducen su maduración molecular y favorecen una inducción de los procesos proinflamatorios y muerte celular inflamatoria conocida como piroptosis. Se ha reconocido que NEK7, una cinasa de serina/treonina que favorece la mitosis favorece la activación de NLRP3 a través de su unión directa a esta por medio de los dominios ricos en leucina (LRR por sus siglas en inglés), esta, favorece la formación del disco del inflamosoma NLRP3 y promueve que la región PYD del NLRP3 forme un filamento. Este filamento recluta al complejo ASC y favorece la formación del filamento ASC PYD, así mismo, ASC presenta un dominio CARD que genera un filamento que recluta caspasa-1 a través de dominios de unión de caspasa-1 (p20/p10) que favorece su dimerización y auto procesamiento para favorecer su activación mediante la formación del complejo p33. La caspasa-1 activada, tiene la capacidad de unirse a dominios de gasdermina D (GSDMD por sus siglas en inglés) y activarlos, favoreciendo la formación de poros de membrana que facilitan la liberación de citocinas proinflamatorias formadas y el desarrollo de la piroptosis (Fu J., et.al., 2023; Banerjee S., et. al., 2022).

Mecanismos de señalización del inflamosoma NLRP3

Se han descrito tres componentes principales de la vía de señalización del inflamosoma NLRP3, dividiéndose en un componente sensor, un adaptador y uno efector (Fu J., et.al., 2023; Banerjee S., et. al., 2022).

El sensor, comprendido por NLRP3, se encuentra constituido de tres partes, un dominio pirina amino terminal (PYD por sus siglas en inglés), un dominio carboxilo terminal rico en repeticiones de Leucina (LRR por sus siglas en inglés) y un dominio central de unión a nucleótido (NBD por sus siglas en inglés) con dominio ATPasa denominado NACHT. PYD tiene la función de regular a la baja la actividad del inflamosoma NLRP3, el dominio LRR favorece principalmente las interacciones proteína-proteína y a su vez, se encarga de mantener la estabilidad de NLRP3. El dominio NACHT posee la habilidad de unir nucleótidos e hidrolizar ATP, que una vez hidrolizados favorece la auto-oligomerización

resultando en auto-interacciones de PYD, que favorecen el reclutamiento de ASC, que tiene la función de actuar como adaptador molecular (Fu J., et.al., 2023; Banerjee S., et. al., 2022).

El adaptador, comprendido por ASC, está constituido por un dominio amino terminal el cual sirve como sitio de anclaje a al dominio PYD de NLRP3; un dominio carboxilo terminal de reclutamiento de caspasa (CARD por sus siglas en ingles) que actúa como plataforma para el reclutamiento de la caspasa-1, que tiene la función de actuar como efector (Fu J., et.al., 2023; Banerjee S., et. al., 2022).

El efector, comprendido por Caspasa-1 está constituido por un extremo amino termina que se une a CARD, una subunidad catalítica larga llamada p20 y una subunidad catalítica corta que constituye su extremo carboxilo terminal, p10. Cuando la caspasa-1 entra en contacto con los filamentos de CARD del ASC inducen la dimerización de las subunidades catalíticas p20 y p10, favoreciendo el anclaje entre ambas subunidades, formando el complejo p33 y con ello, permitiendo así que la caspasa adquiriera su actividad proteolítica completa. Una vez activada la caspasa-1, esta es capaz de cortar y activar GSDMD, la cual es responsable de inducir fenómenos de piroptosis y a su vez, inducir la maduración de pro-citocinas de la familia de las IL-1, permitiendo su maduración y permitiendo que adquieran su función reguladora a nivel de la respuesta inmune (Ilustración X) (Fu J., et.al., 2023; Banerjee S., et. al., 2022).

Métodos de inhibición del inflamosoma NLRP3

Cuando el inflamosoma NLRP3 se encuentra en su estado inactivo, el adenosín difosfato (ADP por sus siglas en inglés) se une al sitio de unión a ADP de la región NACHT. Cuando este pasa a su forma activa, se piensa que se lleva a cabo la fosforilación del ADP unido a NACHT hacia adenosín trifosfato (ATP por sus siglas en inglés), pero dicho método de activación no ha sido demostrado (Fu J., et.al., 2023; Banerjee S., et. al., 2022).

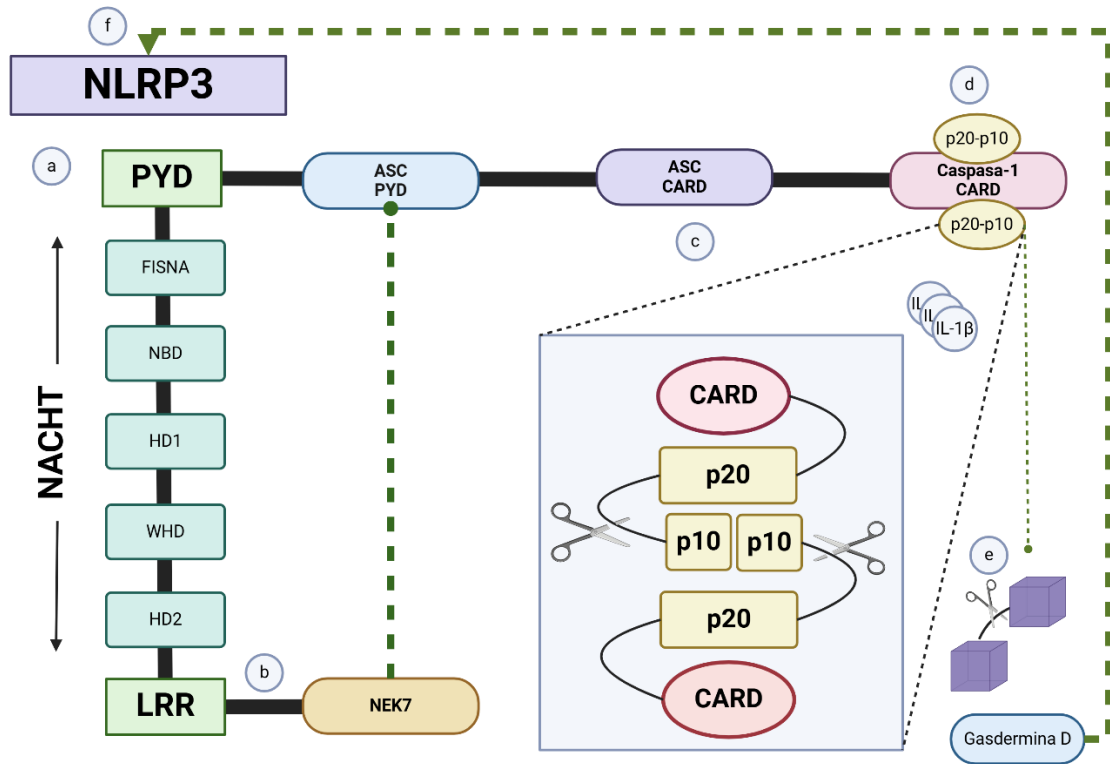


Ilustración 6. Estructura molecular del Inflamosoma NLRP3. El inflamosoma NLRP3 está compuesto por 3 complejos, constituidos por NLRP3, el cual presenta actividad de sensor para diferentes PAMPs y DAMPs, ASC el cual actúa como complejo de anclaje entre NLRP3 y caspasa-1 y caspasa-1, el cual actúa como efector en la maduración de citocinas proinflamatorias e inducción de fenómenos de muerte celular por piroptosis. En a se señalan los componentes de NLRP3, en b se señala el paso de filamento de PYD regulado por NEK7 y su unión a ASC, en c se señala el papel conector de ASC con caspasa-1 y NLRP3, en d se muestra el complejo de caspasa, mientras que en e se detalla el papel de la caspasa-1 como maquinaria de escisión de gasdermina D. En f se señala el papel regulador de la actividad de gasdermina D sobre NLRP3.

Proceso de Oligomerización del NLRP3

Diferentes modelos experimentales realizados con NLRP3 de rata, expresado en diferentes mamíferos, han demostrado que la unión de ATP a NACHT induce una oligomerización de 12 monómeros de NLRP3, originando una estructura dodecamérica de 200 a 250 Å, el cual adquiere forma de anillo de doble capa que da una configuración de barril (Fu J., et.al., 2023).

La oligomerización de NLRP3 humano ha sido estudiada por criomicroscopía electrónica y se ha descrito que forman una jaula decamérica en humanos similar a las estructuras dodecaméricas de rata, así mismo, se ha descrito una formación de doble anillo a partir de 5 a 8 moléculas de NLRP3 (Fu J., et.al., 2023; Banerjee S., et. al., 2022).

El estudio de purificados de NLRP3 de rata han demostrado un mecanismo interesante de unión a membrana celular a través de una alta afinidad a los fosfoinosítidos constituyentes de la bicapa lipídica, y a su vez, se ha demostrado una sobreexpresión de NLRP3 cuando existen fenómenos de lisis. A partir de diferentes estudios de criomicroscopía electrónica se ha demostrado que NLRP3 no se encuentra expresado únicamente en la membrana plasmática, sino que se encuentra expresada en diferentes organelos intracelulares, incluyendo el retículo endoplásmico, mitocondria y aparato de Golgi. Así mismo se ha demostrado que NLRP3 es transportado a través de microtúbulos cuando los extremos terminales LRR se encuentran unidos a NEK7 (Fu J., et.al., 2023; Banerjee S., et. al., 2022).

Estudios experimentales en donde se favorece la unión de ADP a NACHT ha demostrado que NLRP3 pasa de una configuración en jaula decamérica y adquiere una configuración esférica hexamérica compuesta por dos capas triméricas que favorecen la regulación a la baja de la actividad sensible del complejo inflamósoma mediada por NLRP3 (Fu J., et.al., 2023; Banerjee S., et. al., 2022).

Implicaciones del inflamósoma NLRP3 en la PD

En el contexto de la PD, se ha encontrado un incremento en las concentraciones de IL-1b y caspasa-1 a nivel sérico y a nivel del *estriatum*. De igual manera se ha observado que los complejos fibrilares de a-syn inducen la secreción de IL-1b por medio de la estimulación de monocitos BV2 del linaje microglial, a través de la vía del NLRP3 y de la caspasa-1 en modelos murinos. Se ha estudiado la relevancia del TLR-2 como vía paracrina activada por la a-syn y su correspondiente inducción en la síntesis de IL-1b por parte de la microglía. Se ha observado de manera experimental en microglía de ratones y en neuroblastomas y cultivos celulares de células SH-SY5Y expuestas a a-syn, que estas presentan cambios indicativos de

activación a nivel de las vías proinflamatorias, incluyendo cambios morfológicos de la microglía a sus formas ameboides, producción de óxido nítrico (NO por sus siglas al inglés) y especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas al inglés) así mismo se ha evidenciado un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias detectables a partir de la concentración de estas y por medio de su mRNA codificantes. Con base a estas connotaciones, se ha descubierto que la vía mediada por TLR2 se activa de manera temprana ante la exposición de la α -syn, induciendo la síntesis de varias moléculas proinflamatorias y quimiocinas, entre las que se destaca la inducción sintética de la IL-1b, además, la evidencia demuestra la activación de la vía JAK-STAT de manera temprana induciendo migración transendotelial temprana de los leucocitos, regulación y restructuración de los filamentos de actina del citoesqueleto y una estimulación sostenida de la vía del TLR2. (Kaur et al., 2020; Kim et al., 2013; Rutsch et al., 2020)

Se ha observado en modelos murinos que la vía mediada por TLR3 juega un papel importante dentro de la patogenia de la PD, ya que a partir de estos modelos en donde se administran agonistas de TLR3 a nivel de la SN favorecen el desarrollo de un estado proinflamatorio sostenido y un incremento en la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas al estrés oxidativo. (Kim et al., 2013)

Se ha descrito en cuadros clínicos de instauración temprana de la enfermedad, la existencia de una respuesta exagerada del inflamósoma NLRP3 a nivel de la microglía y los macrófagos cuando existe la presencia de mutaciones en los genes codificantes de las parkinas (PARK2) y de la proteínacinas mitocondrial de serina/treonina (PINK1). Se han desarrollado modelos animales con caspasa-1 activada, en los que se observa un aumento directo en la concentración y formación de protofilamentos de α -syn, lo cual, promueve de manera directa un ambiente neurotóxico para las neuronas, mientras que la expresión crónica de IL-1b a nivel de la sustancia nigra en modelos murinos se correlaciona directamente con una inducción progresiva de la muerte de las neuronas dopaminérgicas, dando como resultado manifestaciones motoras. De esta manera y en correlación con los hallazgos destacados en estos modelos animales, se ha protocolizado el uso de inhibidores de caspasa-1 en inyección (Ac-YVAD-CMK) donde se demostró que posterior a su administración se

presenta una reducción en la actividad del inflamosoma NLRP3 y con ello, una mayor tasa de supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en estos modelos murinos experimentales, sin embargo, aún se desconoce con exactitud la relación existente entre un insulto en la microbiota como detonante en la actividad del inflamosoma y viceversa. (Rutsch et al., 2020)

Dentro de los modelos experimentales a nivel murino, es importante resaltar que en el uso de un modelo knockout para genes de TLR 2, 3 y 4 (Tlr2^{-/-}, Tlr3^{-/-} y Tlr4^{-/-}) demostraron que en los modelos Tlr2^{-/-} se pierde la actividad de la vía y la correspondiente respuesta dirigida a la inducción en la síntesis de citocinas inflamatorias y quimiocinas tanto a nivel de mRNA y la concentración de estas proteínas, mientras que los otros dos modelos no mostraban cambios significativos en relación a la inhibición de estas vías para la síntesis de estas moléculas mediada por estimulación de la α -syn. (Kim et al., 2013)

Fisiología del eje microbioma-intestino- cerebro

El intestino de un humano adulto contiene más de 1 kg de bacterias, esencialmente, el mismo peso que un cerebro humano, encontrándose en este una concentración de aproximadamente 10^{13} - 10^{14} microorganismos y contiene 100 veces más genes que el propio genoma humano. La red de comunicaciones entre el intestino y el CNS es compleja e incluye al sistema nervioso entérico (ENS por sus siglas al inglés) así como al sistema nervioso autónomo dentro de los componentes nerviosos y se incluye además dentro de los sistemas de regulación de este eje las vías de señalización neuroinmuno y neuroendocrinológicas. (Anand et al., 2023; Dinan & Cryan, 2017; Socała et al., 2021)

La barrera intestinal está compuesta de una monocapa de células epiteliales que separa la microbiota intestinal presente en el lumen, del medio interno tisular. Bajo condiciones de homeostasis las estrictas conexiones intercelulares por medio de desmosomas, uniones estrechas y uniones adherentes regulan el paso selectivo de nutrientes, agua y electrolitos y previenen la translocación de toxinas bacterianas, microorganismos y otras moléculas potencialmente dañinas. (Choi et al., 2018; Pan-Montojo et al., 2012; Qin et al., 2007; Rutsch et al., 2020; Varesi et al., 2022)

Las células enteroendócrinas tienen una sinapsis directa hacia las aferencias vágales y su correspondiente núcleo, así como rutas sinápticas hacia la sustancia nigra y al estriatum. Los diferentes componentes de estas vías neuronales pueden actuar como sitios distales de regulación cerebral, modulando la permeabilidad de barrera hematointestinal y BBB, neurogénesis y comportamiento del huésped, esto mediado a partir de SCFAs y su unión a receptores ligados a proteína G (GPR por sus siglas al inglés), sobre todo, GPR41, el cual se encuentra en altas concentraciones en estos distintos ejes. (Hirayama & Ohno, 2021)

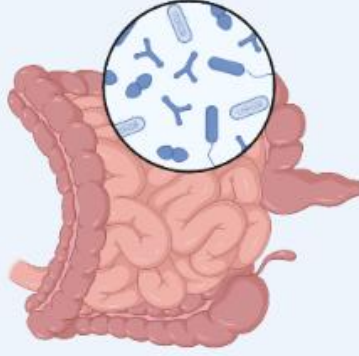
Hasta la fecha se ha señalado que el cerebro comprende un órgano inmunológicamente privilegiado por el hecho de contar con un sistema de barreras que impide el paso de sustancias desde la periferia hacia este mismo, denominada BBB, la cual se encuentra constituida por células endoteliales, prolongaciones de neuroglia que dan sostén al sistema de barrera y células inmunológicas que actúan como sistemas de identificación frente a sustancias y patógenos. Sin embargo, en base a datos de investigaciones recientes, se ha identificado que la BBB no es netamente selectiva, y permite el paso de metabolitos bacterianos y células inflamatorias desde cualquier terreno que involucre al sistema inmunológico, permitiendo observar que este paso de sustancias se ha involucrado con el desarrollo de diferentes procesos neuropatológicos. (Rutsch et al., 2020)

La microbiota comprende un conjunto de bacterias comensales que cumplen una actividad simbiótica dentro del organismo; se ha estimado una densidad bacteriana de 10^{12} células/gramo de contenido en el intestino delgado. Los componentes de la microbiota se dividen en diversidades, entre las que se destacan la diversidad alfa, la cual hace referencia a las taxonomías más abundantes en la composición del microbioma, mientras que la diversidad beta hace referencia a la diversidad entre muestras. Se ha identificado que cuatro phylums constituyen la microbiota, entre los que se encuentran los *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. La microbiota de la mucosa intestinal juega un papel fundamental como componente metabólico del organismo, ya que se ha asociado a procesos de digestión, síntesis de vitaminas, angiogénesis, maduración de células epiteliales, así como desarrollo y educación del sistema inmunológico para establecer inmunotolerancia a diferentes agentes bacterianos benéficos para el organismo (Ilustración 7 y 8). Se ha descrito

que el desarrollo de la microbiota en el ser humano ocurre durante los primeros cuatro meses de vida, y se propicia fundamentalmente por el nacimiento vía vaginal, donde la piel y la cavidad oral mantiene contacto con la microbiota vaginal de la madre, favoreciendo la colonización de estas bacterias en el recién nacido, mientras que un segundo punto de desarrollo y colonización de la microbiota se da durante el contacto piel con piel estrecho que mantiene el neonato con la madre. El resultado de un adecuado desarrollo de la microbiota se traduce en un adecuado desarrollo de inmunotolerancia y respuesta inmunológica frente a patógenos diferentes a los que componen esta. De igual manera, se ha observado que favorece el desarrollo de la integridad de la mucosa intestinal. (Costa et al., 2023; Dinan & Cryan, 2017; Pajares et al., 2020; Rutsch et al., 2020; Socała et al., 2021)

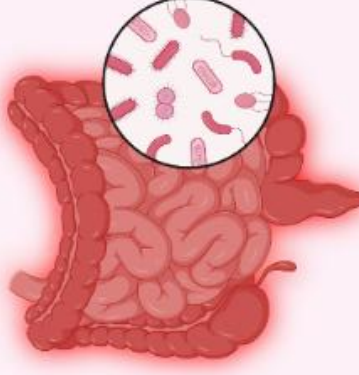
Se ha descrito en la literatura que las rutas de comunicación clave entre la microbiota entérica y el cerebro comprenden al nervio vago, metabolitos del triptófano y metabolitos microbianos tales como SCFAs o peptidoglicanos. La microbiota intestinal puede afectar la función cerebral mediante la modulación serotoninérgica, noradrenérgica, dopaminérgica, glutaminérgica y GABA-érgica, ya que esta tiene la capacidad de sintetizar y metabolizar neurotransmisores o producir sustancias neuroactivas por sí mismas (Tabla 1). Estos neurotransmisores producidos a nivel intestinal tienen influencia a nivel cerebral indirectamente mediante su actividad a nivel del ENS. Bajo el entendimiento de estos conceptos, se ha propuesto que algunas bacterias benéficas y prebióticos como ocurre con las fibras solubles compuestas por galactooligosacáridos (GOS por sus siglas al inglés) y fructooligosacáridos (FOS por sus siglas al inglés) pueden generar una regulación de las funciones cerebrales y así mismo tener beneficio terapéutico sobre algunas enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas, por estos motivos, han recibido la denominación de psicobióticos. (Dinan & Cryan, 2017; Lyte, 2011; Socała et al., 2021)

Microbiota sana



- Maduración inmunológica.
 - Inmunotolerancia.
 - Motilidad intestinal.
 - Diferenciación celular.
 - Angiogénesis.
 - Desarrollo del ENS.
- Neuroprotección inflamatoria.

Microbiota disbiótica



- incremento en la permeabilidad intestinal.
 - Inflamación local y sistémica.
 - Producción de proteínas amiloides
 - Incremento en la fibrilación y depósito de α -syn.
- Disminución en la biosíntesis de SCFAs.
 - Neuroinflamación.

Ilustración 7. Relación entre la microbiota y el desarrollo de la Enfermedad de Parkinson. Creada con Biorender.com, Autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creada a partir de (Berthouzoz et al., 2023)

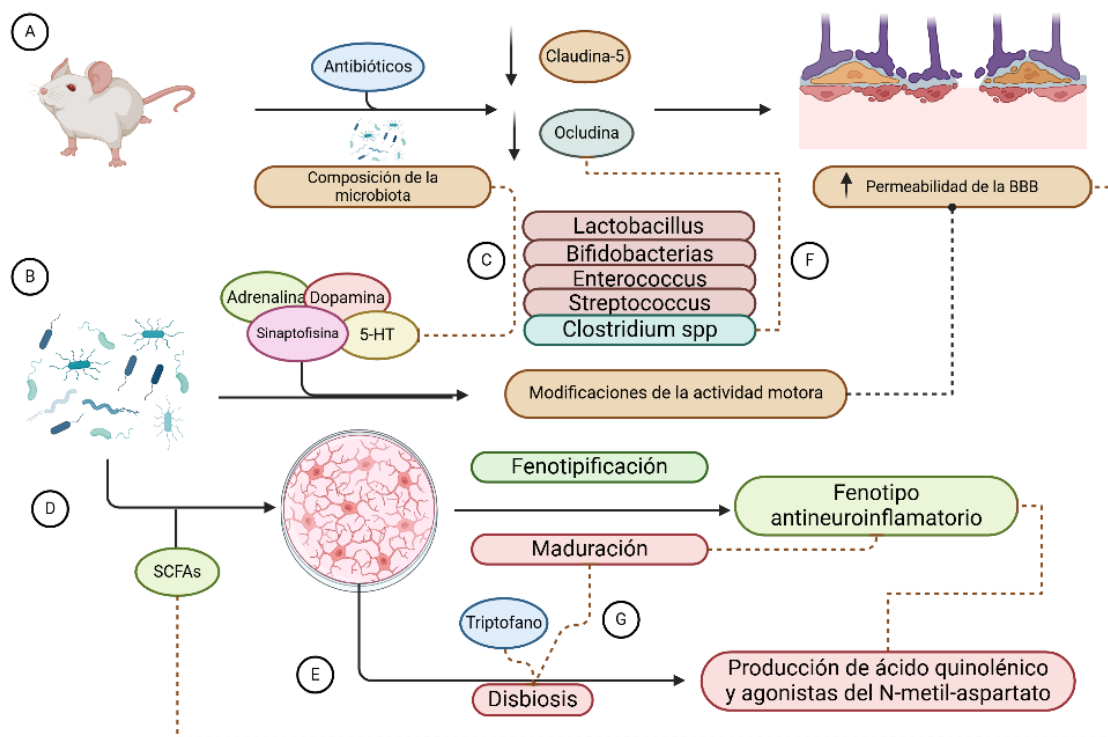


Ilustración 8. Papel de la microbiota en la regulación del eje microbiota-intestino-cerebro. La disbiosis reduce las proteínas de unión estrecha, incrementando drásticamente la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y permitiendo el paso de metabolitos tóxicos. Esto altera la síntesis de neurotransmisores como la dopamina (A, B) y, al igual que los antibióticos, reduce los neuromoduladores promoviendo la neuroglisis (C). Dicho desbalance fomenta un fenotipo neuroglial proinflamatorio y excitotóxico impulsado por toxinas e intermediarios del triptófano (E, G). Por el contrario, los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y especies benéficas como Clostridium spp. ejercen un rol inmunomodulador y neuroprotector (D, F), ya que restauran la integridad de las barreras y promueven la maduración glial hacia un perfil antineuroinflamatorio que mitiga la degeneración neuronal Creado con Biorender.com, autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creado a partir de (Rutsch et al., 2020)

Tabla 1. Diversidad de moléculas neuroactivas y neurotransmisores aislados a partir de varias especies microbianas. Autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creado a partir de (Dinan & Cryan, 2017; Lyte, 2011).

Microorganismos componentes de la microbiota	Sustancias neuroactivas y neurotransmisores producidos	Referencias
<i>Candida spp.</i>	Serotonina	(Dinan & Cryan, 2017; Lyte, 2011)

<i>Escherichia coli</i>	Serotonina, norepinefrina, noradrenalina	(Dinan & Cryan, 2017; Lyte, 2011)
<i>Enterococcus spp.</i>	Serotonina, noradrenalina	(Dinan & Cryan, 2017; Lyte, 2011)
<i>Streptococcus spp.</i>	Serotonina, noradrenalina	(Dinan & Cryan, 2017; Lyte, 2011)
<i>Bifidobacterium spp.</i>	GABA	(Dinan & Cryan, 2017; Lyte, 2011)
<i>Lactobacillus spp.</i>	GABA, acetilcolina	(Dinan & Cryan, 2017)
<i>Bacillus spp.</i>	Dopamina, noradrenalina	(Dinan & Cryan, 2017; Lyte, 2011)
<i>Serratia spp.</i>	Dopamina	(Lyte, 2011)
<i>Saccharomyces spp.</i>	Norepinefrina	(Dinan & Cryan, 2017; Lyte, 2011)

Algunos resultados de protocolizaciones sugieren que los metabolitos derivados de la digestión del triptófano por medio de las bacterias componentes de la microbiota a nivel intestinal activan la vía de señalización mediada por el receptor de aril hidrocarbonado (AhR por sus siglas en inglés) a nivel de los astrocitos y la microglía induciendo la activación de mecanismos de protección inmunitaria en el hospedador que son relevantes en la supresión de la inflamación a nivel de CNS, sobre todo, la regulación en los niveles de interleucina 10 (IL-10), tanto en modelos animales y con capacidad extrapolable al ser humano. (Rutsch et al., 2020)

Modelos experimentales

Modelos murinos en los que se emplean ratones libres de bacterias o libres de uno o más patógenos en específico han permitido definir la importancia de la microbiota en el contexto de la salud humana y animal, y así mismo, ha permitido observar que la alteración de este componente favorece una respuesta exagerada a nivel del eje hipotálamo- hipófisis- adrenal alterando la respuesta al estrés, desarrollo y comportamiento social y un incremento de la actividad motora. Algunos modelos murinos, en los que se lleva a cabo la administración de antibióticos para modificar la microbiota han demostrado una disminución de la proteínas de unión ocludina y claudina-5, favoreciendo el incremento de la permeabilidad a nivel de la barrera hematoencefálica, así mismo, se asocia a fenotipos relacionados a alteraciones en la expresión de genes. Se ha observado que dentro de sus metabolitos se encuentran factores modificadores de las diferentes vías de control motoras entre los que se destaca a la adrenalina, dopamina, 5-hidroxitriptofano, proteína densidad postsináptica 95 y sinaptofisina. De esta manera, se ha evidenciado que estos microorganismos constitutivos de la microbiota contribuyen de manera directa en la comunicación de intestino y cerebro, fenómeno que se ha dilucidado al identificar que especies como *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Enterococcus* y *Streptococcus* tienen la capacidad de síntesis de neurotransmisores que pueden influir directa o indirectamente en la fisiología de las células cerebrales. Otro hallazgo resaltable de esta relación metabólica consiste que aproximadamente la concentración de serotonina producida por la microbiota se corresponde al 90% de toda la serotonina sintetizada en un organismo, y que de igual forma, al interactuar la microglía con estas moléculas de neuroseñalización, se observa una actividad antineuroinflamatoria a través de la liberación de exosomas acarreadores de citocinas, reflejando que una alteración en la constitución de esta microbiota tiene un papel fundamental en el desarrollo de neuroinflamación, fenómeno que en años anteriores, era evidentemente ignorado. Se ha demostrado que la microbiota se encuentra directamente involucrada en el metabolismo del triptófano, y que, cuando existe un proceso de disbiosis, el triptófano libre es captado por las células de la microglía, induciendo así la producción de neurotoxinas secundarias de su metabolismo, tales como ácido quinolínico y agonistas del N-metil-

aspartato, los cuales están ampliamente implicados en diferentes desordenes neurológicos como ocurre en el Corea de Huntington y la depresión. (Rutsch et al., 2020)

Disbiosis y PD

La disbiosis intestinal es definida como un desbalance a nivel de la flora intestinal en relación con el sobrecrecimiento de microorganismos patógenos en comparación con las concentraciones habituales de bacterias comensales benéficas a nivel intestinal. (Varesi et al., 2022)

La literatura refiere que una composición saludable de la microbiota intestinal garantiza la integridad no solo de la barrera inmunológica intestinal, sino que también se asocia a una integridad de la BBB, esto mediante la regulación en la expresión de proteínas de composición de esta barrera tal como ocurre con la claudina-5 y la ocludina, a través de la producción de SCFAs empleando estas moléculas lipídicas como señales de modulación para el neurodesarrollo y sinaptogénesis. Estas moléculas comprenden un papel antiinflamatorio y la evidencia resalta que las bacterias productoras de SCFAs en la PD se encuentran a bajas concentraciones. (Aho et al., 2021; Chen et al., 2022; Varesi et al., 2022)

La barrera intestinal está compuesta de una monocapa de células epiteliales que separa la microbiota intestinal presente en el lumen, del medio interno tisular. Bajo condiciones de homeostasis las estrictas conexiones intercelulares por medio de desmosomas, uniones estrechas y uniones adherentes regulan el paso selectivo de nutrientes, agua y electrolitos y previenen la translocación de toxinas bacterianas, microorganismos y otras moléculas potencialmente dañinas. (Choi et al., 2018; Pan-Montojo et al., 2012; Qin et al., 2007; Rutsch et al., 2020; Varesi et al., 2022)

Se ha demostrado evidencia que decrementos en los niveles de proteínas relacionadas a la formación de las uniones estrechas a nivel del colon, tales como la ocludina y la ZO-1 potencian la inflamación intestinal por medio de la activación del inflamosoma regulado por caspasa-1, activando así la vía de señalización dirigida a la síntesis de IL-1b y TNF-a, proceso relacionado con la PD. De igual manera se han observado altas concentraciones de marcadores de fuga intestinal, entre los que destacan la zonulina y la a1- anti-tripsina, así

mismo, se han encontrado altas concentraciones de marcadores inflamatorios colónicos como calprotectina y lactoferrina en muestras fecales de pacientes que cursan con la PD. (Choi et al., 2018; Pan-Montojo et al., 2012; Qin et al., 2007; Rutsch et al., 2020; Varesi et al., 2022)

La microbiota intestinal y el metabolismo del hospedador están estrictamente interconectados. Bajo este precepto, cuando existe disbiosis, también existe una alteración en el metabolismo energético, de lípidos, y aminoácidos. En estudios experimentales se ha demostrado una disminución en la biosíntesis de aminoácidos de cadena aromática y ramificada, fermentación de carbohidratos y síntesis de butirato acompañado de una regulación al alta en la síntesis de LPS, biosíntesis del sistema de secreción tipo III bacteriano, fermentación proteolítica y un aumento exagerado en la liberación de promotores inflamatorios. Esto se correlaciona directamente con incrementos en la concentración plasmática de ácido indol-3-propionico, ácido hipúrico, así como ácidos desoxicólico y glicodesoxicólico. Otras moléculas tóxicas producidas por la microbiota como resultado de la disbiosis y asociadas a neurodegeneración son los esfingolípidos, trimetilamina-N-óxido (TMAO por sus siglas en inglés) y los ácidos grasos de cadena ramificada como el succinato, los cuales están ligados a severidad de la PD. La TMAO es un producto de la amino oxidasa que se ha implicado a estrés oxidativo, disrupción de la BBB, disfunción mitocondrial, envejecimiento cerebral y neurodegeneración. Los niveles incrementados de TMAO en plasma están acompañados por un decremento en la producción de SCFAs requeridos para la propia función del ENS. Se ha demostrado que los niveles bajos de acetato, butirato y propionato en muestras fecales de pacientes con PD están ligados a una peor evolución de los síntomas neuromotores (Figura 6). (Varesi et al., 2022)

El sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado (SIBO por sus siglas en inglés) comprende una condición caracterizada por incrementos en la concentración bacteriana aproximada de 10^5 unidades formadoras de colonias (CFU por sus siglas al inglés) /ml y/o la presencia de bacterias de tipo colónico en el intestino delgado. La presencia de SIBO en pacientes con PD se reporta hasta en un 54% y se asocia de manera directa con el desarrollo de complicaciones motoras y variabilidad en la respuesta motora, debido a que puede influir

en el metabolismo de la L-dopa en relación con la presencia de bacterias que expresan el gen tdc o alternatively incrementan la permeabilidad e inflamación del intestino delgado. Bajo estos conceptos, se reconoce que la SIBO tiene la capacidad de disminuir la biodisponibilidad de la L-dopa y con ello, favorecer la severidad de los síntomas motores en la PD. (Menozzi & Schapira, 2024)

Cuando existe una disrupción de la barrera intestinal, las endobacterias gram negativas y sus endotoxinas, especialmente el LPS, pueden pasar a torrente sanguíneo, una condición conocida como endotoxemia metabólica. Los incrementos en estos niveles de LPS en la circulación son reconocidos como gatillos para la activación de los mecanismos de inflamación sistémica y destrucción de la BBB, lo que permite que dichas endotoxinas inflamatorias puedan tener una vía de acceso al parénquima cerebral. De la misma manera, el LPS es reconocido por interactuar con la α -syn y promover su nucleación, lo cual da cabida a que se inicie la cascada de eventos moleculares asociados a la formación de agregados proteicos. (Varesi et al., 2022)

Interacciones fisiológicas entre el eje microbioma-intestino-cerebro

Hasta la fecha se ha señalado que el cerebro comprende un órgano inmunológicamente privilegiado por el hecho de contar con un sistema de barreras que impide el paso de sustancias desde la periferia hacia este mismo, denominada barrera hematoencefálica, la cual se encuentra constituida por células endoteliales, prolongaciones de neuroglia que dan sostén al sistema de barrera y células inmunológicas que actúan como sistemas de identificación frente a sustancias y patógenos. Sin embargo, en base a datos de investigaciones recientes, se ha identificado que la barrera hematoencefálica no es netamente selectiva, y permite el paso de metabolitos bacterianos y células inflamatorias desde cualquier terreno que involucre al sistema inmunológico, permitiendo observar que este paso de sustancias se ha involucrado con el desarrollo de diferentes procesos neuropatológicos. (Rutsch et al., 2020)

Las células enteroendócrinas tienen una sinapsis directa hacia las aferencias vágales y su correspondiente núcleo, así como rutas sinápticas hacia la sustancia nigra y al estriatum.

Los diferentes componentes de estas vías neuronales pueden actuar como sitios distales de regulación cerebral, modulando la permeabilidad de barrera hematointestinal y hematoencefálica, neurogénesis y comportamiento del huésped, esto mediado a partir de SCFAs y su unión a receptores ligados a proteína G (GPR por sus siglas al inglés), sobre todo, GPR41, el cual se encuentra en altas concentraciones en estos distintos ejes. (Hirayama & Ohno, 2021)

Se ha descrito en la literatura que las rutas de comunicación clave entre la microbiota entérica y el cerebro comprenden al nervio vago, metabolitos del triptófano y metabolitos microbianos tales como SCFAs o peptidoglicanos. La microbiota intestinal puede afectar la función cerebral mediante la modulación serotoninérgica, noradrenérgica, dopaminérgica, glutaminérgica y GABA-érgica, ya que esta tiene la capacidad de sintetizar y metabolizar neurotransmisores o producir sustancias neuroactivas por sí mismas (Tabla ARV3.1). Estos neurotransmisores producidos a nivel intestinal tienen influencia a nivel cerebral indirectamente mediante su actividad a nivel del ENS. Bajo el entendimiento de estos conceptos, se ha propuesto que algunas bacterias benéficas y prebióticos como ocurre con las fibras solubles compuestas por galactooligosacáridos (GOS por sus siglas al inglés) y fructooligosacáridos (FOS por sus siglas al inglés) pueden generar una regulación de las funciones cerebrales y así mismo tener beneficio terapéutico sobre algunas enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas, por estos motivos, han recibido la denominación de psicobióticos. (Dinan & Cryan, 2017; Lyte, 2011; Socała et al., 2021)

Implicación de la microbiota en la fisiopatología de la PD (Ilustración 12)

El eje microbiota-intestino-cerebro ha cobrado una alta relevancia en los estudios experimentales más recientes relacionados al descubrimiento de los determinantes fisiopatológicos de la PD, debido a que, el intestino sirve como vía de comunicación entre el medio ambiente y el cerebro. (X. Zhang et al., 2023)

Hasta el momento se ha reconocido que los pacientes que cursan con la PD desarrollan síntomas gastrointestinales hasta en un 80% de la población enferma, siendo el más importante la constipación, y que, de manera directa, refleja un incremento en el riesgo

de desarrollar la enfermedad, con relación a aquellos que nos presentan dicho síntoma. Así mismo, se ha observado que los pacientes que presentan este síntoma tienen un peor pronóstico de la enfermedad. (X. Zhang et al., 2023)

Hoy en día se sabe que la PD no solo afecta al CNS, sino que también ocurren cambios patológicos a nivel del ENS, reconociéndose que estos ocurren mucho antes de que se presenten las modificaciones a nivel del CNS. Se ha descrito en modelos murinos la presencia de daño neuronal y glial a nivel del ENS, así mismo, se ha observado degeneración atrófica de las neuronas en el plexo mientérico y submucoso, con evidencia de depósitos de a-syn en pacientes que cursan con PD en etapas tempranas. Se ha descrito en diferentes modelos experimentales que inclusive, el ENS muestra mucho mayor sensibilidad a la A30P a-syn que el propio CNS (X. Zhang et al., 2023).

En el contexto de una relación positiva entre la microbiota y el desarrollo de la PD, se ha identificado a través de diferentes estudios experimentales que estos pacientes muestran una depleción marcada de los SCFAs, principalmente de butirato, producidos por las bacterias de la microbiota, mostrando una depleción bacteriana específica de la familia *Lachnospiraceae* y *Faecalibacterium prausnitzii*, las cuales juegan un papel importante en propiedades antiinflamatorias de la microbiota en estos pacientes. Se ha descrito también que estos grupos bacterianos están implicados en el decremento de la dopamina como metabolito, favoreciendo una peor calidad de vida y signos de depresión (Ilustración 9). (Bai et al., 2024; Bonnechère et al., 2022; Rutsch et al., 2020; Weis et al., 2021)

Los diferentes procesos de investigación en torno al tema de la microbiota ha demostrado que la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, por sus siglas en inglés), mediada por la microbiota, favorece un estado de salud positivo a nivel intestinal, promoviendo la integridad de la barrera mucosa intestinal, la adecuada producción de mucus y dando soporte a la tolerancia inmunológica aun frente un estado proinflamatorio. Se ha descrito de igual manera, que a nivel cerebral, los SCFAs tiene la capacidad de actuar como restauradores de la barrera hematoencefálica, modulación de neurotransmisores y factores neurotróficos, y tienen capacidad de actuar como moléculas de señalización celular como ocurre con el propionato y butirato, modificando así los niveles de potasio intracelular y

regulando la expresión en los niveles de la triptofano-5-hidroxilasa-1 involucrada en la síntesis de serotonina, y de la tirosina hidroxilasa, involucrada en la biosíntesis de dopamina, adrenalina y noradrenalina. (Rutsch et al., 2020)

Se ha caracterizado en pacientes que cursan con la PD la existencia de sobrecrecimiento de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Akkermansia* y otros patógenos oportunistas como *Porphyromonas* y *Corynebacterium*, asociándose de manera directa a un decremento en las concentraciones de bacterias productoras de SCFAs como *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae* y *Faecalibacterium*. Existe evidencia en que este último se asocia al adecuado mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal a través de la producción de los SCFAs, principalmente butirato y la secreción de mediadores antiinflamatorios. Otras taxonomías productoras de SCFAs como *Blautia*, *Roseburia*, *Caprococcus* y *Prevotella* presentan de igual manera actividades inmunomoduladoras que se encuentran reducidas en los pacientes que cursan con PD comparado con controles (Ilustración 9) (Bai et al., 2024; Consonni et al., 2022; Heravi et al., 2023; Varesi et al., 2022)

La relevancia de los SCFAs recae en su capacidad de actuar como molécula de señalización a partir de receptores ligados a proteína G, que transduce señales de activación de la vía antiinflamatoria, favoreciendo la síntesis de citocinas antiinflamatorias y a su vez, inhibe la desacetilación de histonas. De igual modo, se ha observado que estas moléculas juegan un papel importante en el incremento y activación de linfocitos T reguladores. (Hirayama & Ohno, 2021)

La *Akkermansia muciniphila* posee el efecto benéfico de producir SCFAs a partir del metabolismo de la mucina, sin embargo, cuando se encuentra en altas concentraciones este efecto se vuelve patógeno y genera cambios en la permeabilidad de la barrera intestinal y potencia la inflamación regional con su correspondiente translocación hacia el SNC, así mismo acelera la progresión en los depósitos de la a-syn y su consiguiente agregación a nivel de las células enteroendócrinas. (Varesi et al., 2022)

Se ha observado a partir de dos grandes estudios de microbiota relacionada con la PD, que una deficiencia en la suplementación de fibra dietética favorece que la *Akkermansia*

muciniphila degrade la capa de moco intestinal e incrementa la permeabilidad intestinal. (Hirayama & Ohno, 2021; Varesi et al., 2022)



Ilustración 9. Cambios microbiológicos ocurridos en la disbiosis relacionada a la PD y sus efectos sobre la fisiopatología de la enfermedad. Creado con Biorender.com, autoría de: Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creado a partir de (F. Zhang et al., 2020).

Las bacterias intestinales producen SCFAs, así como vitamina B2, B6, B12 y K, ácido fólico, ácido pantoténico, biotina, serotonina y poliaminas. En modelos experimentales relacionados a la PD se ha asociado un decremento en la concentración de SCFAs y poliaminas séricas. Los estudios basados en KOSEA revelan que el metabolismo del butanoato y propionato se encuentran modificados en pacientes con PD, esto muestra una correlación directa con la disminución en la concentración de bacterias productoras de SCFAs y que manera inversa, dentro del metaboloma de los pacientes con PD se observa incremento en la degradación de valina, leucina, isoleucina y lisina. Cuando existe una deficiencia en la concentración de fibra fermentable, los microorganismos cambian su consumo hacia recursos energéticamente menos favorables como ocurre con los aminoácidos provenientes de la dieta y metabolismo endógeno de las proteínas. La fermentación de proteínas contribuye a la formación de un pool de SCFAs de cadenas ramificadas como el isobutirato, 2-metilbutirato e isovalerato, que se originan exclusivamente de aminoácidos de cadena ramificada. (Hirayama & Ohno, 2021)

Dentro del estudio de microbiota en pacientes con PD se ha descrito que existe un incremento en la actividad de las vías metabólicas relacionadas a la degradación de ácidos nucleicos y metabolismo de los aminoácidos, un incremento en la vía metabólica de la fucosa, la cual tiene como objetivo generar glucanos ligados a nitrógeno, útiles para la síntesis de proteínas de la mucina. (Hirayama & Ohno, 2021)

Se ha observado que la reducción en la concentración de *Ruminococcus* se asocia de manera directa con alteraciones neurocognitivas y puntajes elevados en el Mini Mental State Examination (MMSE por sus siglas en ingles), así como a inestabilidad postural y este mismo fenotipo de la PD se ha asociado también a aumentos en la concentración de *Lactobacillaceae*, *Christensenellaceae*, *Enterobacteriaceae* (*E. coli/Shigella spp.*), siendo estos últimos en conjunto con la *Serratia* mayormente incidente en fenotipos no motores de rápida progresión en pacientes que cursan con la PD. (Varesi et al., 2022)

Bajo estos conceptos, se ha determinado que tanto la degradación de la mucina, incremento de la permeabilidad intestinal y la inducción de agregación de a-syn por parte del incremento en los LPS y su fenómeno similar a inclusión y translocación priónica a través de las células entero endócrinas a través del núcleo dorsal del vago hasta la SN y el estriatum, favorecen el desarrollo de la pérdida neuronal dopaminérgica y reducción de la concentración de dopamina a nivel del estriatum, exacerbando la sintomatología motora de la PD (Ilustración 10). (Hirayama & Ohno, 2021)

Estudios clínicos recientes indican que los microbios intestinales están asociados a la manifestación de diversos fenotipos de PD, así mismo, se ha observado cambios en el tiempo de instauración, duración de la enfermedad, estadio de la enfermedad y síntomas clínicos, tanto motores como no motores (Ilustración 11) (Mou et al., 2022; Wallen et al., 2022; Zhang et al., 2023).

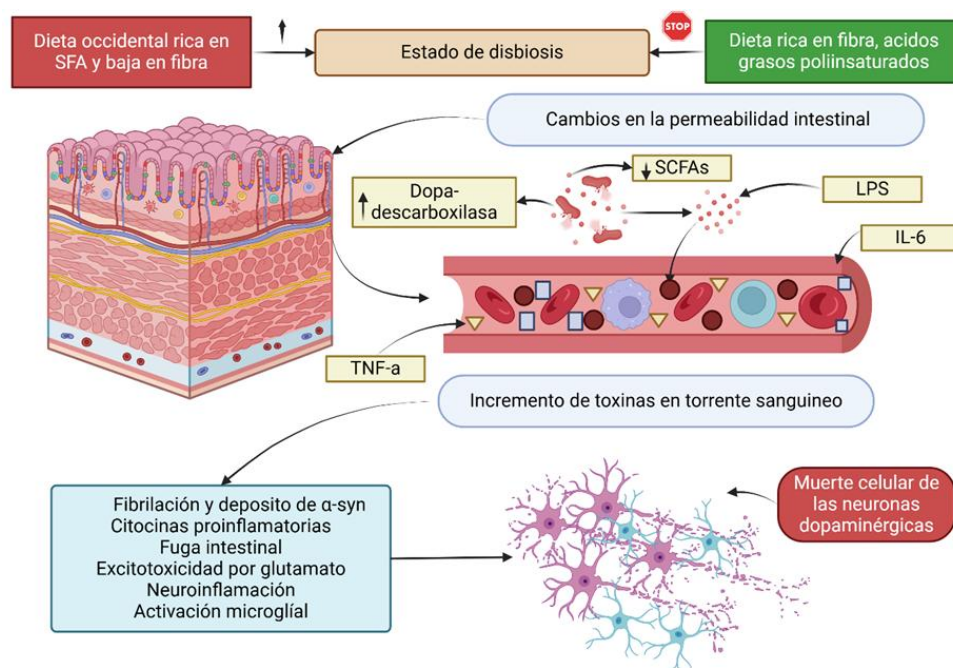


Ilustración 10. Procesos fisiopatológicos relacionados a la disbiosis y su relación con el desarrollo de la Enfermedad de Parkinson. La presente ilustración ejemplifica la relación en como los cambios composicionales de la microbiota intestinal juegan un papel fundamental en el desarrollo de la PD desde etapas prodrómicas. Entre los cambios más significativos se encuentra la disrupción de las barreras de protección secundarias a la degradación de mucina por parte de la bacteria *Akkermansia muciniphila*, la cual a su vez se asocia con una alteración en la síntesis y concentración de SCFAs. Se ha observado un incremento directamente proporcional de Dopa descarboxilasa secundario al incremento de *Enterococcus* en estos procesos de disbiosis, que, en conjunto con el incremento del LPS a nivel intestinal y sérico favorecen la activación de la vía del inflamosoma NLRP3, generando un incremento significativo en la síntesis de citocinas proinflamatorias, secundario a la migración de metabolitos microbianos tóxicos, capaces de inducir una respuesta neuroinflamatoria a nivel de las células de la neuroglia, desencadenando incremento en los depósitos de α -syn, fibrilación y formación de Cuerpos de Lewy a partir de la misma, neuroinflamación, excitotoxicidad y neurodegeneración a nivel dopaminérgico. Creada con BioRender.com, autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creado a partir de (Berthouzoz et al., 2023)

Se ha observado una relación directa entre la presencia de *H. pylori* y el desarrollo de sintomatología motora en pacientes con PD. Esto probablemente se explique por una reducción en la acidez gástrica secundario a la hipoclorhidria generada por esta bacteria al afectar las células parietales del estómago y favorecer así el desarrollo de la SIBO, así mismo, se ha observado una relación directa con el decremento de la L-dopa al unir dicha molécula directamente a su membrana externa, reduciendo así su biodisponibilidad. (Menozzi & Schapira, 2024)

Con relación a la PD, la disbiosis intestinal, los síntomas gastrointestinales y las alteraciones intestinales, aparecen de forma temprana con relación a la sintomatología motora de la enfermedad y está ligada directamente a neuroinflamación, así como alteraciones en la concentración de dopamina, serotonina y el metabolismo de la kinurenina a través del eje intestino cerebro. (Varesi et al., 2022)

Se ha demostrado en muestras fecales de pacientes que cursan con la PD un aumento en las concentraciones de patógenos oportunistas y taxonomías proinflamatorias que favorecen la aparición de la disfunción motora y están ligadas directamente a incrementos en la concentración de moléculas proinflamatorias y una disminución directa en la concentración de moléculas antiinflamatorias y taxonomías productoras de estas (Varesi et al., 2022).

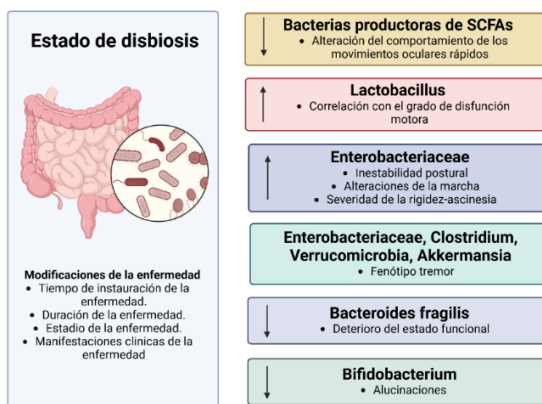


Ilustración 11. Cambios en el microbioma intestinal y su interrelación con la presencia de manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Parkinson. Creado con BioRender.com, autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creado a partir de (X. Zhang et al., 2023).

Se ha demostrado que la familia de los *Clostridium spp.* como componentes de la microbiota a nivel de la mucosa intestinal son importantes microorganismos que ayudan a la regulación inmunológica y favorecen la homeostasis de la barrera mucosa, así mismo, se ha evidenciado que sus metabolitos tienen actividades antiinflamatorias y que, a su vez, tienen la capacidad de inducir una elevación en los niveles de ocludina y claudina-5, favoreciendo a su vez, el restablecimiento de la barrera hematoencefálica. La literatura hace énfasis en que esta familia de bacterias tiene la capacidad de contribuir en la supresión de los procesos de autoinmunidad identificables en diferentes enfermedades que afectan al CNS, siendo estas

las más representativas en el modelo de disbiosis y autoinmunidad ligada a la Esclerosis Múltiple. (Rutsch et al., 2020)

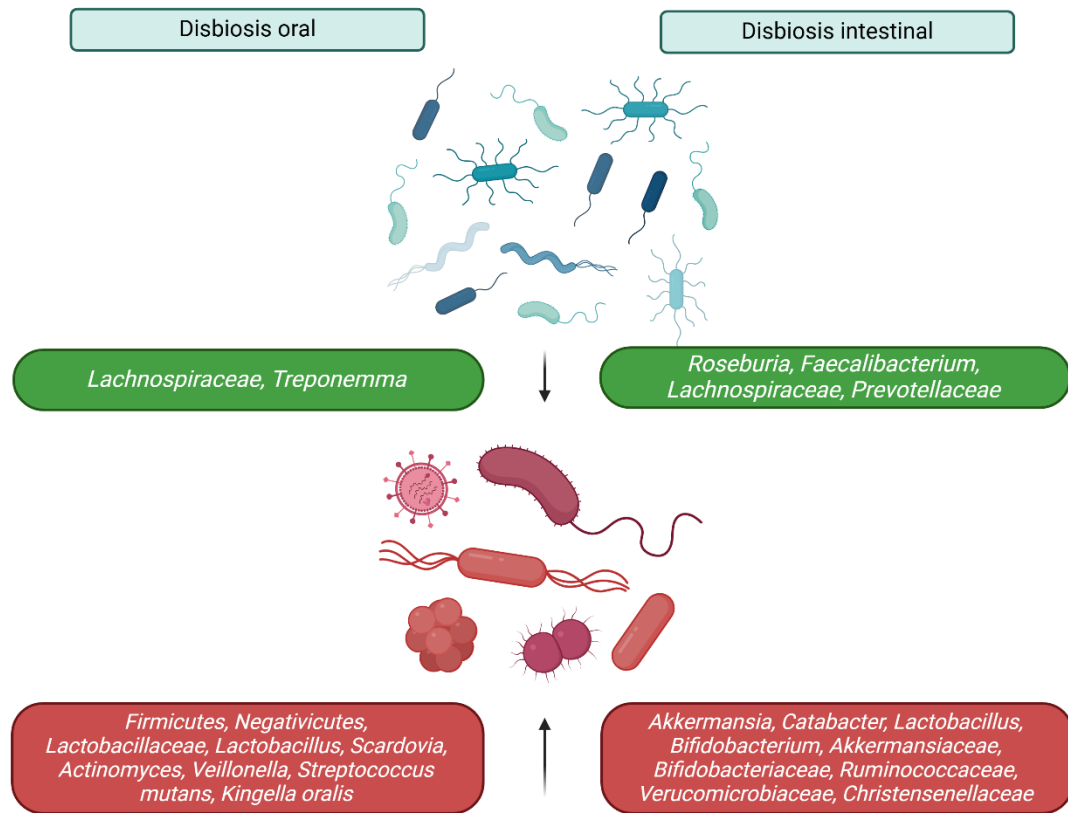


Ilustración 12. Composición microbiológica de la microbiota en sujetos con Enfermedad de Parkinson. Creado con Biorender.com, autoría: Juan Carlos Ferreira Alcántara (Berthouzoz et al., 2023)

Se ha descrito en la literatura, que existe una relación directa entre una disregulación en el proceso de maduración y respuesta inmunológica a nivel microglial y un estado de disbiosis, secundaria a una disrupción del proceso de señalización celular mediado por estos microorganismos. (Rutsch et al., 2020)

Algunos resultados de protocolizaciones sugieren que los metabolitos derivados de la digestión del triptófano por medio de las bacterias componentes de la microbiota a nivel intestinal activan la vía de señalización mediada por el receptor de aril hidrocarbonado (AhR por sus siglas en inglés) a nivel de los astrocitos y la microglía induciendo la activación de mecanismos de protección inmunitaria en el hospedador que son relevantes en la supresión de la inflamación a nivel de CNS, sobre todo, la regulación en los niveles de interleucina 10

(IL-10), tanto en modelos animales y con capacidad extrapolable al ser humano. (Rutsch et al., 2020)

Se ha observado que en pacientes que cursan con PD, existe un incremento en los niveles de marcadores gliales como la proteína acidófila fibrilar glial (GFAP por sus siglas al inglés) y Sox-10, los cuales se asocian directamente con un incremento de las citocinas proinflamatorias a nivel gastrointestinal (X. Zhang et al., 2023).

Activación del inflamosoma NLRP3 mediada por la microbiota intestinal

Los mecanismos relacionados entre la microbiota intestinal y la PD no han sido completamente dilucidados, y se ha observado que involucran varias vías que indirectamente favorecen la neurodegeneración dopaminérgica y con ello, las correspondientes disfunciones a nivel de CNS, la mayoría de ellas, centradas en la activación y desregulación de los procesos neuroinflamatorios (Ilustración 12, 13 y 14) (Wallen et al., 2022; Zhang et al., 2023)

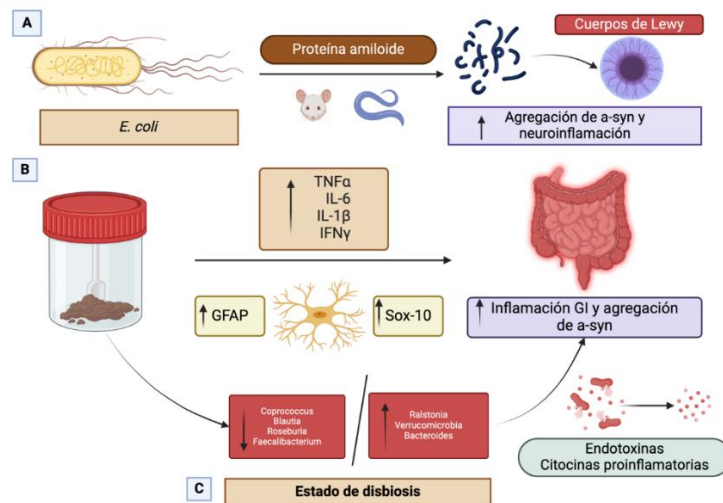


Ilustración 13. Figura 1: Interrelación entre la microbiota intestinal y el desarrollo de la PD. Apartado A: Proceso de formación de cuerpos de Lewy. Apartado B: Modificaciones biomoleculares presentes en muestras fecales de sujetos con PD. Apartado C: Relación entre disbiosis y desarrollo de la PD. Creado con BioRender.com, autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creado a partir de (X. Zhang et al., 2023).

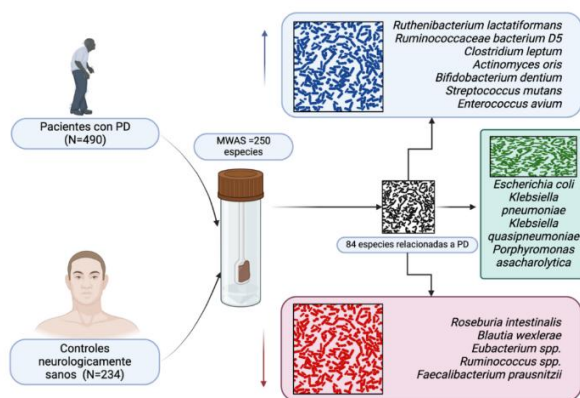


Ilustración 14. Representación esquemática de estudio tipo MWAS realizado por Wallen-ZD y cols. (2022) para determinar las relaciones metagenómicas existentes en pacientes con PD. El análisis del microbioma fecal en una cohorte de 724 sujetos identificó tres agrupaciones bacterianas clave asociadas a la patogenia de la enfermedad. El clúster azul exhibe un incremento de especies que inducen directamente la liberación de mediadores proinflamatorios intestinales. Por su parte, el clúster rojo evidencia una reducción drástica de bacterias productoras de AGCC, desencadenando estados inflamatorios, fuga intestinal y disrupción de la barrera hematoencefálica. Finalmente, el clúster verde resalta el aumento de patógenos oportunistas que elevan las concentraciones de LPS y citocinas, perpetuando la neuroinflamación severa tanto en el sistema nervioso entérico como en el central. Elaborado con BioRender.com, autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creado a partir de (Wallen et al., 2022).

Se ha demostrado que decrementos en los niveles de proteínas relacionadas a la formación de las uniones estrechas a nivel del colon, tales como la ocludina y la ZO-1 potencian la inflamación intestinal por medio de la activación del inflamósoma regulado por caspasa-1, activando así la vía de señalización dirigida a la síntesis de IL-1b y TNF-a, proceso relacionado con la PD. De igual manera se han observado altas concentraciones de marcadores de fuga intestinal, entre los que destacan la zonulina y la a1- anti-tripsina, así mismo, se han encontrado altas concentraciones de marcadores inflamatorios colónicos como calprotectina y lactoferrina en muestras fecales de pacientes que cursan con la PD. (Choi et al., 2018; Pan-Montojo et al., 2012; Qin et al., 2007; Rutsch et al., 2020; Varesi et al., 2022)

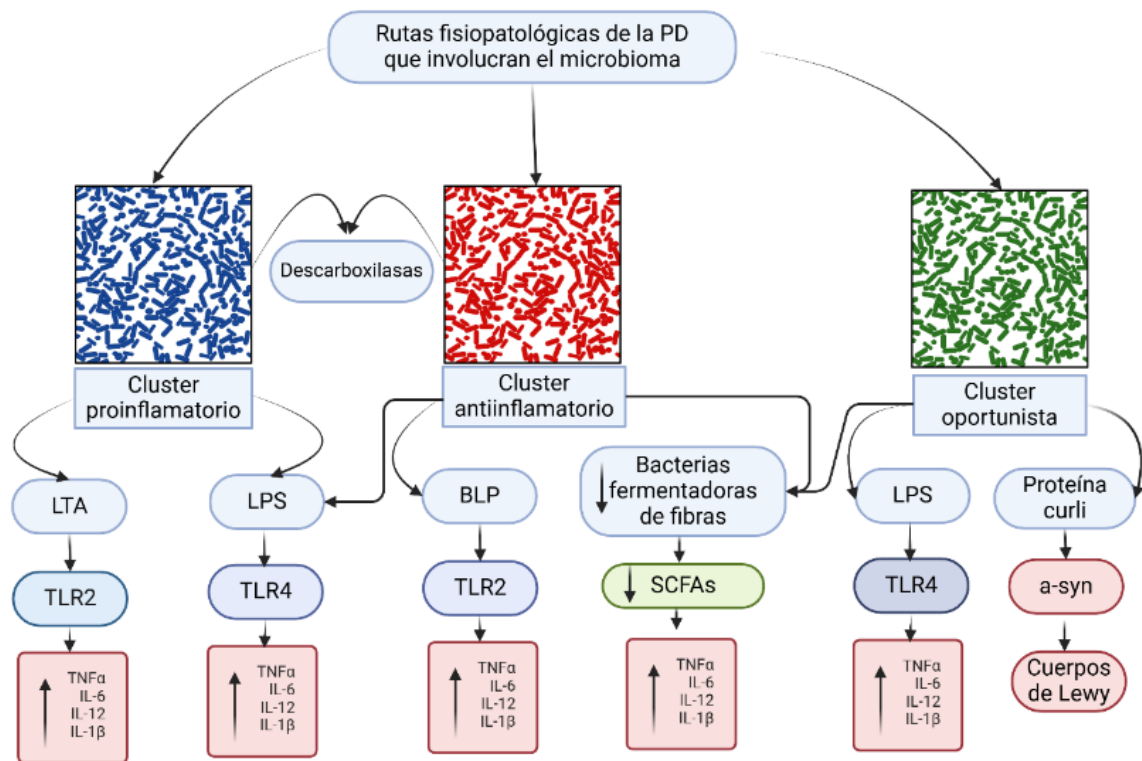


Ilustración 15. Interrelación del microbioma y las rutas fisiopatológicas implicadas en el desarrollo de la PD. El clúster bacteriano proinflamatorio activa la liberación de citocinas (como IL-1β, IL-18 y TNF-α) mediante la estimulación de los receptores TLR4 y TLR por endotoxinas como el LPS y LTA. Simultáneamente, la depleción del clúster antiinflamatorio disminuye los AGCC, provocando fuga intestinal e impidiendo la reparación de la barrera hematoencefálica, lo que permite la infiltración masiva de neurotoxinas al sistema nervioso central. A la par, el clúster oportunista exacerba esta inflamación y secreta proteínas (como la proteína curli de E. coli) que inducen directamente la agregación de α-sinucleína en Cuerpos de Lewy. La convergencia destructiva de estas tres vías perpetúa un estado crónico de neuroinflamación que destruye las conexiones sinápticas y culmina en la muerte irreversible de las neuronas dopaminérgicas. Creado con BioRender.com, autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creado a partir de (Wallen et al., 2022).

Se ha denotado una relación entre la activación del inflamosoma y los metabolitos generados a partir de la microbiota, de entre los que destacan la taurina, espermina e histamina, y que favorece el balance entre el mutualismo de la microbiota del hospedero y el grado de respuesta inflamatoria, demostrándose una vez más, que la microbiota juega un papel fundamental en el desarrollo de la inmunotolerancia y la autoinmunidad. Se ha observado que el inflamosoma tiene la capacidad de censar ácidos biliares producto del metabolismo de la microbiota e inducir su activación, favoreciendo así la producción de IL-18 en los diferentes inflamosomas. (Rutsch et al., 2020)

Los diferentes modelos experimentales han demostrado que el incremento en la permeabilidad y la acumulación de α -syn a nivel intestinal se correlaciona con niveles sanguíneos y cerebrales elevados de TLR2 y TLR4 y una reducción en los niveles de proteína de unión a LPS en pacientes que cursan con PD. El incremento en la expresión de TLR4 se ha relacionado con disbiosis, inflamación intestinal, disrupción de la barrera intestinal, translocación bacteriana, activación microglial y neurodegeneración, y así mismo, se ha demostrado que los pacientes que cursan con PD presentan una expresión elevada de TLR4 en biopsias de colon. (Socała et al., 2021)

El TLR2 es activado a partir de productos microbianos tales como LPS, peptidoglucanos y amiloide bacteriano por medio de la vía TLR2/MyD88/NF- κ B. La activación de la vía del TLR2 se asocia a un incremento en la concentración de citocinas proinflamatorias a nivel cerebral, incremento del reclutamiento microglial y amplificación de la neuroinflamación y expresión de la α -syn. Al contrario, se han observado altas concentraciones de TLR4 a nivel intestinal, y este actúa reconociendo LPS de bacterias Gramnegativas, así como a químicos endógenos que actúan como inmunomoduladores y reducen la concentración de citocinas proinflamatorias. El TLR4 es crucial para la clarificación de la α -syn y se asocia a respuesta celular microglial (Ilustración 15) (Kaur et al., 2020; Zhang et al., 2023).

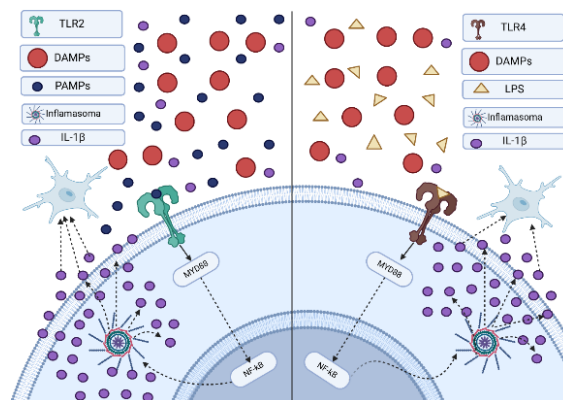


Ilustración 16. Mecanismos y vías de señalización de los receptores tipo TOLL 2 y 4, y sus implicaciones en los fenómenos de neuroinflamación y activación microglial. La ilustración a la izquierda muestra las vías de señalización reguladas por el TLR2 en el proceso de activación de la neuroglia y activación del inflammasoma. A la izquierda, se muestra la activación del TLR4 a partir de su unión a LPS y su implicación en las vías de lesión neuronal. Creado con BioRender.com, Autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creado a partir de (X. Zhang et al., 2023).

En otros modelos experimentales, se ha observado que la suplementación oral repetida de *Proteus mirabilis* o su derivado de LPS a modelos murinos previamente tratados con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP por sus siglas en inglés) o en ratones jóvenes, es suficiente para inducir un fenotipo de enfermedad PD-like (enfermedad similar a PD), con la presencia de déficit motor, pérdida de neuronas dopaminérgicas a nivel de la sustancia nigra, inflamación a nivel de cerebro e intestino, así como disrupción de la barrera epitelial del intestino, secundario a la desregulación de la síntesis de ocludina, favoreciendo así la formación de inclusiones de a-syn a nivel cerebral y de colon. (Choi et al., 2018; Rutsch et al., 2020)

TMAO es un metabolito derivado del metabolismo microbiano de la L- carnitina y colina. Se ha descrito que dicho metabolito comprende un disruptor de la BBB y a su vez, altera la actividad del inflamosoma NLRP3, contribuyendo a los procesos neuroinflamatorios que rodean a la PD. A su vez, se ha demostrado que estimula a la formación de polímeros de a-syn, induce estrés oxidativo, senescencia neuronal y defectos sinápticos. Se ha descrito una asociación directa entre TMAO y un deterioro de la función motora y progresión de fenotipos a PD-demencia (Ilustración 17). (Le et al., n.d.; Zhang et al., 2023)

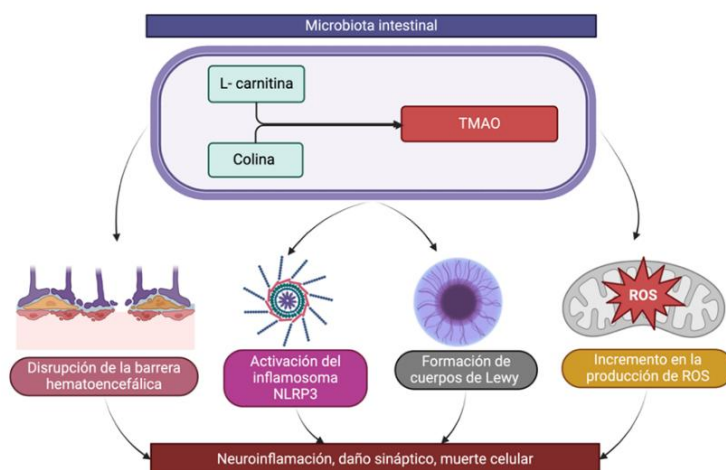


Ilustración 17. Vía metabólica del TMAO y sus implicaciones en el desarrollo de la PD y otras enfermedades neurodegenerativas.

Creado con BioRender.com, autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creado a partir de (Zhang et al., 2023)

Panorama futuro de la terapéutica de la PD

Los avances terapéuticos relacionados al manejo de la PD se han redireccionado a las terapias microbiológicas, mediante el empleo de probióticos, prebióticos y su sinergia a forma de simbióticos. Así mismo, se ha observado que el empleo de trasplante fecal es útil en pacientes con PD (Ilustración 18). (Cheng et al., 2023; Jia et al., 2023; Zhang et al., 2023; Zhu et al., 2022).

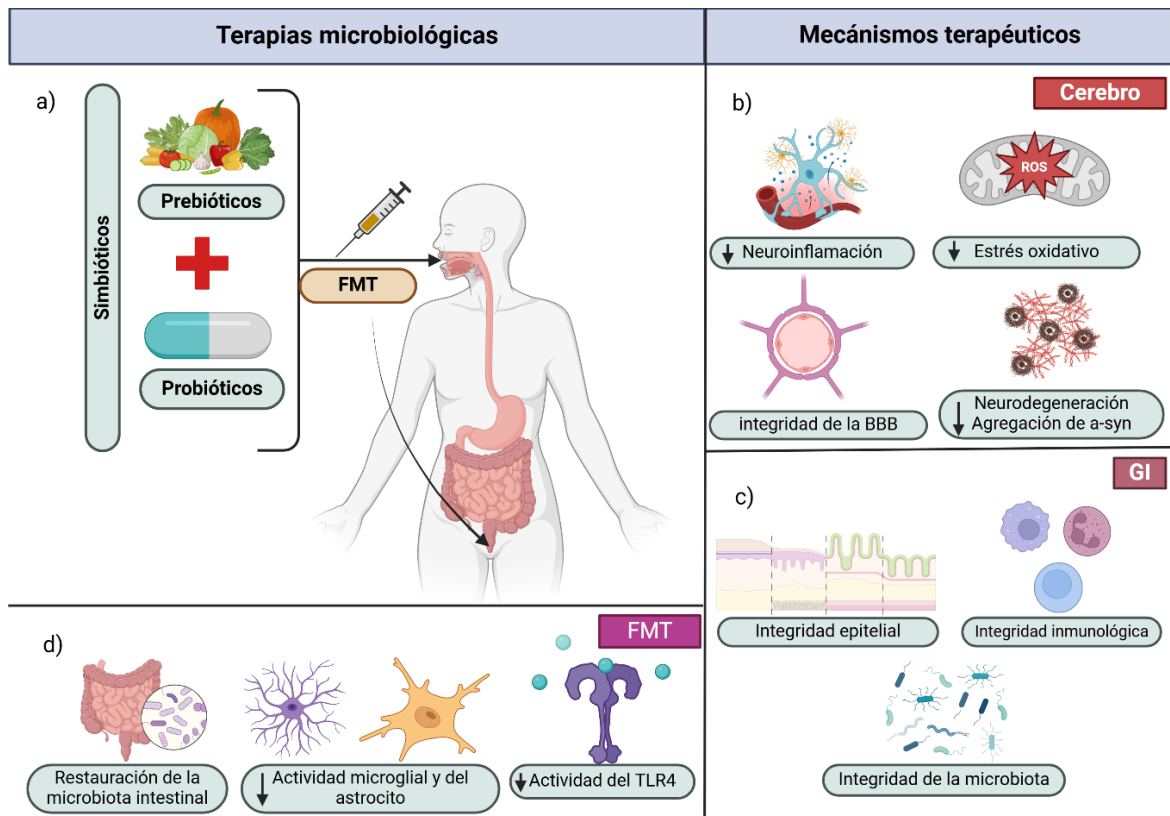


Ilustración 18. Terapias microbiológicas y sus mecanismos terapéuticos en la PD. El uso de probióticos, simbióticos y trasplante fecal (A) ejerce un **efecto neuroprotector** al disminuir la neuroinflamación, el estrés oxidativo y la muerte de células dopaminérgicas a nivel cerebral (B). A nivel gastrointestinal, estas terapias **restauran la integridad epitelial y la microbiota**, frenando la fuga intestinal, la migración de citocinas y la agregación local de -sinucleína (C). Esta restauración del microambiente intestinal disminuye la activación neuroglial al **inhibir potentes vías proinflamatorias** mediadas por el TLR4, LPS y TNF- (D). En conjunto, estas intervenciones logran **retrasar la progresión y mejorar significativamente** tanto los síntomas neuromotores como los gastrointestinales en los pacientes afectados. Creado con BioRender.com, autoría de Juan Carlos Ferreira Alcántara. Creado a partir de (Varesi et al., 2022; Zhang et al., 2023).

Hipótesis

H₁: La suplementación de un medio rico en metabolitos derivados de la microbiota intestinal en cultivos celulares de células RAW 264.7 mostrará diferencias en el grado de actividad del inflamosoma NLRP3 relacionado a la Enfermedad de Parkinson.

H₁: La suplementación de un medio rico en citocinas en cultivos celulares de neuroblastoma de estirpe SK-N-SH mostrará diferencias en el grado de viabilidad celular asociado a procesos de neurodegeneración regulados por inflamosoma NLRP3 implicado en la enfermedad de Parkinson ($p < 0.05$).

Objetivos

Objetivo general:

Evaluar el efecto de metabolitos derivados de la microbiota intestinal sobre la respuesta del inflamosoma NLRP3 en un modelo de neurodegeneración celular asociado a la Enfermedad de Parkinson.

Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto citotóxico o citoprotector de metabolitos bacterianos derivados de la microbiota intestinal sobre la viabilidad celular en un modelo de neurodegeneración asociado a la enfermedad de Parkinson en el contexto de la señalización inflamatoria mediada por el Inflamosoma NLRP3 mediante ensayos colorimétricos con MTS.
2. Evaluar la viabilidad celular de la línea de neuroblastoma humano SK-N-SH expuesta a medios condicionados derivados de macrófagos RAW 264.7 estimulados con metabolitos bacterianos y cotratamientos con ácidos grasos de cadena corta.
3. Analizar posibles vías de señalización reguladas por los metabolitos microbianos a estudiar dirigidas a la regulación de la actividad del Inflamosoma NLRP3 asociado a la Enfermedad de Parkinson a través de modelos de acoplamiento molecular y

señalización metabólica a través de afinidad de unión y perfiles de interacción ligando-receptor.

4. Identificar posibles mecanismos relacionados al transporte de metabolitos microbianos implicados en la activación del Inflamosoma NLRP3 en Enfermedad de Parkinson a través de la barrera hematoencefálica por medio de modelos bioinformáticos.

Materiales y Métodos o Metodología

Diseño.

Para el desarrollo del presente trabajo se llevó a cabo un estudio experimental, prospectivo, analítico, controlado en modelos celulares.

III.1.1. Definición del universo.

Para los procesos experimentales se llevó a cabo el cultivo, crecimiento y mantenimiento de células de tanto de estirpe celular monocítico-macrofágicas RAW 264.7 como neuroblastoma humano SK-N-SH inmortalizado bajo condiciones estandarizadas de cultivo celular

III.1.2. Tamaño de las muestras.

Con el objetivo de llevar a cabo un modelo experimental controlado en medios celulares, no se llevó a cabo ningún tipo de muestreo. El desarrollo de las pruebas experimentales se realizó por triplicado para obtener una mejor potencia estadística de los resultados, incrementar la fiabilidad del estudio y reducir error por variabilidad intra observador y por muestra (Celentano & Szklo, 2020; Argimon Pallás & Jiménez, 2019; Villa Romero & Moreno 2012).

III.1.3. Definición de las unidades de observación.

Células de estirpe celular monocítico-macrofágicas RAW 264.7 bajo condiciones estandarizadas de cultivo celular.

Células SK-N-SH derivadas de estirpe celular de neuroblastoma inmortalizado bajo condiciones estandarizadas de cultivo celular.

III.1.4. Definición del grupo control.

Durante los procesos experimental se emplearon células de estirpe celular monocítico-macrofágicas RAW 264.7 bajo condiciones estandarizadas de cultivo celular inducidas facultativamente con lipopolisacárido de *P. Mirabilis* a concentración estandarizada de 100 µg y bajo incubación a 37°C, atmosfera húmeda al 95% y concentración de CO₂ al 5% durante 3 horas para llevar a cabo la activación basal del inflamosoma NLRP3 así como Células SK-N-SH derivadas de estirpe celular de neuroblastoma inmortalizado bajo las mismas condiciones de inducción de inflamosoma NLRP3.

III.1.5. Criterios de inclusión.

Para el desarrollo del estudio se incluyeron todos aquellos cultivos celulares que cumplieron con las siguientes características:

1. Aquellos cultivos constituidos exclusivamente por células monocítico-macrofágicas con estirpe RAW 264.7.
2. Aquellos cultivos constituidos exclusivamente por células de neuroblastoma inmortalizado con estirpe SK-N-SH.
3. Condiciones estandarizadas del cultivo en base al inserto de conservación de células monocítico-macrofágicas RAW 264.7.
4. Condiciones estandarizadas del cultivo en base al inserto de conservación y preservación de células SK-N-SH.

III.1.6. Criterios de exclusión.

así mismo se excluyeron del estudio todos aquellos cultivos celulares que:

1. No se encontrarán estrictamente constituidos por células monocítico-macrofágicas RAW 264.7.

2. No se encontrarán estrictamente constituidos por células de neuroblastoma inmortalizado con estirpe SK-N-SH.
3. Que no cumplieron con las condiciones estandarizadas en base al inserto de conservación de células monocítico-macrofágicas RAW 264.7.
4. Que no cumplieron con las condiciones estandarizadas en base al inserto de conservación de células SK-N-SH.

III.1.7. Criterios de eliminación.

A su vez, se eliminaron todos aquellos cultivos que:

1. No se encontrarán estrictamente constituidos por células monocítico-macrofágicas RAW 264.7 o se encontrarán bajo estado de contaminación microbiológica.
2. No se encontrarán estrictamente constituidos por células de neuroblastoma inmortalizado con estirpe SK-N-SH o se encontrarán bajo estado de contaminación microbiológica.
3. No cumplieron con las condiciones estandarizadas en base al inserto de conservación de células monocítico-macrofágicas RAW 264.7.
4. No cumplieron con las condiciones estandarizadas en base al inserto de conservación de células SK-N-SH.

III.1.8. Definición de variables y unidades de medida.

Nombre de la variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medida	Unidad de medida
Metabolitos de la	Sustancia metabólica-mente activa producto del	Compuesto orgánico	Cuantitativa	Continua	µg/ml

microbiota intestinal	metabolismo microbiano, que puede ser usado por el organismo hospedador. Pueden ser productos energéticos, factores tróficos, neuromoduladores, neuroestimuladores o sustancias tóxicas.				
Macrófagos RAW264.7	Célula constitutiva del sistema inmune innato, dirigidas a la homeostasis inflamatoria y control de infecciones. En específico, esta estirpe celular	Células sanguíneas que pertenecen a una subpoblación de leucocitos denominado sistema de fagocitos	Cuantitativa	Intervalo	Cél/ml

	es derivada de las células monocítico-macrofágicas	mononucleares			
Células SK-N-SH	Línea celular immortalizada de neuroblastoma originada de la estirpe celular SK-N-SH, las cuales muestran actividad dopaminérgica B-hidroxilasa	Células neuronales que pertenecen a la estirpe SK-N-SH	Cuantitativa	Intervalo	Cél/ml
Citocinas proinflamatorias.	Moléculas de señalización derivadas de células del sistema inmune adaptativo, que coordinan la respuesta inflamatoria promoviendo la comunicación	Proteína que regula el sistema inmunitario y la inflamación.	Cuantitativa	Discreta	Copias/ml

	y activación celular.				
Lipopolisacáridos	Componente anfipático glucóconjugado con dominio lipídico unido a un centro de oligosacáridos y un polisacárido distal, componentes de la membrana celular externa de bacterias Gramnegativas .	Endotoxina componente de la membrana externa de bacterias Gram negativas, activador del sistema inmunológico	Cuantitativa	Discreta	ng/dl
Ácidos grasos de cadena corta.	Aquellos ácidos grasos cuyas cadenas se componen de menos de 10 carbonos y que son producto de la fermentación	Molécula bioactiva que se obtiene de la fermentación de la fibra dietética en el intestino grueso por	Cuantitativa	continua	mg/dl

	de fibras por bacterias componentes de la microbiota intestinal.	actividad de la microbiota.			
--	--	-----------------------------	--	--	--

III.1.9. Selección de las fuentes, métodos, técnicas y recolección de la información.

III.1.9.1. Selección de las fuentes

Se llevó a cabo una revisión sistemática y exhaustiva de las diferentes bibliografías internacionales por medio de las plataformas digitales Pubmed, Elsevier, Ovid, y de diferentes tomos de especialidad de amplio reconocimiento a nivel mundial. El manejo de la información se llevó a cabo mediante el empleo del paquete de aplicaciones Microsoft Office, para el desarrollo de una base de datos y la recolección de datos derivados de los procesamientos de la actividad metabólica y actividad neuroinmunoendocrina de los diferentes cultivos celulares empleados durante el desarrollo del proyecto. El procesamiento de la información estadística se recuperó a partir de una base de datos elaborada en la aplicación Excel, la información estadística recabada a partir de resultados en cultivos se procesó a partir del paquete estadístico SPSS. Se llevó a cabo el análisis de los datos recabados para determinar si la muestra era de carácter paramétrica o no paramétrica mediante instrumentos de determinación de la normalidad de datos. Se llevó a cabo el cálculo de media, varianza y desviación estándar con intervalo de confianza para variables cuantitativas. El análisis comparativo se realizó mediante análisis de varianza de variables múltiples PERMANOVA para variables cuantitativas y se evaluó la diferencia significativa entre grupos a partir de análisis con pruebas Pos Hoc, empleando principalmente Tukey. La presentación estadística final se llevó a cabo mediante cuadros y gráficas.

III.1.9.2. Métodos y técnicas.

Etapas I. Desarrollo de cultivos celulares.

El cultivo de células macrofágicas RAW 264.7 se llevó a cabo mediante las instrucciones del inserto del vendedor sembrándose en medio de cultivo DMEM, Glucosa, w: 1 g/L, Glutamina estable w: 4 mM, w 3,7 g/L NaHCO₃ suplementado con un 10% de FBS. Para el subcultivo de las células se llevó a cabo la suspensión de estas en un tubo de 15 mL y se lavó suavemente las células adherentes con PBS sin calcio ni magnesio. Se llevó a cabo disgregación celular por técnicas mecánicas mediante empleo de rastrillo celular, mediante presión constante para asegurar la separación de las células. Se llevó a cabo resuspensión celular en 3 mL de medio suplementado y se llevó a cabo la centrifugación celular a 300xg durante 5 a 7 minutos. Posterior a la centrifugación se suspendió cuidadosamente el sedimento celular posterior decantación y se transfirió la resuspensión celular a matraces de cultivo celular de 25 cm² y 75 cm² que contenían medio fresco. El fluido de suspensión celular se sustituyó 2 a 3 veces por semana según lo indicado en el inserto de cultivo. Para la detección de esterilidad del cultivo se llevó a cabo ensayos basados en visualización microscópica para garantizar la ausencia de contaminación bacteriana, fúngica o por levaduras, los cultivos celulares se sometieron a inspecciones visuales diarias (Mac Sweeney et al., 2024).

El cultivo de células SK-N-SH se llevó a cabo mediante las instrucciones del inserto del proveedor, sembrándose en medio de cultivo DMEM y F12 de Ham en una proporción 50:50 complementado con 15% de FBS. El subcultivo se realizará mediante retiro de medio con las células flotantes y se recuperó las células por centrifugación a 300xg por 5 a 7 minutos. Se enjuagaron las células adherentes con PBS sin calcio ni magnesio. Se añadió Tripsina/EDTA®, hasta que la lámina celular se cubrió completamente. Se incubaron a 37°C durante 10 a 20 minutos. Se sembraron las células adherentes y flotantes en matraces de cultivo de 25 cm² y 75 cm² de manera separada para asilar células de fenotipo neuroblástico (N) y epitelial (S), se adicionó medio enriquecido hasta alcanzar un volumen de 10 mL. El fluido de suspensión celular se sustituyó 1 a 2 veces por semana según lo indicado en el

inserto de cultivo. Para la detección de esterilidad del cultivo se llevó a cabo ensayos basados en visualización microscópica para garantizar la ausencia de contaminación bacteriana, fúngica o por levaduras, los cultivos celulares se sometieron a inspecciones visuales diarias (Holtkamp et al., 2019).

Etapla II. Formación de medio rico en metabolitos bacterianos.

Se llevó a cabo una preparación de Caspasa-1 basados en el inserto del vendedor, para adicionar cuatro diferentes concentraciones a 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml y 500 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA) a las placas de cultivo celular de células macrofágicas RAW 264.7, incubándose por 12 horas para establecer el grupo control con actividad constitutiva del inflamósoma NLRP3. Se llevará a cabo la recuperación del líquido de suspensión celular y se administrará a los cultivos de células inmortalizadas de neuroblastoma SK-N-SH para cuantificar el grado de neurodegeneración de estas células. (Qiao et al., 2020)

Se llevó a cabo una preparación de SCFAs basados en el inserto del vendedor, para adicionar cuatro diferentes concentraciones a 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml y 500 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA) de estos a las placas de cultivo de células macrofágicas RAW 264.7, incubándose por 2 horas basado en experimentos previamente reportados. Se llevará a cabo la recuperación del líquido de suspensión celular y se administró a los cultivos de células inmortalizadas de neuroblastoma SK-N-SH para cuantificar el grado de neurodegeneración de estas células. (Qiao et al., 2020)

En el modelo experimental con LPS de *P. mirabilis*, se añadieron 100 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA) en base al protocolo de preparación del inserto del vendedor en las placas de cultivo celular previamente tratadas e incubadas con SCFAs, se llevó a cabo una segunda incubación de 12 horas. Se añadió la misma concentración de SCFAs al grupo control. Se llevó a cabo la recuperación del líquido de suspensión celular y se administró a los cultivos de células inmortalizadas de neuroblastoma SK-N-SH para cuantificar el grado de neurodegeneración de estas células. (Qiao et al., 2020)

En el modelo experimental con LPS de *A. muciniphila*, se añadieron 100 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA) en base al protocolo de preparación del inserto del vendedor en las placas de

cultivo celular previamente tratadas e incubadas con SCFAs, se llevó a cabo una segunda incubación de 12 horas. Se añadió la misma concentración de SCFAs al grupo control. Se llevó a cabo la recuperación del líquido de suspensión celular y se administró a los cultivos de células inmortalizadas de neuroblastoma SK-N-SH para cuantificar el grado de neurodegeneración de estas células. (Qiao et al., 2020)

Se llevó cabo la preparación de cultivos celulares con células macrofágicas RAW 264.7 bajo cuatro diferentes concentraciones de SCFAs a 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml y 500 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA) de estos a las placas de cultivo celular de células macrofágicas RAW 264.7, incubándose por 2 horas. Se realizará una preparación con Caspasa-1 basados en el inserto del vendedor, para adicionar cuatro diferentes concentraciones a 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml y 500 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA) de estos a las placas de cultivo celular de células macrofágicas RAW 264.7, previamente incubadas con SCFAs por 12 horas, incubándose por 12 horas. Concentraciones similares se administraron en el grupo control. Se llevó a cabo la recuperación del líquido de suspensión celular y se administró a los cultivos de células inmortalizadas de neuroblastoma SK-N-SH para cuantificar el grado de neurodegeneración de estas células. (Qiao et al., 2020)

Se llevó a cabo la preparación de cultivos celulares de células macrofágicas RAW 264.7 bajo cuatro diferentes concentraciones de SCFAs a 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml y 500 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA) de estos a las placas de cultivo celular de células macrofágicas RAW 264.7, incubándose por 2 horas. Se realizó una preparación con cadaverina basados en el inserto del vendedor, para adicionar cuatro diferentes concentraciones a 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml y 500 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA) de estos a las placas de cultivo celular de células macrofágicas RAW 264.7, previamente incubadas con SCFAs por 2 horas, incubándose por 12 horas. Concentraciones similares se administraron en el grupo control. Se llevó a cabo la recuperación del líquido de suspensión celular y se administró a los cultivos de células inmortalizadas de neuroblastoma SK-N-SH para cuantificar el grado de neurodegeneración de estas células. (Qiao et al., 2020)

Se llevó a cabo la preparación de cultivos celulares de células macrofágicas RAW 264.7 con cuatro diferentes concentraciones de SCFAs a 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml y 500 µg/ml

(Sigma-Aldrich, USA) de estos a las placas de cultivo celular de células macrofágicas RAW 264.7, incubándose por 2 horas. Se realizó una preparación con TMAO basados en el inserto del vendedor, para adicionar cuatro diferentes concentraciones a 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml y 500 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA) de estos a las placas de cultivo celular de células macrofágicas RAW 264.7, previamente incubadas con SCFAs por 2 horas, incubándose por 12 horas. Concentraciones similares serán administradas en el grupo control. Se llevó a cabo la recuperación del líquido de suspensión celular y se administró a los cultivos de células inmortalizadas de neuroblastoma SK-N-SH para cuantificar el grado de neurodegeneración de estas células. (Qiao et al., 2020)

Etapas III. Identificación de viabilidad celular en cultivo de células de neuroblastoma estirpe SK-N-SH inmortalizado inducidas a protocolo de excitotoxicidad mediado por citocinas mediante técnicas colorimétricas.

Se llevó a cabo el análisis de viabilidad por medio de método colorimétrico a partir de reactivo CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega) a partir de cultivo de células de neuroblastoma de estirpe SK-N-SH inmortalizado posterior a ensayo de citotoxicidad con medio de cultivo rico en citocinas proinflamatorias aislado de medio de cultivo de células monocítico-macrofágicas de estirpe RAW 264.7. Se llevó a cabo el aislamiento de 100 µl de medio de cultivo en placas de 96 pozos, posteriormente, se añadirán 20 µl del reactivo por pozo y se incubaron a 37° C por 1 a 4 horas, bajo medio húmedo y CO₂ atmosférico al 5%, posteriormente se llevó a cabo la medición espectrofotométrica de la solución a un rango de onda de 490 nm usando un lector de placa (Mosmann T., 1983).

Etapas IV. Diseño de modelos de acoplamiento molecular (modelos *in silico*) e integración de vías de señalización relacionadas a la regulación de la actividad del Inflamosoma NLRP3.

El acoplamiento molecular fue realizado mediante el uso del software desarrollado por Discovery Studio, donde se acoplaron las estructuras tridimensionales de los diferentes metabolitos de interés previamente señalados, y receptores y proteínas acopladas a las vías de receptores similares a NOD y vías descritas en KEGG para el estudio de enfermedades

neurodegenerativas, enfocándonos en las vías asociadas a la Enfermedad de Parkinson. Posteriormente a través de este software de Biovia se llevo a cabo el acoplamiento del ligando con el receptor de interés y se evaluó el grado de afinidad mediante energía libre de Gibbs expresada en kcal/mol a través de la plataforma electrónica SwissDock y Autodock Vina el cual simuló y minimizó el número de posibles interacciones máximas entre receptor ligando. Se llevó a cabo el ajuste de ensayo para teorización de 64 modelos posibles para reducir la tasa de falsos positivos y falsos negativos del acoplamiento y se llevó a cabo el análisis estadístico con cálculo de media y desviaciones estándar a través del programa Graph Math Prisma 8.0 y Python.

Etapas V. Análisis estadístico

El análisis estadístico y los gráficos se realizaron con ayuda del programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA), el programa SPSS (IBM, Statistics 24.0) y el programa R (GNU, R Development Core Team), así como ImageJ FIJI (General Public License). A todos los datos obtenidos se les aplicó la prueba de D'Angosino-Person para determinar si los datos se distribuyeron de forma Gaussiana. Para los datos normales se aplicaron pruebas t de Student para pares de muestras o Análisis de Varianza (ANOVA) de una o dos vías o pruebas no paramétricas equivalentes según sea el caso. Los datos paramétricos se presentaron con el promedio $\pm$ la desviación o error estándar de la media (SEM). Los datos no paramétricos se presentaron como la mediana y el rango intercuartil. Se indicaron las condiciones estadísticamente solo cuando son diferentes del control: * $p < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; ns, no significativo.

III.1.10. Prueba piloto.

No aplica.

III.1.11. Definición del plan de procesamiento y definición de la información.

Con los resultados de las variables se elaborará una base electrónica en Excel Windows o Access Windows para su posterior análisis estadístico en el programa SPSS, R y GraphPad Prism 7. El análisis de descomposición fotográfica se llevará a cabo a través de

programas de procesamiento de imagen FIJI. Los resultados serán presentados en gráficas, y en un cuadro las variables que se estudiaron.

III.1.12. Consideraciones éticas.

Se llevará a cabo el sometimiento del presente protocolo de investigación ante los Organismos evaluadores de Investigación y Bioética correspondientes dentro de la Universidad Autónoma de Querétaro, para posteriormente llevar su sometimiento frente a consejo académico.

El presente proyecto se apegará al Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la Salud, lo cual se describe en su Título Quinto, Capítulo Único, artículo 100, así como su Título Cuarto, capítulo 1 en materia de Bioseguridad de las Investigaciones. así mismo se considerarán los principios éticos expuestos por la declaración de Helsinki y Nuremberg en materia de investigación con Seres Humanos.

Dado que el presente proyecto se efectuará a través de líneas celulares estandarizadas y comercializadas internacionalmente, no se llevará intervención directa sobre seres humanos, y se enfocará directamente a la búsqueda y explicación de vías moleculares inflamatorias a través de metabolitos comercializados y depurados internacionalmente. Por tal motivo, no se llevará a cabo la recolección de sentimientos por consentimiento informado al no existir población humana en este estudio.

Se llevará a cabo la formulación clara del protocolo experimental donde se desarrollen *in extenso* los objetivos y marco metodológico de la presente investigación para su posterior sometimiento a evaluación por parte de un comité de evaluación ética independiente al investigador en base a lo suscrito en la declaración de Helsinki. El comité tendrá derecho de controlar los ensayos en curso, mientras que el investigador tiene la obligación de proporcionar información de control al comité evaluador según lo suscrito en la declaración previamente mencionada.

En relación con la normatividad de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud, según lo determinado por el Título Segundo, Capítulo 1, Artículo 17, la presente

investigación deberá ser considerada con Investigación sin riesgo para los seres humanos, debido a que las líneas empleadas en este protocolo son líneas celulares estandarizadas comercializadas obtenidas a partir de modelo murino, por lo que no se llevará a cabo ninguna intervención en humanos.

Se llevará a cabo el seguimiento de las normas internacionales de trabajo en laboratorios de cultivo celular con nivel de bioseguridad grado 1 y 2, siguiendo las practicas adecuadas de lavado e higiene de manos, antes, durante y posterior a los procesos experimentales, uso de uñas de manos cortas y limpias, uso de ropa protectora a riesgo de salpicaduras, uso de cabello corto y recogido, así como el uso de calzado cerrado con suela antiderrapante, esto con el objetivo de minimizar el riesgo de contaminación biológica tanto de los cultivos empleados como del personal de investigación dentro de las instalaciones de laboratorio.

Se llevará a cabo el uso de material estéril dentro de las instalaciones, aperturando los materiales dentro de la campana de cultivo de flujo laminar o a la llama de mechero de Bunsen para evitar contaminación de las instalaciones, cultivos y personal de la instalación. En caso de existir evidencia o sospecha de contaminación se llevará a cabo la notificación correspondiente al responsable de laboratorio con el objetivo de disminuir la trascendencia de dicha contaminación a otros usuarios del laboratorio.

Se llevará a cabo el uso obligatorio de equipo de protección entre los que se incluyen guantes, gafas protectoras y bata de uso exclusivo para el laboratorio de cultivo celular, con el fin de reducir el riesgo de contaminación biológica.

Se llevará a cabo la inactivación de todo material biológicos o material de laboratorio que haya estado en contacto con este a través del uso de hipoclorito, previo a su dispensación. En caso de tratarse de material que se dispondrá a lavado, de igual manera será inactivado con hipoclorito para su posterior proceso de lavado y esterilización.

Se llevará a cabo el marcado y rotulado de todos los materiales, reactivos y soluciones empleadas durante el proceso de cultivo para evitar errores de procesamiento experimental o riesgo de accidentes por compuestos químicos.

La gestión de residuos biológicos potencialmente infecciosos se llevará a cabo a través de las directrices señaladas en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental – Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos – Clasificación y especificaciones de manejo.

Las áreas de trabajo y cuartos de cultivo celular se encuentran dotadas de un cubo de residuos con bolsa negra para el depósito de residuos comunes y contenedores con bolsa roja para materiales contaminados con restos biológicos como placas, pipetas y contenedores rojos para el depósito de punzocortantes. Todos los contenedores presentan una localización específica dentro de las áreas de trabajo para su rápida identificación y fácil acceso. Se evitará la acumulación de residuos en cualquier otra área de las salas designadas de trabajo. Una vez alcanzado el 80% de la capacidad de los contenedores se cerrará y sellará la bolsa roja. En el caso de generar residuos líquidos estos serán desechados en bidones rojos a una capacidad máxima del 80%.

El valor social de la presente investigación se centra en los principios de medicina traslacional, a partir del estudio de diferentes vías fisiopatológicas involucradas en el desarrollo de la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente a nivel mundial, la cual permitirá comprender los fenómenos inmunológicos mediados por diferentes componentes metabólicos derivados de la microbiota intestinal en un modelo de neurodegeneración celular *in vitro* con el fin de comprender la interacción del eje microbioma-intestino-cerebro y así, identificar nuevas dianas terapéuticas asociadas a la enfermedad de Parkinson y así mismo, tras conocer el efecto de la microbiota intestinal en los procesos inflamatorios relacionados, favorecer el desarrollo de terapias coadyuvantes a base de psicobióticos en trabajos posteriores para la mejora de la salud humana y calidad de vida, buscando así la reducción en la progresión de la enfermedad, disminución de los días de vida asociados a discapacidad, y complicaciones relacionadas a la progresión de la misma.

Así mismo, se considera que el presente protocolo cuanta con la pertinencia y rigor científico correspondiente ya que se establecen procedimientos estandarizados bajo diferentes técnicas experimentales, se respeta la integridad bioética de las especies al no hacer intervenciones sobre humanos y otros animales y a su vez, permite comprender en modelos no invasivos y

reproducibles y replicables, estandarizados los procesos fisiopatológicos de las enfermedades neurodegenerativas sin hacer abordajes invasivos que requieran de estudios histopatológicos o procesos neuroquirúrgicos para obtención de muestras.

La información recolectada a lo largo del proyecto se vaciará en una base de datos en formato Excel, la cual estará bajo resguardo del investigador Principal protegida a través de contraseñas electrónicas. Así mismo el análisis estadístico será llevado a cabo por estudiantes capacitados en el área de bioestadística, a través de diferentes paquetes estadísticos estandarizados y regulados, siendo supervisados por el Investigador principal y colaboradores, expertos en el área.

Resultados y discusión

Con el objetivo de elucidar el efecto de los metabolitos derivados del microbioma intestinal y su efecto sobre la respuesta del Inflamosoma NLRP3 en un modelo de neurodegeneración celular asociado a la Enfermedad de Parkinson, se llevaron a cabo múltiples ensayos de inducción de actividad del Inflamosoma NLRP3, mediante sensibilización con LPS de *P. mirabilis* y *A. muciniphila*, los cuales favorecen el paso de censado mediado por subcomplejo NLRP3 a partir de señalización mediada por receptores tipo Toll; desacoplamiento de membrana a través de Caspasa-1, intermediario final para el inicio de los procesos de piroptosis mediados por Inflamosoma NLRP3, implicado en la activación de IL-1 β e IL-18, así como la monomerización de Gasdermina D, proteína estabilizadora de membrana que al monomerizarse favorece el desarrollo de poros de membrana para eflujo masivo de citocinas proinflamatorias activadas; cadaverina, diamina que favorece el desacoplamiento de canales iónicos a nivel de la membrana celular permitiendo eflujo de potasio masivo hacia el espacio extracelular, favoreciendo el paso de acoplamiento y funcionalización del complejo de Inflamosoma NLRP3 así como inducción de actividad del inflamosoma mediada por receptores tipo Toll favoreciendo la autofagia mitocondrial, liberación de catepsinas y especies reactivas de oxígeno que favorecen el ensamblaje y funcionalización del complejo inflamosoma NLRP3. Se estudio también el papel del oxido de trimetilamina en los procesos de activación del complejo inflamosoma NLRP3 mediado por catepsina B e incremento de

la expresión de la vía mediada por NF- κ B. Dada la importancia de los ácidos grasos de cadena corta en fenómenos de inmunomodulación, neuroprotección y restablecimiento de integridad de barreras y su relación directa con el microbioma intestinal, se estudiaron los efectos del acetato, butirato, propionato y la mezcla de estos en la modulación de la actividad del complejo inflamatorio NLRP3 y su implicación en los procesos de neurodegeneración en la Enfermedad de Parkinson a partir de selección por análisis metagenómicos y metabolómicos previamente reportados en la literatura asociados a fenómenos de disbiosis desde la etapa no motora de la enfermedad.

Para comprobar esta hipótesis se diseñó un modelo celular constituido por células inmunológicas que expresen de manera constitutiva el complejo Inflamatorio NLRP3 y células oncológicas neuronales con potencial diferenciación a estirpe dopaminérgica, principal tipo neuronal implicado en el desarrollo y progresión de la Enfermedad de Parkinson.

Etapas I. Desarrollo de cultivos celulares.

El cultivo de células macrofágicas RAW 264.7 se llevó a cabo mediante las instrucciones del inserto del vendedor sembrándose en medio de cultivo DMEM, w:2,1 mM Glutamina estable, w 2,0 g/L NaHCO₃ suplementado con un 10% de FBS y antibiótico Estreptomicina/ampicilina al 1% de la marca GIBCO®. Para el subcultivo de las células se llevó a cabo lavado y separación mecánica por raspado suave de las células adherentes con PBS sin calcio ni magnesio. Posteriormente se centrifugó a 300xg tanto la suspensión como las células adherentes por 3 minutos. Se resuspendió cuidadosamente el sedimento celular y se llevó a cabo el conteo y análisis de viabilidad con tinción de azul de tripano mediante hemocitómetro para establecer celularidad total y llevar a cabo la siembra de 10,000 células por pozo en placa de 96 pozos a volumen de 200 μ L y también efectuar el subcultivo mediante la suspensión celular a nuevos matraces de 75 cm² con medio fresco previamente suplementado (Ilustración 2A).

El cultivo de células SK-N-SH se llevó a cabo mediante las instrucciones del inserto del proveedor, sembrándose en medio de cultivo DMEM y F12 de Ham en una proporción

50:50 complementado con 15% de FBS y antibiótico Estreptomicina/ampicilina al 1% de la marca GIBCO®. El subcultivo se realizó mediante retiro de medio con las células flotantes y se recuperará las células por centrifugación. Se resuspendió cuidadosamente el sedimento celular y se llevó a cabo el conteo y análisis de viabilidad con tinción de azul de tripano mediante hemocitómetro para establecer celularidad total y llevar a cabo la siembra de 10,000 células por pozo en placa de 96 pozos a volumen de 200 μ L y también efectuar el subcultivo mediante la suspensión celular a nuevos matraces de 75 cm² con medio fresco previamente suplementado (Ilustración 2B, 2C, 19 y 20).

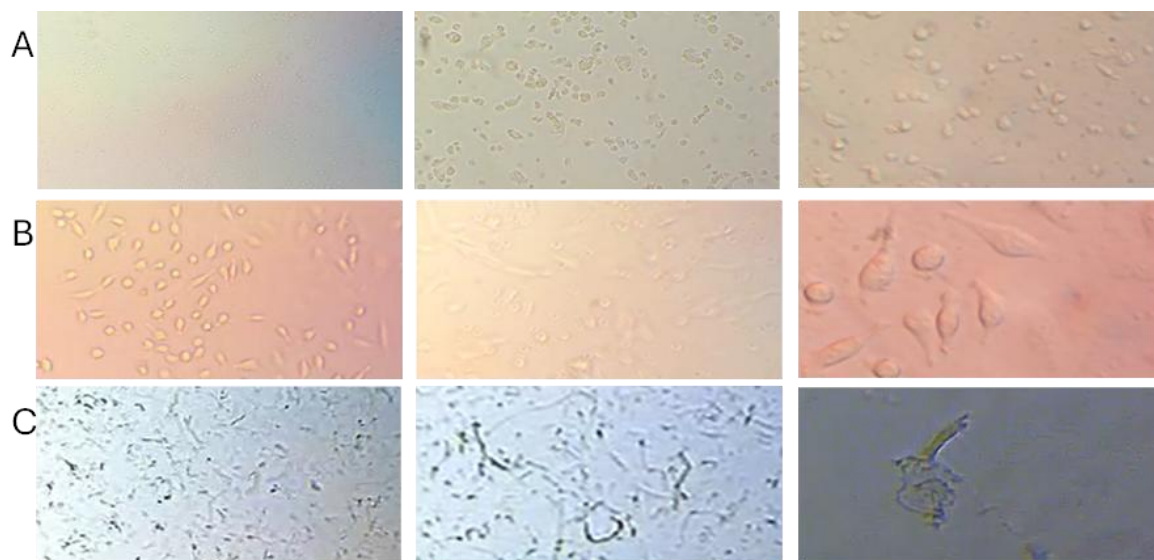


Ilustración 19. Caracterización morfológica de cultivos celulares mediante microscopía de contraste de fases. Las imágenes en **A** muestran la línea celular de macrófagos murinos **RAW 264.7** mostrando su morfología adherente característica. De izquierda a derecha: magnificación 10x, 20x y 40x. Las células exhiben morfología redondeada a ligeramente elongada típica de macrófagos no diferenciados. En **B** se muestran células de neuroblastoma **SK-N-SH** con fenotipo tipo S (adherente al sustrato). De izquierda a derecha: magnificación 10x, 20x y 40x. Las células tipo S presentan morfología epitelioide con patrón de crecimiento plano, adherente y contactos célula-célula estrechos. En **C** se muestran células **SK-N-SH** con **fenotipo tipo N (neuroblástico)**. De izquierda a derecha: magnificación 10x, 20x y 40x. Las células tipo N exhiben características neuronales con cuerpos celulares pequeños y extensiones de procesos. El panel derecho (40x) muestra neuronas diferenciadas con prominente crecimiento de neuritas tras el protocolo de diferenciación.

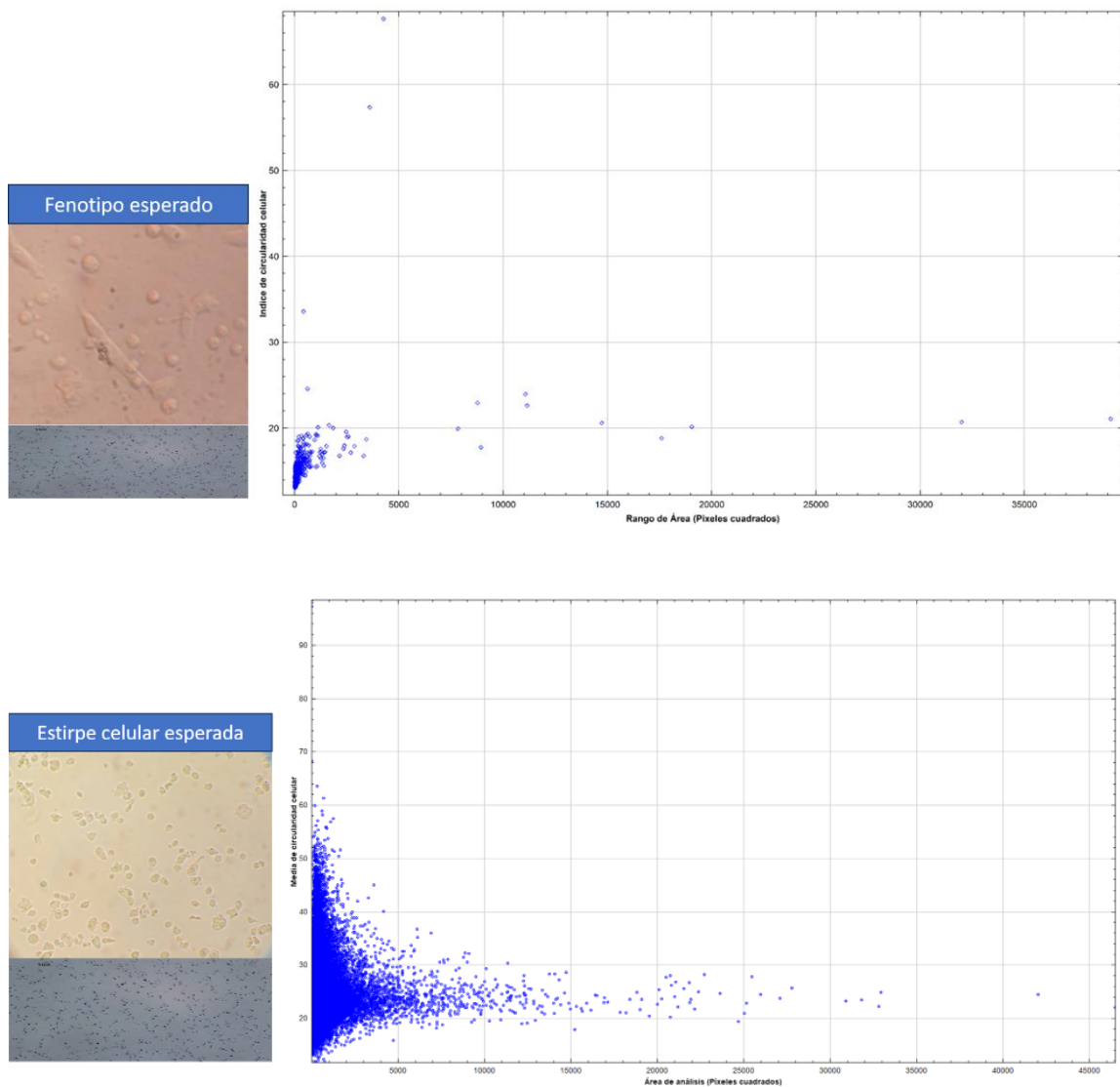


Ilustración 20. Gráfico de dispersión que muestra la distribución del área celular y su relación con la morfología de la estirpe de neuroblastoma humano SK-N-SH. Panel Superior. El gráfico muestra la dispersión de 403 células analizadas en función de su área (píxeles cuadrados) y el índice de circularidad (unidad adimensional). Los datos se expresan como la media de la circularidad. El predominio de células de fenotipo neuroblástico (N) se asocia directamente con la dispersión de los datos en rangos de baja circularidad. En el panel inferior se muestra el Gráfico de dispersión (Scatter Plot) que muestra la distribución del área celular y su relación con la morfología de la estirpe de neuroblastoma humano SK-N-SH y microglía aislada a partir de un cultivo primario murino. El gráfico muestra la dispersión de 1,786,121 células analizadas en función de su área (píxeles cuadrados) a partir de 44 diferentes fotogramas a poder de magnificación de 20 X y tomadas con dispositivo electrónico 8K a potenciación 1X, así como el índice de circularidad (unidad adimensional). Los datos se expresan como la media de la circularidad. El predominio de células de fenotipo neuroblástico (N) diferenciado y microglía en reposo se asocia directamente con la dispersión de los datos en rangos de circularidad baja.

Etapla II. Formación de medio rico en metabolitos bacterianos y análisis de viabilidad celular por ensayo colorimétrico.

Se llevó a cabo una preparación de Caspasa-1 basados en el inserto del vendedor, para adicionar tres diferentes concentraciones a 0.5 µg/ml, 5 µg/ml, y 50 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA) a las placas de cultivo celular de células macrofágicas RAW 264.7, las cuales se incubaron por 24 horas para establecer el grupo control con actividad constitutiva del inflammasoma NLRP3. Se llevó a cabo la recuperación del líquido de suspensión celular y se administró a los cultivos de células inmortalizadas de neuroblastoma de fenotipo neuroblástico SK-N-SH para cuantificar el grado de neurodegeneración de estas células, así mismo los ensayos se repitieron bajo cotratamiento con acetato, butirato y propionato para evaluar el efecto citoprotector de estos a concentraciones pares del ensayo inicial bajo incubación por 12 horas (Ilustración 21 y 22).

Se llevó a cabo el análisis de viabilidad por medio de método colorimétrico a partir de reactivo CellTiter 96 ® AQueous One Solution (Promega) a partir de cultivo de células de neuroblastoma de estirpe SK-N-SH inmortalizado posterior a ensayo de citotoxicidad con medio de cultivo rico en citocinas proinflamatorias aislado de medio de cultivo de células monocítico-macrofágicas de estirpe RAW 264.7. Se llevó a cabo el aislamiento de 100 µl de medio de cultivo en placas de 96 pozos, posteriormente, se añadieron 20 µl del reactivo por pozo y se incubaron a 37° C por 3 horas, bajo medio húmedo y CO₂ atmosférico al 5%, posteriormente se llevó a cabo la medición espectrofotométrica de la solución a un rango de onda de 490 nm usando un lector de placas para inmunoensayo enzimático (ELISA).

Se llevo a cabo una preparación de SCFAs basados en el inserto del vendedor, para adicionar cuatro diferentes concentraciones a 0.5 µg/ml, 5 µg/ml, 50 µg/ml y 250 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA) y se siguió el mismo esquema experimental previamente descrito (Ilustración 23 y 24).

En el modelo experimental con LPS de *P. mirabilis* y *A. muciniphila*, se adicionaron 0.5 µg/ml, 5 µg/ml, y 50 µg/ml µg/ml (Sigma-Aldrich, USA) en base al protocolo de preparación del inserto del vendedor y en las placas de cultivo celular previamente tratadas e incubadas con SCFAs (Ilustración 25, 26, 27 y 28).

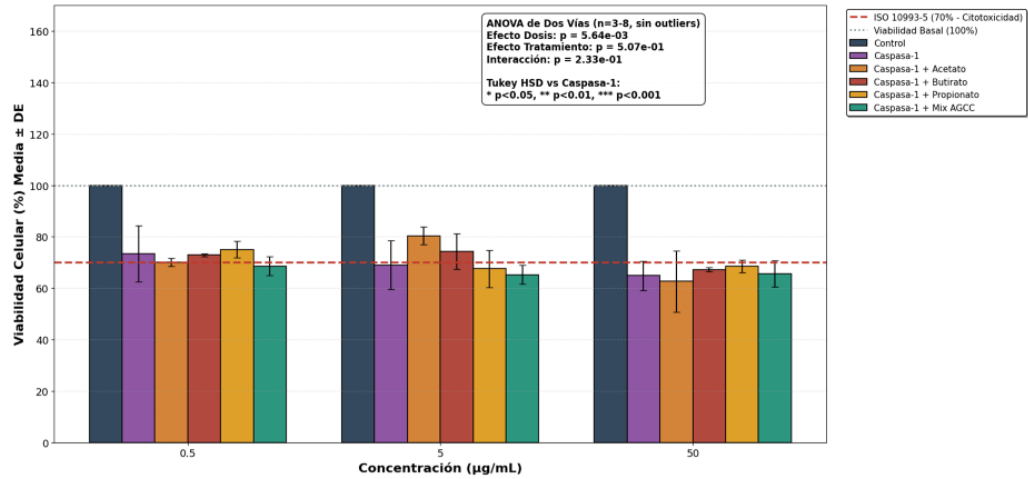
En el modelo experimental con metabolitos derivados de la microbiota intestinal se prepararon cultivos celulares de células macrofágicas RAW 264.7 con concentraciones de TMAO y cadaverina de manera independiente a concentraciones de 0.5 µg/ml, 5 µg/ml, 50 µg/ml y 250 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA), se incubaran por 24 horas y se llevó a cabo la recuperación del líquido de suspensión celular para su posterior administración a los cultivos de células inmortalizadas de neuroblastoma fenotipo neuroblástico SK-N-SH para cuantificar el grado de neurodegeneración de estas células. Se llevo el mismo modelo de cotratamiento con ácidos Grasos de cadena corta y se evaluó el porcentaje de viabilidad celular por métodos colorimétricos con metiltetrazolio (MTS) (ilustración 29, 30, 31 y 32).

A

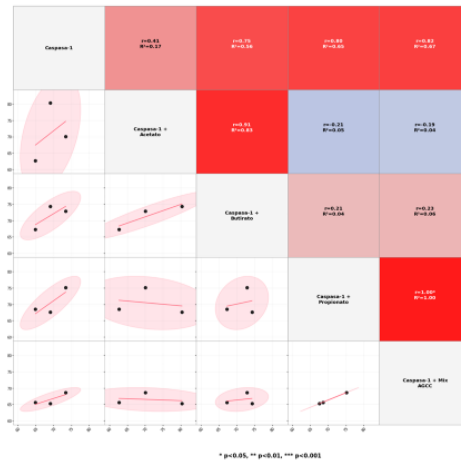
Concentración Caspasa-1	P1	P2	P3	P4	Media	Varianza	Desviación estándar	Media de la absorbancia control corregida	Absorbancia corregida P1	Absorbancia corregida P2	Absorbancia corregida P3	Absorbancia corregida P4	Media de absorbancia corregida	Valores de absorbancia corregida	Desviación estándar de absorbancia corregida	Viabilidad porcentual (%)
0.5 µg	0.64	0.64	0.69	0.70	0.67	0.0013	0.033	1.34	0.54	0.64	0.69	0.70	0.64	0.64	0.03	70.25
5 µg	0.72	0.62	0.70	0.70	0.71	0.0013	0.033	1.34	0.72	0.62	0.70	0.70	0.69	0.68	0.03	80.25
50 µg	0.50	0.61	0.67	0.68	0.62	0.0013	0.033	1.34	0.50	0.61	0.67	0.68	0.62	0.60	0.03	62.50

Concentración Caspasa-1	Absorbancia corregida P1 Tratamiento + Acetato	Absorbancia corregida P2 Tratamiento + Acetato	Viabilidad porcentual (%)	Concentración Caspasa-1	Absorbancia corregida P3 Tratamiento + Butirato	Absorbancia corregida P4 Tratamiento + Butirato	Viabilidad porcentual (%)	Concentración Caspasa-1	Absorbancia corregida P5 Tratamiento + Propionato	Absorbancia corregida P6 Tratamiento + Propionato	Viabilidad porcentual (%)	Concentración Caspasa-1	Absorbancia corregida P7 Tratamiento + Mix AGCC	Absorbancia corregida P8 Tratamiento + Mix AGCC	Viabilidad porcentual (%)
0.5 µg	0.63	0.70	80.04701581	0.5 µg	0.70	0.70	84.00001117	0.5 µg	0.70	0.70	84.00001117	0.5 µg	0.70	0.70	84.00001117
5 µg	0.61	0.67	70.00000000	5 µg	0.61	0.61	70.00000000	5 µg	0.61	0.61	70.00000000	5 µg	0.61	0.61	70.00000000
50 µg	0.50	0.62	60.00000000	50 µg	0.50	0.50	60.00000000	50 µg	0.50	0.50	60.00000000	50 µg	0.50	0.50	60.00000000

B



C



D

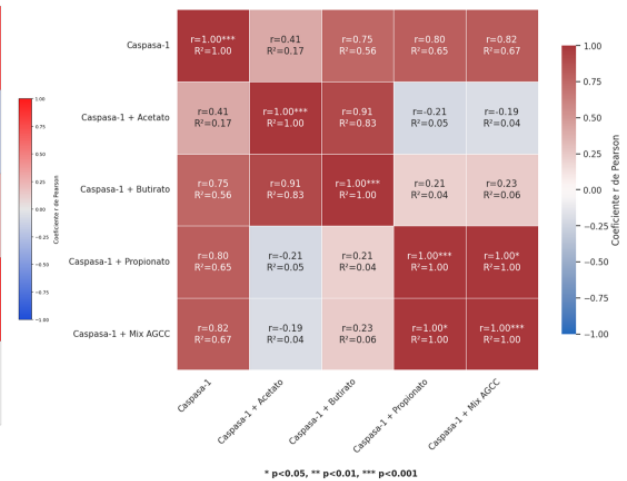


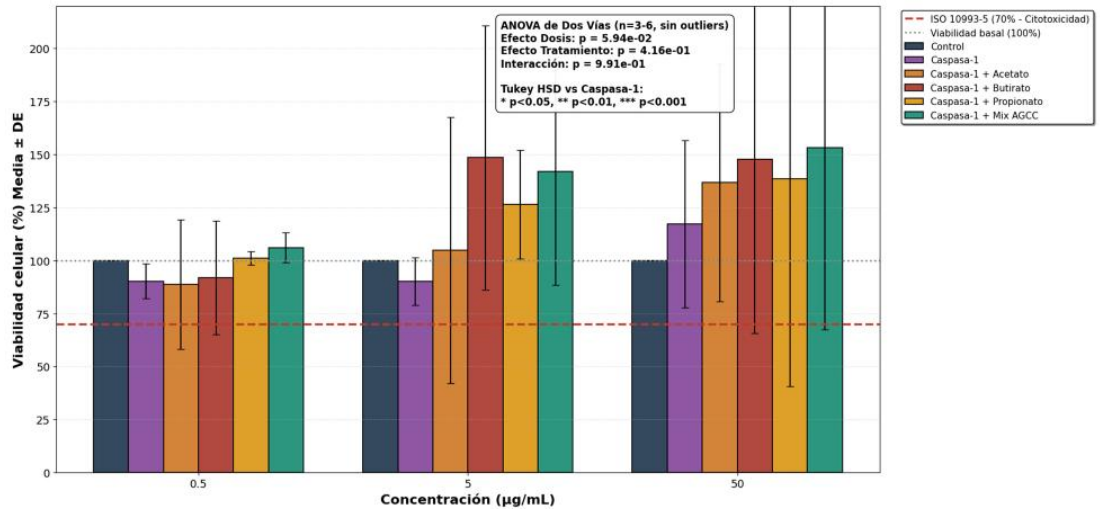
Ilustración 21. Efecto de Caspasa-1 y cotratamientos con AGCC sobre la viabilidad celular de RAW 264.7. El panel A resume los datos del ensayo colorimétrico a concentraciones de 0.5, 5 y 50 µg/mL. El panel B grafica la viabilidad celular, donde el análisis ANOVA revela una reducción significativa que es dependiente de la dosis. Sin embargo, no se evidenció un efecto estadístico significativo asociado al tipo de cotratamiento administrado ni a su interacción con la dosis. El panel C ilustra la dispersión, tendencia lineal y covariación de los perfiles de respuesta mediante un regresiógrafo y correlógrama. El panel D expone un mapa térmico detallando los coeficientes de correlación lineal de Pearson y su nivel de significancia entre tratamientos. De manera global, se comprueba que el estímulo con Caspasa-1 induce una reducción moderada en la viabilidad de los macrófagos. Finalmente, los cotratamientos con AGCC mantienen perfiles relacionados, sin evidencia estadística de una modulación diferencial según el tipo de ácido

A

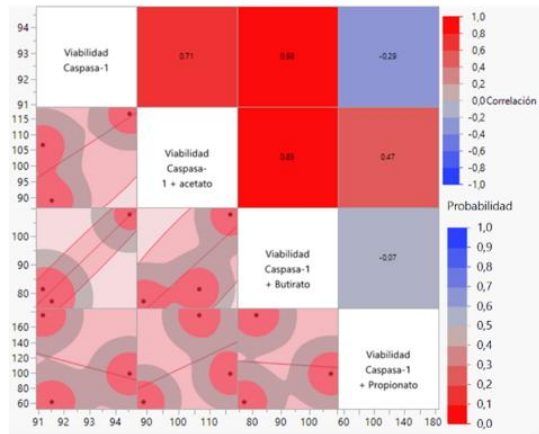
Concentración Caspasa-1	P1	P2	P3	Medio	Varianza	Desviación estándar	Medio de la absorbancia control corregida	Absorbancia corregida P1	Absorbancia corregida P2	Absorbancia corregida P3	Medio de absorbancia corregida	Varianza de absorbancias corregidas	desviación estándar de absorbancias corregidas	Viabilidad porcentual (%)
0.5 µg	0.72	0.805	0.713	0.7460	0.0017	0.0002	0.7579	0.720	0.805	0.713	0.746	0.002	0.005	88.40
5 µg	0.656	0.652	0.722	0.6097	0.0034	0.0070	0.62033333	0.656	0.652	0.722	0.6097	0.002	0.007	101.24
50 µg	0.634	0.642	0.479	0.5850	0.0107	0.0309	0.54223333	0.634	0.642	0.479	0.585	0.011	0.032	104.20

Concentración Caspasa-1	Absorbancia corregida P1 tratamiento + acetato	Absorbancia corregida P2 tratamiento + butirato	Absorbancia corregida P3 tratamiento + propionato	Medio de absorbancia corregida	Absorbancia corregida P1 tratamiento	Absorbancia corregida P2 tratamiento	Absorbancia corregida P3 tratamiento	Medio de absorbancia corregida fondo	Viabilidad porcentual P1 (%)	Viabilidad porcentual P2 (%)	Viabilidad porcentual P3 (%)
0.5 µg	0.594	0.590	0.407	0.5307	0.594	0.590	0.407	0.5307	88.80	77.80	61.56
5 µg	0.644	0.480	0.388	0.504	0.644	0.480	0.388	0.504	106.63	81.32	175.56
50 µg	0.678	0.636	0.262	0.508	0.678	0.636	0.262	0.508	118.58	107.88	98.64

B



C



D

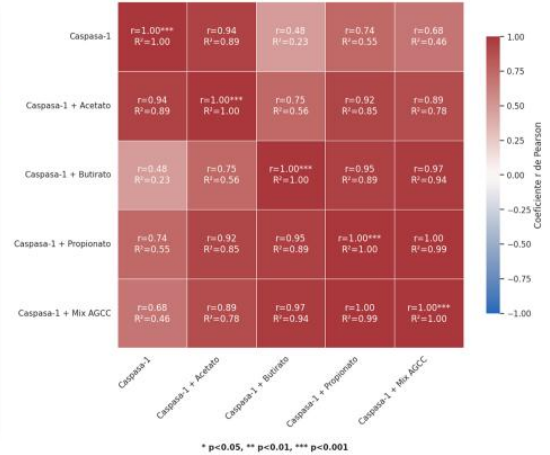


Ilustración 22. Efecto de Caspasa-1 y cotratamientos con AGCC sobre la viabilidad celular de SK-N-SH. El panel A resume los datos del ensayo colorimétrico a concentraciones de 0.5, 5 y 50 µg/mL. El panel B grafica la viabilidad celular, donde el análisis ANOVA indicó la ausencia de efectos significativos por dosis, tratamiento o su interacción. A pesar de ello, se observa una clara tendencia de los AGCC para preservar o incrementar la viabilidad celular frente al estímulo de Caspasa-1 sola. El panel C expone un regresiógrafo y un correlograma que detallan la dispersión, tendencia lineal y covariación de los perfiles de respuesta. El panel D ilustra mediante un mapa térmico los coeficientes de correlación lineal de Pearson y su significancia estadística entre los tratamientos. En conjunto, los datos revelan que la Caspasa-1 y los cotratamientos con AGCC no inducen una citotoxicidad significativa en este modelo celular. Finalmente, este patrón de respuesta propone una señal biológica exploratoria de citoprotección por parte de los AGCC que deberá validarse con estudios complementarios.

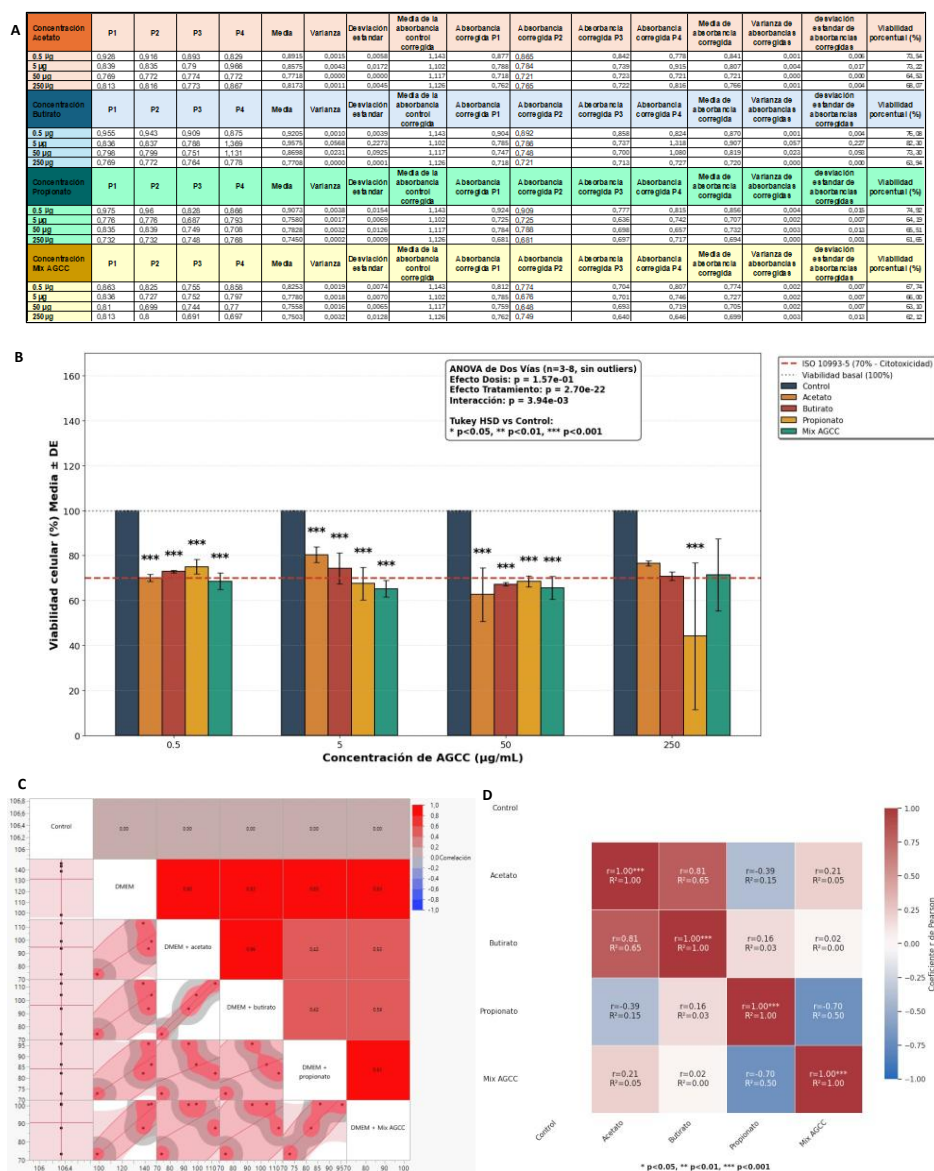


Ilustración 23. Efecto aislado de los Ácidos Grasos de cadena Corta sobre la viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7. El panel A detalla el procesamiento de datos colorimétricos bajo concentraciones de 0.5 a 250 µg/mL. El panel B muestra la viabilidad celular, donde el análisis ANOVA reveló efectos significativos del tratamiento y de la interacción dosis/tratamiento. Estos hallazgos confirman que la supervivencia de los macrófagos depende estrictamente tanto del tipo de metabolito como de la concentración aplicada. El panel C presenta un regresiógrafo y correlograma que analizan la dispersión, tendencias lineales y elipses de covariación entre grupos. El panel D expone mediante un mapa térmico los coeficientes de correlación de Pearson y, resaltando la significancia estadística alcanzada. En conjunto, los datos demuestran que los AGCC aislados modulan de forma diferencial la viabilidad celular, mostrando respuestas no homogéneas. Finalmente, los perfiles obtenidos sugieren una regulación inmunometabólica compleja y dependiente de la naturaleza específica de cada ácido graso de cadena corta

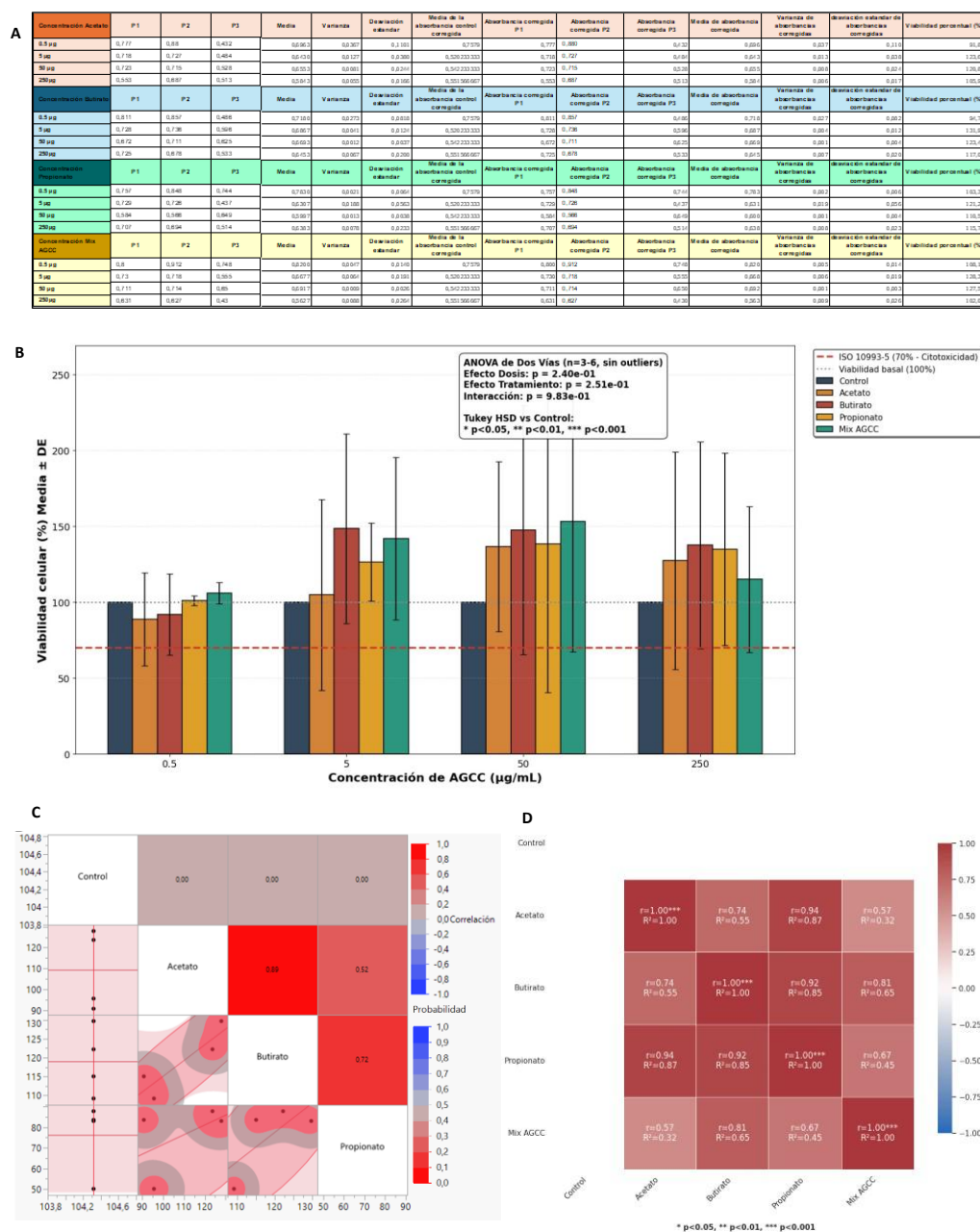


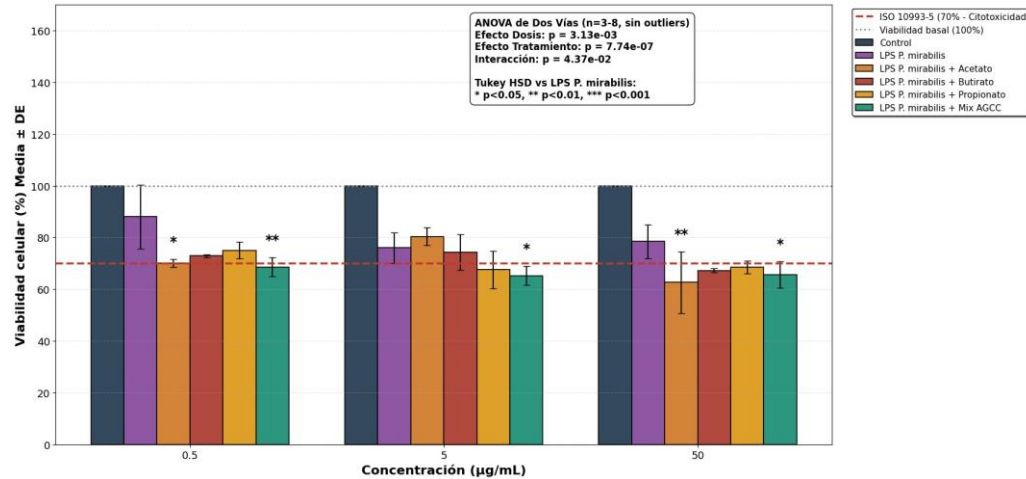
Ilustración 24. Evaluación de la viabilidad celular en cultivo de Neuroblastoma SK-N-SH tratados con ácidos grasos de cadena corta (AGCC). El panel A detalla el procesamiento de datos colorimétricos bajo concentraciones de 0.5 a 250 µg/mL. En el panel B, el análisis de ANOVA de dos vías confirmó la **ausencia de efectos significativos** por dosis, tratamiento o interacción. Todas las condiciones evaluadas permanecieron por encima del umbral de citotoxicidad del 70%, sugiriendo una **alta tolerancia celular**. El panel C presenta un regresiógrafo y correlograma que analizan la tendencia lineal y las elipses de covariación entre tratamientos. El panel D ilustra mediante un mapa térmico los coeficientes de correlación de Pearson, indicando perfiles de respuesta linealmente relacionados. En conjunto, se concluye que los AGCC aislados **no inducen citotoxicidad significativa** en el modelo neuronal SK-N-SH bajo estas condiciones. Los datos sugieren que, aunque no hay cambios estadísticos globales, existen perfiles de respuesta biológica parcialmente compartidos entre los tratamientos.

A

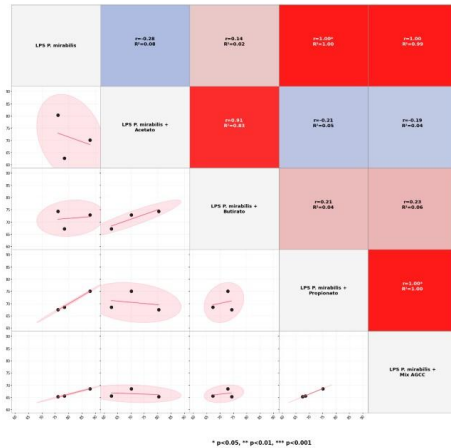
Concentración LPS P. mirabilis (µg/mL)	P1	P2	P3	P4	Media	Varianza	Desviación estándar	Media de la absorbancia control corregida	Absorbancia corregida P1	Absorbancia corregida P2	Absorbancia corregida P3	Absorbancia corregida P4	Media de absorbancia corregida	Varianza de absorbancias corregidas	Desviación estándar de absorbancias corregidas	Viabilidad porcentual (%)
0.5 µg	0.995	0.992	0.968	0.877	0.960	0.0023	0.0039	1.343	0.990	0.982	0.966	0.877	0.984	0.002	0.0039	88.98
5 µg	0.944	0.94	0.928	0.895	0.926	0.0022	0.0028	1.302	0.944	0.942	0.928	0.895	0.926	0.002	0.0028	77.85
50 µg	0.844	0.844	0.807	0.891	0.845	0.0022	0.0038	1.151	0.844	0.844	0.807	0.891	0.845	0.002	0.0038	76.27

Concentración LPS P. mirabilis (µg/mL)	Absorbancia corregida P1 Tratamiento + acetato	Absorbancia corregida P2 Tratamiento + acetato	Viabilidad porcentual (%)	Absorbancia corregida P3 Tratamiento + acetato	Absorbancia corregida P4 Tratamiento + acetato	Viabilidad porcentual (%)	Absorbancia corregida P1 Tratamiento + propionato	Absorbancia corregida P2 Tratamiento + propionato	Viabilidad porcentual (%)	Absorbancia corregida P3 Tratamiento + mix	Absorbancia corregida P4 Tratamiento + mix	Viabilidad porcentual (%)
0.5 µg	0.962	0.946	88.98	0.895	0.877	88.98	0.917	0.917	85.34	0.868	0.825	84.84
5 µg	0.773	0.768	86.11	0.762	0.768	86.11	0.777	0.777	76.41	0.759	0.764	76.27
50 µg	0.844	0.768	100.00	0.834	0.763	100.00	0.756	0.756	80.10	0.760	0.740	100.00

B



C



D

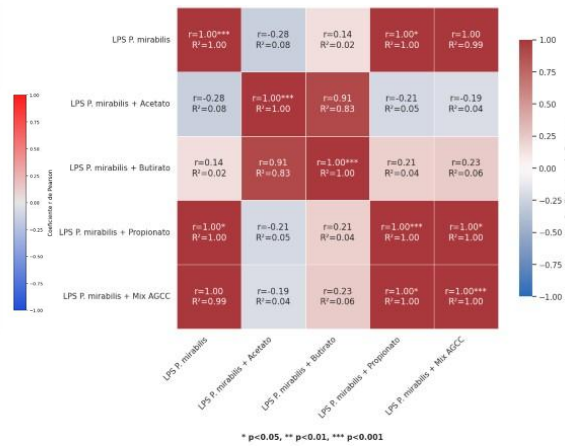


Ilustración 25. Efecto de LPS de *P. mirabilis* y AGCC en RAW 264.7. El panel A resume los datos estadísticos del ensayo colorimétrico evaluado a concentraciones de 0.5, 5 y 50 µg/mL. El panel B grafica la viabilidad celular, donde el análisis ANOVA demostró efectos significativos dependientes de la dosis, del tratamiento y de su interacción. Estos resultados confirman que la respuesta de supervivencia macrofágica está condicionada directamente tanto por la concentración como por el tipo de cotratamiento. El panel C despliega un regresiógrafo y correlograma que detallan la dispersión, la tendencia lineal y las elipses de covariación entre los diferentes grupos. El panel D ilustra a través de un mapa térmico los coeficientes de correlación lineal de Pearson y su respectiva significancia estadística. De manera global, se evidencia que el LPS de *P. mirabilis* junto con los AGCC inducen modificaciones diferenciales en la viabilidad de los macrófagos. Este patrón de respuesta refleja una compleja modulación inmunometabólica y heterogénea por parte de la célula frente al estímulo inflamatorio bacteriano.

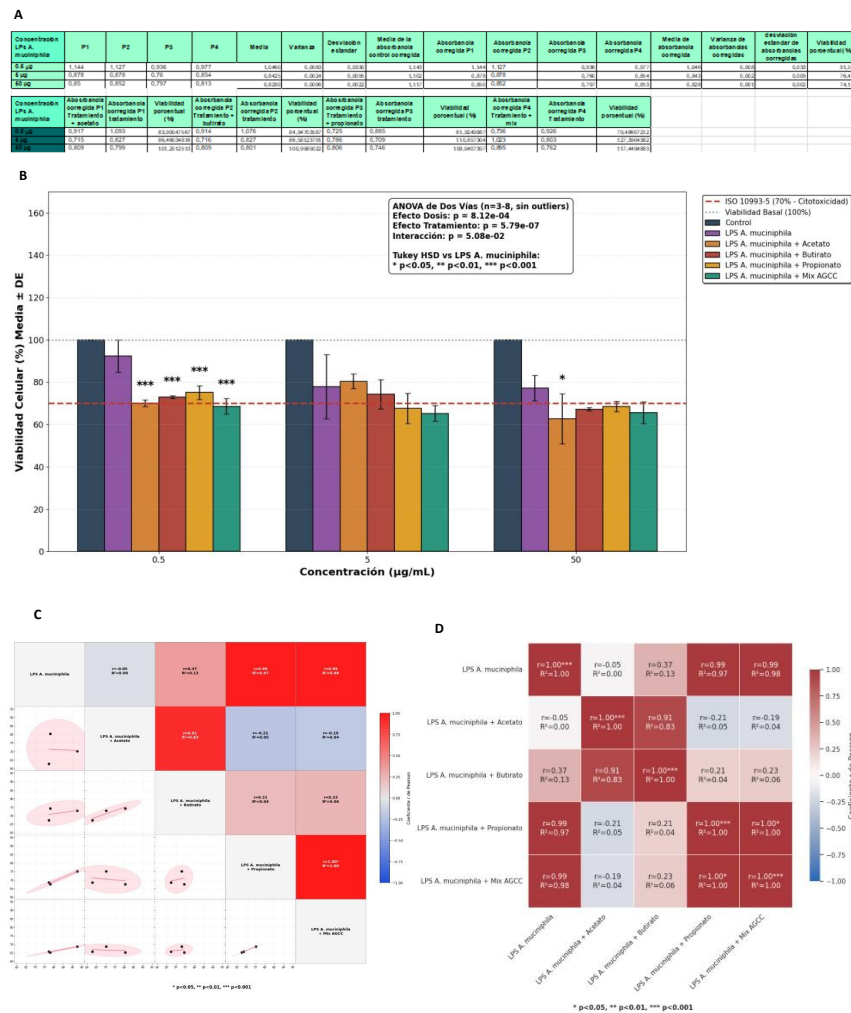


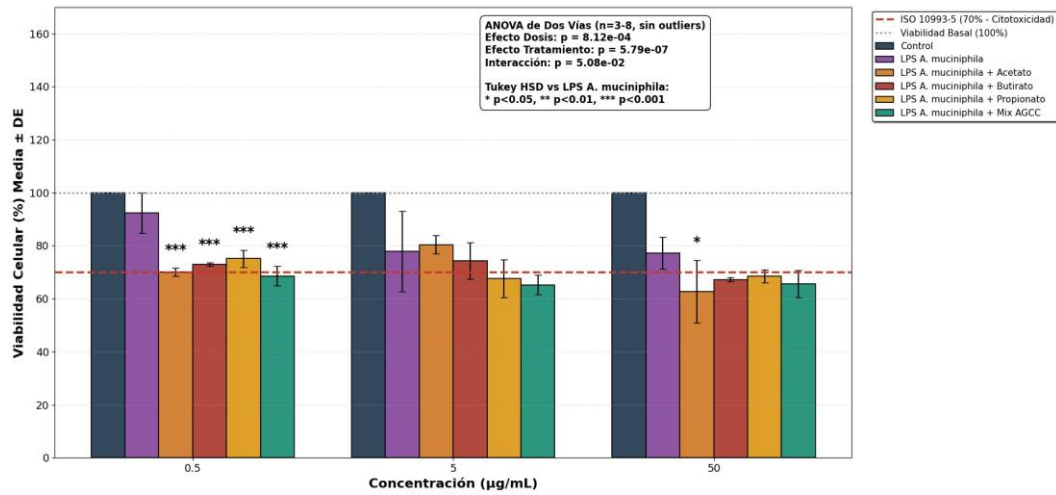
Ilustración 26. Efecto de LPS de *Akkermansia muciniphila* y cotratamientos con AGCC sobre la viabilidad celular de RAW 264.7. La figura muestra cuatro componentes. **A)** Presenta el procesamiento de datos del ensayo colorimétrico, donde se resaltan las modalidades estadísticas crudas y corregidas, incluyendo medias, varianza, desviación estándar y viabilidad porcentual con base en los análisis de absorbancia para LPS de *A. muciniphila* y sus cotratamientos con acetato, butirato, propionato y mezcla de AGCC bajo concentraciones de 0.5, 5 y 50 µg/mL. **B)** Muestra el gráfico de barras de viabilidad celular porcentual respecto al control, reportada como media $\pm$ desviación estándar. La línea punteada en gris indica la viabilidad basal al 100%, mientras que la línea roja discontinua representa el umbral de citotoxicidad del 70% según ISO 10993-5. El análisis mediante ANOVA de dos vías mostró efecto significativo de la dosis, efecto altamente significativo del tratamiento e interacción dosis/tratamiento significativa, lo que indica que la respuesta de viabilidad depende tanto de la concentración como del tipo de cotratamiento evaluado. Las comparaciones post hoc se realizaron mediante Tukey HSD frente a LPS de *A. muciniphila* en cada grupo. **C)** Presenta el regresiógrafo y correlograma complementario entre los perfiles de viabilidad, donde el triángulo inferior muestra dispersión, tendencia lineal y elipses de covariación entre tratamientos, mientras que el triángulo superior representa la magnitud de la asociación lineal. **D)** Muestra el mapa térmico de correlación lineal entre tratamientos, indicando el coeficiente r de Pearson y R^2 . Los asteriscos indican significancia estadística: $p < 0.05$, * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$. En conjunto, los datos sugieren que el LPS de *A. muciniphila* y sus cotratamientos con AGCC inducen modificaciones significativas en la viabilidad de RAW 264.7, con una respuesta dependiente de la dosis y del tipo de metabolito. Este patrón es compatible con una modulación inmunometabólica diferencial frente al estímulo inflamatorio bacteriano, donde los cotratamientos con AGCC no se comportan de forma homogénea y pueden modificar de manera específica la respuesta celular inducida por LPS.

A

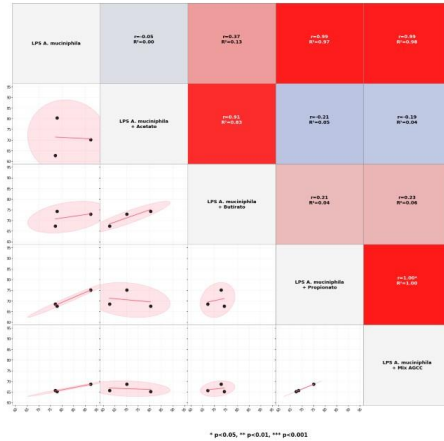
Concentración LPS A. muciniphila	P1	P2	P3	P4	Media	Varianza	Desviación estándar	Media de la absorbancia control o región	Absorbancia corregida P1	Absorbancia corregida P2	Absorbancia corregida P3	Absorbancia corregida P4	Media de absorbancia o región	Varianza de absorbancia o región	Desviación estándar de absorbancia o región	Viabilidad porcentual (%)
0.5 µg	1.144	1.127	0.936	0.977	1.044	0.080	0.320	1.140	1.144	1.127	0.936	0.977	1.044	0.080	0.320	91.50
5 µg	0.978	0.976	0.797	0.854	0.904	0.024	0.155	0.978	0.978	0.976	0.797	0.854	0.904	0.024	0.155	78.87
50 µg	0.85	0.852	0.797	0.813	0.826	0.004	0.022	0.85	0.85	0.852	0.797	0.813	0.826	0.004	0.022	74.11

Concentración LPS A. muciniphila	Absorbancia corregida P1 Tratamiento + acetato	Absorbancia corregida P2 Tratamiento + acetato	Viabilidad porcentual (%)	Absorbancia corregida P1 Tratamiento + butirato	Absorbancia corregida P2 Tratamiento + butirato	Viabilidad porcentual (%)	Absorbancia corregida P1 Tratamiento + propionato	Absorbancia corregida P2 Tratamiento + propionato	Viabilidad porcentual (%)	Absorbancia corregida P4 Tratamiento + Mix	Absorbancia corregida P4 Tratamiento + Mix	Viabilidad porcentual (%)
0.5 µg	0.977	1.093	83.00-87.94	0.974	1.076	84.34-93.67	0.725	0.885	85.35-90.65	0.756	0.926	79.48-87.23
5 µg	0.775	0.897	80.00-90.00	0.776	0.897	80.00-90.00	0.746	0.769	73.00-80.00	0.769	0.762	73.00-80.00
50 µg	0.809	0.799	100.00-100.00	0.809	0.801	100.00-100.00	0.808	0.748	100.00-100.00	0.805	0.762	117.40-100.00

B



C



D

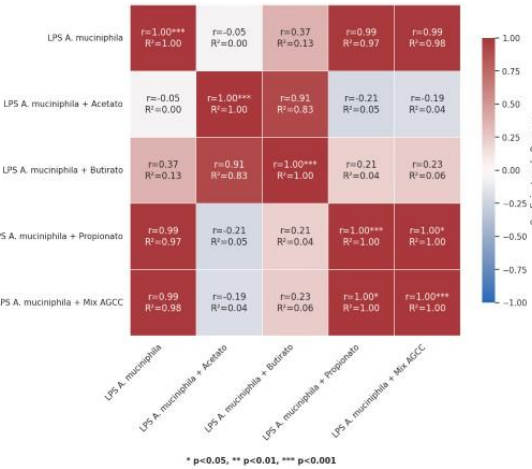
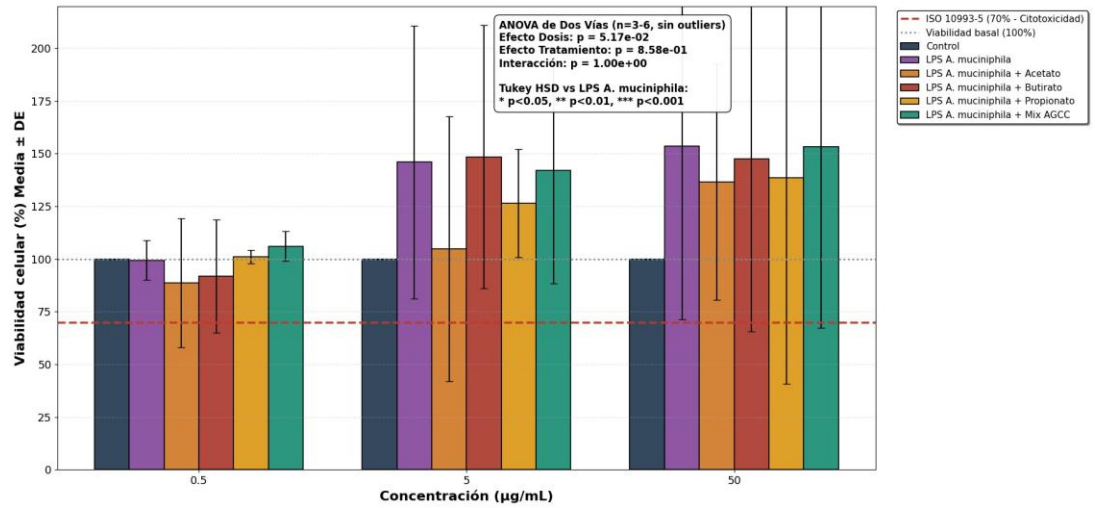


Ilustración 27. Efecto de LPS de *A. muciniphila* y AGCC en RAW 264.7. El panel A resume los datos estadísticos del ensayo colorimétrico a dosis de 0.5, 5 y 50 µg/mL. El panel B muestra la viabilidad celular, donde el ANOVA confirmó efectos significativos de la dosis, el tratamiento y su interacción. Esto indica que la respuesta macrofágica depende estrictamente de la concentración evaluada y de la naturaleza del cotratamiento aplicado. El panel C utiliza un regresiógrafo y correlograma para detallar la dispersión y la tendencia lineal de los perfiles de viabilidad. El panel D expone a través de un mapa térmico los coeficientes de correlación de Pearson y la significancia estadística entre grupos. En conjunto, se evidencia una modulación inmunometabólica heterogénea inducida por el LPS de *A. muciniphila* y los metabolitos bacterianos. Finalmente, los AGCC no actúan de forma uniforme, sino que exhiben perfiles específicos de interacción frente al estímulo inflamatorio.

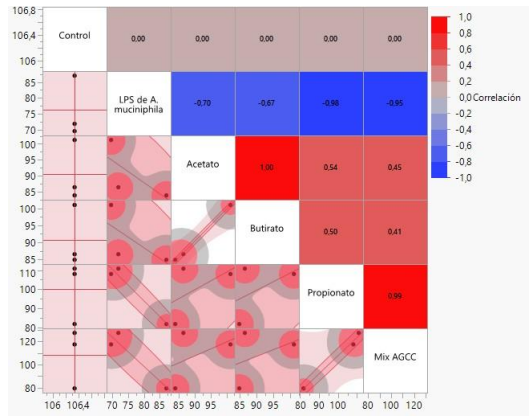
A

Concentración LPS A. muciniphila	P1	P2	P3	Media	Varianza	Desviación estándar	Media de la absorbencia a nivel control	Absorbencia corregida P1	Absorbencia corregida P2	Absorbencia corregida P3	Media de absorbencia corregida	Varianza de absorbencia corregida	Desviación estándar de absorbencia corregida	Viabilidad porcentual P1
0.5 µg	0.002	0.006	0.005	0.004	0.000	0.002	0.000	0.002	0.006	0.005	0.004	0.000	0.000	100.00
5 µg	0.008	0.019	0.009	0.009	0.000	0.009	0.000	0.008	0.019	0.009	0.009	0.000	0.000	100.00
50 µg	0.002	0.006	0.005	0.004	0.000	0.002	0.000	0.002	0.006	0.005	0.004	0.000	0.000	100.00
Concentración LPS A. muciniphila	Absorbencia corregida P1 tratamiento + acetato	Absorbencia corregida P2 tratamiento + butirato	Absorbencia corregida P3 tratamiento + propionato	Media de absorbencia corregida	Absorbencia corregida P1 tratamiento	Absorbencia corregida P2 tratamiento	Absorbencia corregida P3 tratamiento	Media de absorbencia corregida	Viabilidad porcentual P1 (%)	Viabilidad porcentual P2 (%)	Viabilidad porcentual P3 (%)			
0.5 µg	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	100.00	100.00	100.00			
5 µg	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	100.00	100.00	100.00			
50 µg	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	100.00	100.00	100.00			

B



C



D

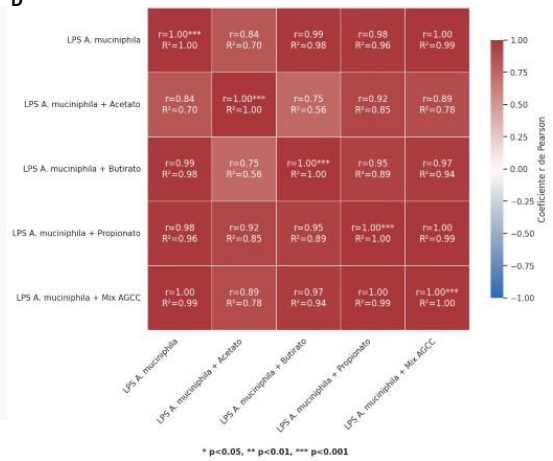


Ilustración 28. Efecto de LPS de *A. muciniphila* y AGCC sobre la viabilidad de SK-N-SH. El panel A resume los datos del ensayo colorimétrico a dosis de 0.5, 5 y 50 µg/mL. El panel B grafica la viabilidad celular; donde el análisis ANOVA determinó un **efecto significativo de la dosis**, sin influencia del tipo de tratamiento. Esto sugiere que la variación en la supervivencia se asocia principalmente a la concentración evaluada y no a la naturaleza del cotratamiento. Sin embargo, se observa una **tendencia hacia la preservación o incremento de la viabilidad** en presencia de AGCC, sugiriendo una posible citoprotección. El panel C detalla la dispersión y la tendencia lineal de los perfiles de respuesta mediante un regresiógrafo y correlograma. El panel D expone a través de un mapa térmico los coeficientes de correlación de Pearson y su nivel de significancia entre grupos. En conjunto, se demuestra que estos estímulos **no inducen citotoxicidad significativa** en el modelo neuronal bajo las condiciones experimentales evaluadas.

Concentración (µg/mL)	P1	P2	P3	P4	Media	Varianza	Desviación estándar	Media de la absorbancia control corregida	Absorbancia corregida P1	Absorbancia corregida P2	Absorbancia corregida P3	Absorbancia corregida P4	Media de absorbancia corregida	Varianza de absorbancia corregida	Desviación estándar de absorbancia corregida	Viabilidad porcentual (%)
0.6 µg	1.026	1.013	0.757	0.779	0.894	0.0039	0.0636	1.140	1.026	1.013	0.757	0.779	0.894	0.0039	0.0636	80.17
1 µg	0.978	0.923	0.669	0.708	0.819	0.0041	0.0640	1.140	0.978	0.923	0.669	0.708	0.819	0.0041	0.0640	80.20
60 µg	0.791	0.668	0.584	0.702	0.686	0.0043	0.0654	1.140	0.791	0.668	0.584	0.702	0.686	0.0043	0.0654	68.31
260 µg	0.797	0.759	0.702	0.696	0.741	0.0043	0.0654	1.140	0.797	0.759	0.702	0.696	0.741	0.0043	0.0654	68.34

Concentración (µg/mL)	Absorbancia corregida P1 Tratamiento + Biotina	Absorbancia corregida P2 Tratamiento + Biotina	Absorbancia corregida P3 Tratamiento + Biotina	Absorbancia corregida P4 Tratamiento + Biotina	Media	Varianza	Desviación estándar	Absorbancia corregida P1 Tratamiento + Biotina	Absorbancia corregida P2 Tratamiento + Biotina	Absorbancia corregida P3 Tratamiento + Biotina	Absorbancia corregida P4 Tratamiento + Biotina	Media	Varianza	Desviación estándar	Viabilidad porcentual (%)
0.6 µg	0.775	0.675	0.589	0.712	0.688	0.0039	0.0636	0.775	0.675	0.589	0.712	0.688	0.0039	0.0636	80.17
1 µg	0.641	0.767	0.514	0.642	0.641	0.0041	0.0640	0.641	0.767	0.514	0.642	0.641	0.0041	0.0640	80.20
60 µg	0.762	0.709	0.593	0.717	0.721	0.0043	0.0654	0.762	0.709	0.593	0.717	0.721	0.0043	0.0654	68.31
260 µg	0.859	0.748	0.698	0.687	0.742	0.0043	0.0654	0.859	0.748	0.698	0.687	0.742	0.0043	0.0654	68.34

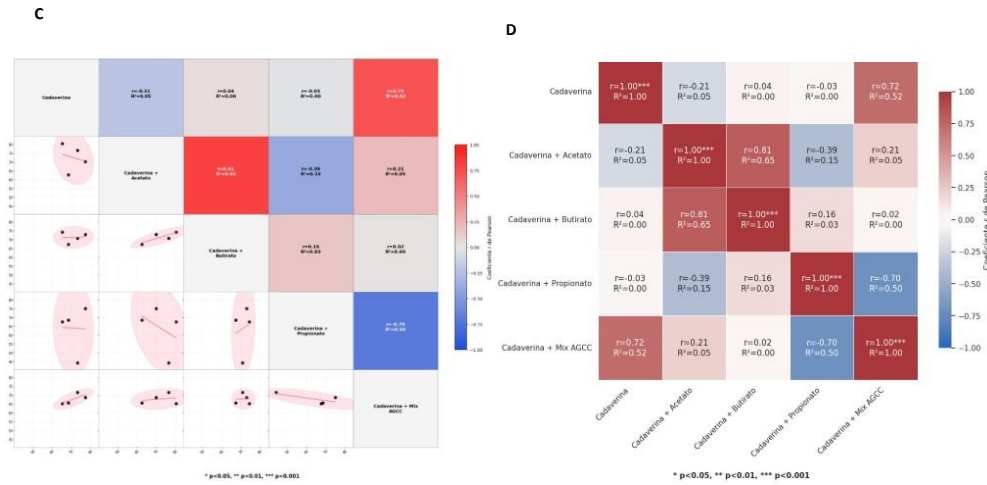
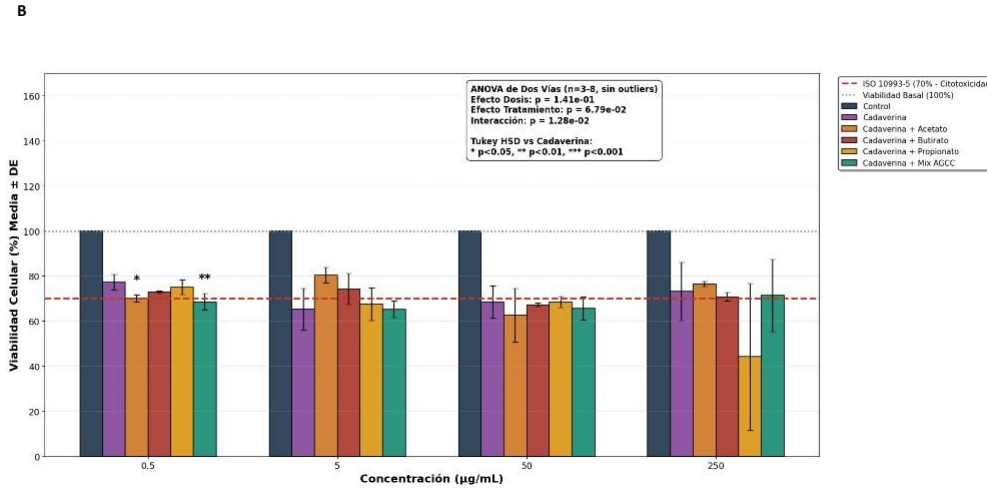


Ilustración 29. Efecto de cadaverina y AGCC sobre la viabilidad de SK-N-SH. El panel A detalla el procesamiento de datos estadísticos y la viabilidad porcentual obtenida mediante absorbancia. El panel B grafica la supervivencia celular, observándose que la mayoría de los tratamientos se mantienen por encima del umbral de citotoxicidad del 70%. Aunque no hubo efectos independientes significativos, el análisis ANOVA reveló una interacción dosis/tratamiento significativo. Esto indica que la respuesta neuronal frente a la cadaverina depende de la combinación específica entre su concentración y el tipo de cotratamiento aplicado. El panel C presenta la tendencia lineal y las elipses de covariación, mientras que el panel D ilustra las correlaciones mediante un mapa térmico. Los resultados muestran patrones heterogéneos, donde algunos grupos se aproximan al umbral tóxico y otros sugieren una preservación parcial de la viabilidad. En conjunto, se concluye que la cadaverina y los AGCC no inducen citotoxicidad significativa en el modelo neuronal bajo las condiciones experimentales evaluadas.

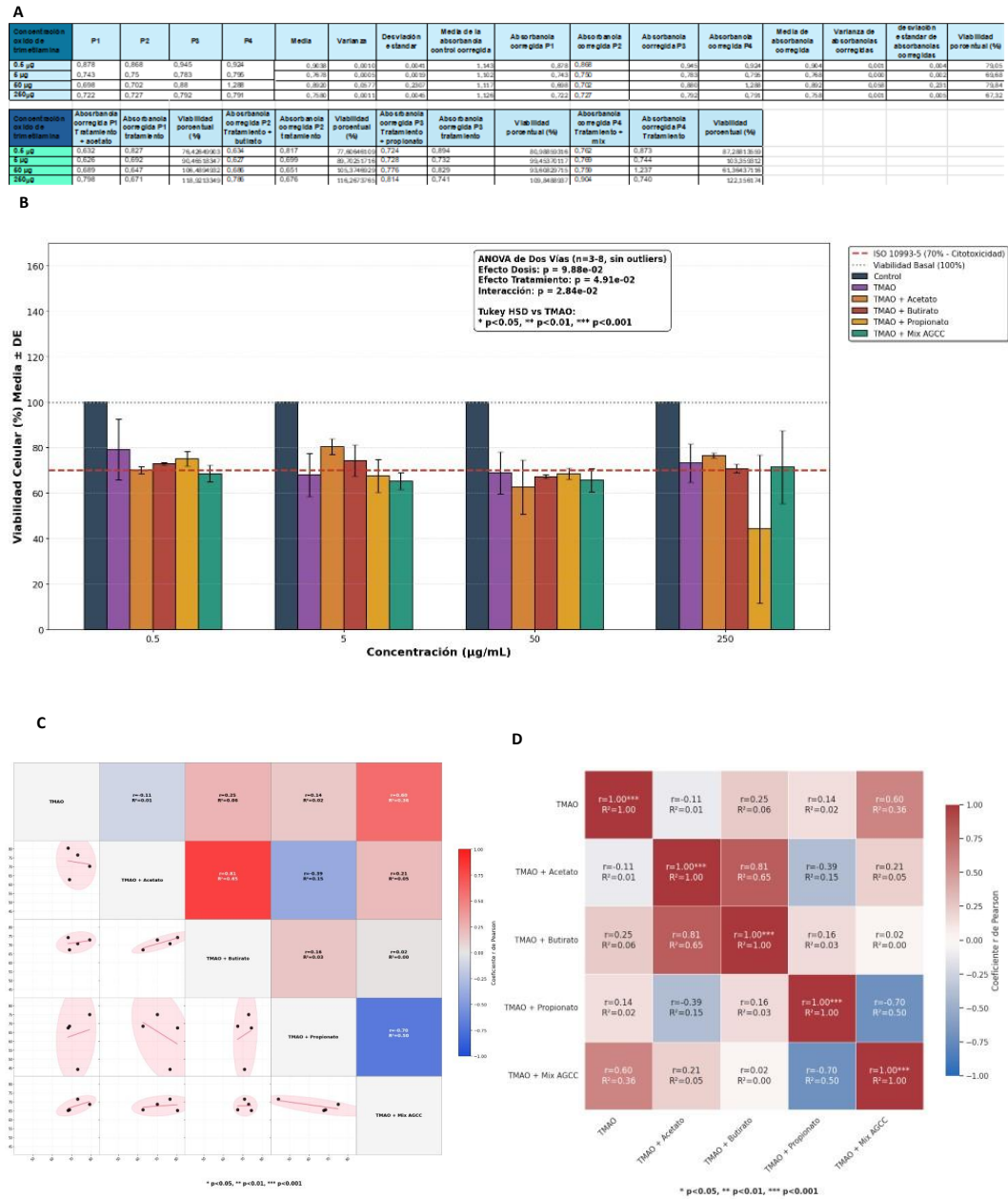


Ilustración 30. Efecto de TMAO y AGCC sobre la viabilidad de RAW 264.7. El panel A detalla el procesamiento estadístico de los datos obtenidos mediante el ensayo colorimétrico. El análisis ANOVA en el panel B reveló un **efecto significativo del tratamiento**, sin influencia de la dosis ni de la interacción. Esto indica que la respuesta macrofágica depende primordialmente del tipo de metabolito y no de una relación dosis-respuesta lineal. El panel C ilustra la dispersión y tendencias lineales de los perfiles mediante un regresiógrafo y correlograma complementario. El panel D expone el mapa térmico con los coeficientes de Pearson, detallando la asociación entre los tratamientos. De manera global, se confirma que el TMAO y los AGCC modulan la viabilidad celular de forma diferencial y selectiva. Finalmente, los datos subrayan la existencia de perfiles de respuesta heterogéneos condicionados por la naturaleza específica de cada AGCC.

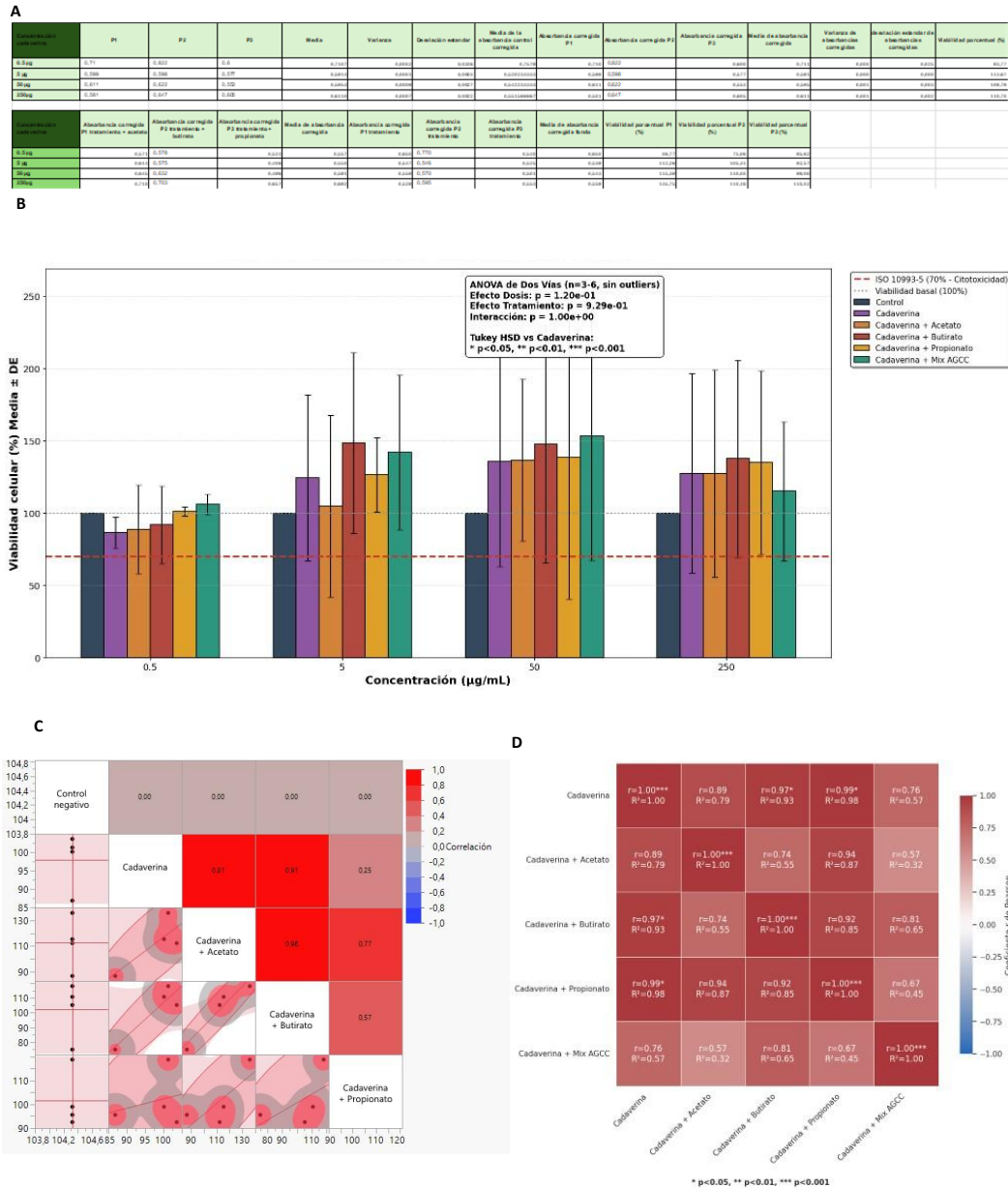


Ilustración 31. Efecto de cadaverina y AGCC sobre la viabilidad de RAW 264.7. El panel A resume los datos estadísticos y porcentuales del ensayo colorimétrico a dosis de 0.5 a 250 µg/mL. El panel B grafica la supervivencia celular, donde el análisis ANOVA indicó la ausencia de efectos significativos por dosis, tratamiento o interacción. A pesar de ello, se observa una tendencia de los AGCC hacia la preservación o incremento de la viabilidad respecto a la cadaverina sola. El panel C detalla la dispersión y la tendencia lineal de los perfiles de respuesta mediante un regresiógrafo y correlógrafo. El panel D expone a través de un mapa térmico los coeficientes de correlación de Pearson y su nivel de significancia entre grupos. De manera global, se evidencia que la cadaverina y los AGCC no inducen citotoxicidad significativa en los macrófagos bajo estas condiciones. Finalmente, estos resultados proponen una respuesta biológica diferencial con potencial citoprotector por parte de los AGCC que deberá ser validado funcionalmente.

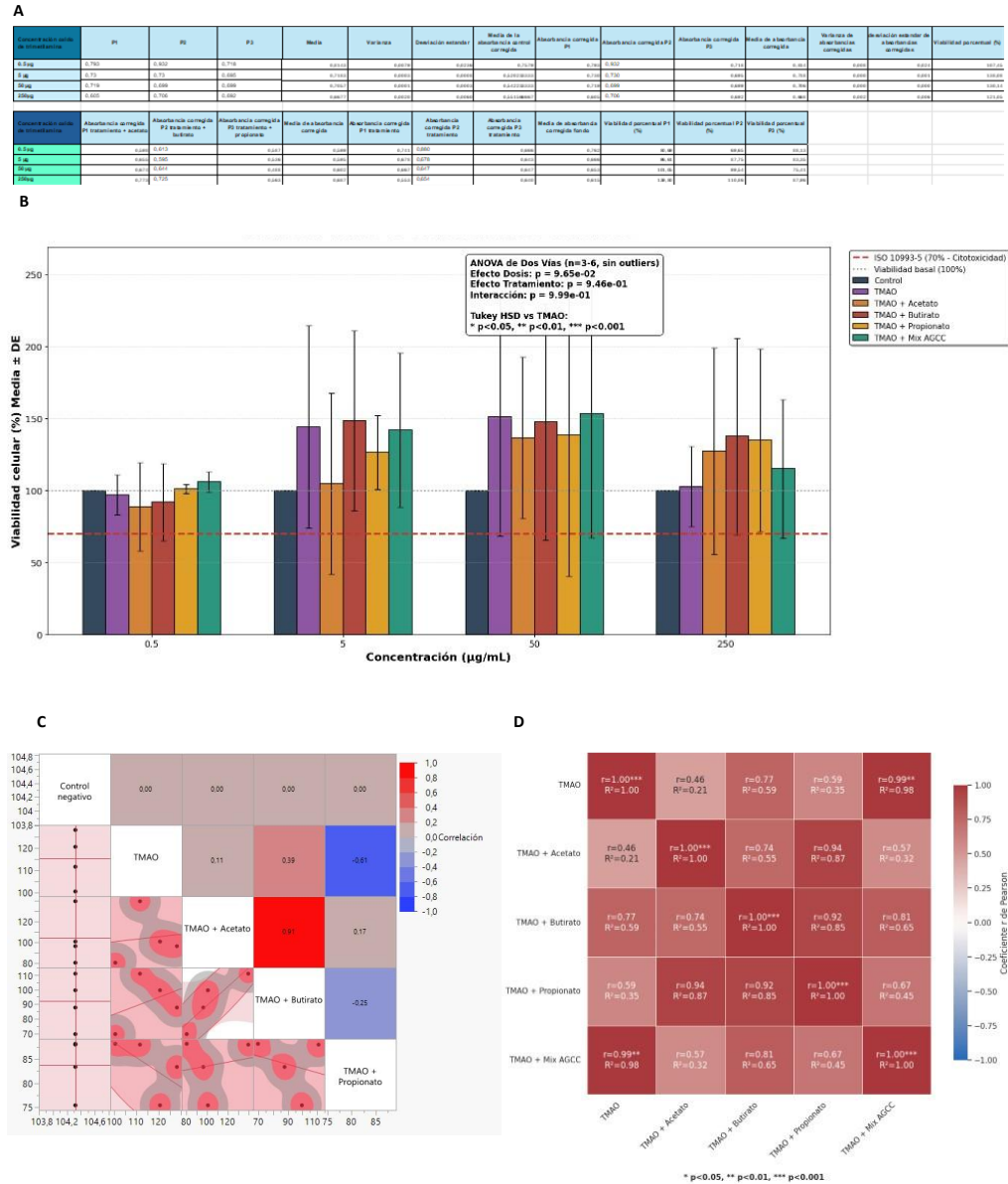


Ilustración 32. Efecto de TMAO y AGCC sobre la viabilidad de SK-N-SH. El panel A resume los datos estadísticos y porcentuales del ensayo colorimétrico a dosis de 0.5 a 250 µg/mL. En el panel B, el análisis ANOVA de dos vías confirmó la ausencia de efectos significativos por dosis, tratamiento o su interacción. A pesar de ello, se identificó una tendencia hacia la preservación de la viabilidad celular en los cotratamientos con acetato, butirato y mezcla de AGCC. El panel C detalla la dispersión y la tendencia lineal de los perfiles de respuesta mediante un regresiógrafo y correlograma. El panel D expone a través de un mapa térmico los coeficientes de correlación de Pearson y su nivel de significancia entre grupos. De manera global, se evidencia que el TMAO y los AGCC no inducen citotoxicidad significativa en el modelo neuronal bajo estas condiciones. Finalmente, este patrón sugiere una señal biológica exploratoria de citoprotección que deberá validarse con estudios funcionales complementarios

Etapa III. Ensayo de acoplamiento molecular *in silico* y descripción de vías de señalización vinculadas a la Enfermedad de Parkinson.

Con el propósito de elucidar el papel de la microbiota intestinal en el desarrollo y progresión de la enfermedad de Parkinson, se llevaron a cabo análisis de acoplamiento molecular *in silico* para analizar el papel de los diferentes metabolitos microbianos estudiados y su posible relación como mecanismos de transducción de señales. Para ello se analizó a través de la plataforma de acceso libre KEEG la vía de señalización tipo NOD directamente implicada en la activación del inflamosoma NLPR3 por medio de su vía canónica y de igual manera se analizó el mapa de señalización molecular de las enfermedades neurodegenerativas centrándonos en el estudio de las vías involucradas en la enfermedad de Parkinson. Los estudios realizados por Sun Y. S. y colaboradores en Julio de 2024 demostraron que la cadaverina tiene la capacidad de inducir diferentes respuestas celulares a nivel de sistema nervioso central por medio de su acoplamiento a receptores de histamina tipo 4 actuando como un neurotransmisor. En base a estos modelos de acoplamiento, se llevó a cabo el acoplamiento de cadaverina con el receptor acoplado a proteína G de la familia 6A (GPCR6A) implicado en la vía de señalización similar a NOD del inflamosoma NLRP3. A partir del análisis de acoplamiento con Biovia y el desarrollo de protocolo de afinidad molecular se demostró que la cadaverina tiene una energía libre de unión de -3.5 kcal/mol para unirse a GPCR6A en 18 simulaciones posibles de un total de 64 ensayos realizados. Desde una perspectiva termodinámica, este valor se sitúa por debajo del valor teórico proyectado de -5 kcal/mol cuando existen acoplamiento con residuos polares. Al analizar el mapa de interacciones bidimensionales de la pose obtenida, se observó que la estabilidad del complejo está sostenida principalmente por contactos hidrofóbicos y fuerzas de Van der Waals con los residuos ILE 229 e ILE 239, cuya naturaleza alifática confiere un entorno complementario para la cadena de carbonos lineal de la cadaverina. Adicionalmente, al tratarse de una molécula pequeña con alta flexibilidad conformacional, reduce el valor de entropía final del modelo. Estos resultados sugieren que, a diferencia de su comportamiento reportado como agonista del receptor de histamina H4R, existe una afinidad débil entre la cadaverina y el GPCR6A. Es importante destacar que el valor obtenido en este modelo de acoplamiento estático no descarta categóricamente la interacción, sino que describe un

comportamiento farmacológico de ligando reversible de baja afinidad. Debido a que el algoritmo evalúa una conformación rígida y carece del componente de solvente explícito, este valor de entropía refleja que la cadaverina podría interactuar de manera transitoria con el entorno hidrofóbico del receptor sin llegar a estabilizar la conformación cerrada y de unión permanente con este. Se requieren de estudios de dinámica molecular con solventes explícitos o ensayos de unión experimentales para llegar a la determinación de la constante de disociación real de este modelo propuesto (ilustración 33).

Con el objetivo de completar el complejo de señalización de cadaverina en la enfermedad de Parkinson y la activación del complejo Inflamosoma NLRP3 se llevó a cabo el análisis y esquematización de vías moleculares observándose que el acoplamiento de cadaverina a GPCR6A induce activación de la vía de la fosfolipasa C beta e inducción de actividad del receptor de fosfatidilinositol trifosfato a nivel de retículo endoplásmico, favoreciendo el eflujo masico de calcio iónico, induciendo la actividad de uniportador de calcio mitocondrial y de la calmodulina 6 favoreciendo la sobrecarga de calcio mitocondrial y la activación de la vía BCL-2 ligada a apoptosis celular respectivamente. así mismo, se ha descrito que el acoplamiento de este metabolito a receptores tipo toll favorece el desarrollo de daño lisosomal por bloqueo de canales iónicos de potasio favoreciendo la hiperfuncionalidad del complejo Inflamosoma NLRP3 y los procesos de mitofagia que culminan en el desarrollo de muerte celular por piroptosis (Ilustración 34).

Con el propósito de elucidar el papel de la TMAO como un metabolito clave en la activación y regulación del complejo Inflamosoma NLRP3, se llevó a cabo el desarrollo de modelos de acoplamiento molecular *in silico* entre TMAO y SIRT3, ya que se ha reportado por Tsubaki y colaboradores en 2020, la implicación de la TMAO a través de la regulación de la vía PERK/TXNIP/NLRP3, sin embargo, no se ha descrito de manera directa una vía funcional relacionada con la enfermedad de Parkinson. A partir del análisis de acoplamiento con Biovia y el desarrollo de protocolo de afinidad molecular se demostró que la TMAO tiene una baja afinidad para unirse a PERK y SIRT3 en 20 simulaciones posibles de un total de 64 ensayos realizados. El acoplamiento molecular del metabolito de la microbiota TMAO con la desacetilasa mitocondrial SIRT3 arrojó una energía libre de unión de -2.4 kcal/mol. Al

contrastar este modelo con el inhibidor de referencia sintético 3-TYP con una energía de afinidad de -6.5 kcal/mol evidencia una ausencia de afinidad termodinámica directa con el bolsillo catalítico de la enzima, debido a que carece de núcleos aromáticos necesarios para la consolidación de las interacciones esenciales de apilamiento, limitándose a contactos inespecíficos de baja energía. No obstante, este resultado es congruente con los reportes en literatura donde a partir de múltiples estudios se destaca que el TMAO promueve estrés oxidativo mitocondrial mediante la inhibición del eje SIRT3-SOD2 y la subsecuente activación del inflamosoma NLRP3. Dado que este modelo de acoplamiento estático descarta una interacción competitiva directa en el sitio activo, se sugiere que el mecanismo patológico del TMAO sobre SIRT3 opera a nivel de la represión en la expresión de la proteína o a través de una modulación indirecta en cascadas de señalización celular corriente arriba, descartando un bloqueo farmacológico directo del sitio catalítico (ilustración 35).

Con el objetivo de completar el complejo de señalización de TMAO en la enfermedad de Parkinson y la activación del complejo Inflamosoma NLRP3 se llevó a cabo el análisis y esquematización de vías moleculares observándose que el acoplamiento de TMAO a SIRT3, una enzima mitocondrial se relaciona directamente con un bloqueo de los complejos de SOD1 a nivel extracelular, induce hiperfunción de PINK-1, alteración en la actividad de parkinas e inducción de muerte celular regulada por citocromo C, caspasa 9 y 3 que favorecen la activación del complejo Inflamosoma NLRP3 por medio de vía no canónica. A su vez, la hiperfunción de PINK-1 y la disfunción de las parkinas favorece el desarrollo de un inadecuado plegamiento de la α -syn que induce al desarrollo de autofagia y mitofagia. De forma indirecta se integró que el inadecuado plegamiento de dicha proteína favorece el desarrollo de disfunción de transporte microtubular de vesículas sinápticas de forma anterógrada regulado por Kinesina-1, favoreciendo el desarrollo de acumulación retrograda de vesículas sinápticas, que, en conjunto con la lipoperoxidación regulada por especies reactivas de oxígeno, induciendo así fenómenos de excitotoxicidad regulados por glutamato y dopamina. Como último paso se observó que la interacción de la TMAO con el complejo reticular PERK favorece el desacoplamiento de la vía del thiorredoxoma, favoreciendo así la

acumulación masiva de especies reactivas de oxígeno que perpetúan el círculo vicioso de la enfermedad de Parkinson (Ilustración 36).

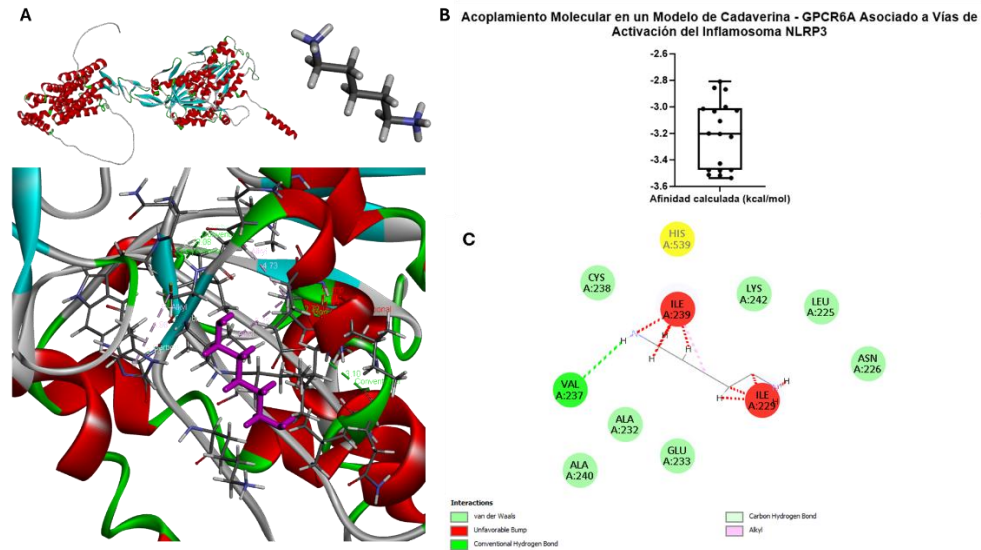


Ilustración 33. Acoplamiento Molecular de Cadaverina con GPCR6A y su implicación en la activación del Inflamosoma NLRP3. En A se muestran las estructuras tridimensionales de GPCR6A en modelo de hélices y de cadaverina (Extremo superior izquierdo), Así mismo se muestra la interacción del ligando-receptor en modelos de hélices y laminas y barras y esferas, donde se observa el bolsillo de acoplamiento entre ambas moléculas. En B se observa la distribución de la afinidad calculada a partir de un Diagrama de Cajas y Bigotes para las diferentes poses de Cadaverina en el GPCR6A. La línea central indica la mediana de la afinidad, mientras que la caja abarca el 50% central de las poses. El mejor puntaje de afinidad señalado con el bigote inferior se encuentra aproximadamente en una diferencia de Energía libre de Gibbs de -3.5 kcal/mol. La baja dispersión de los puntos y el estrecho rango entre puntuaciones de la caja indican una alta convergencia y confiabilidad del ensayo de acoplamiento. En C se muestra el mapa de interacciones moleculares bidimensional entre la cadaverina y los residuos clave del bolsillo de unión del GPCR6A. Entre las interacciones se destacan dos puentes salinos (interacciones iónicas señaladas a partir de líneas discontinuas rosadas) que se forman a partir de los grupos amino terminales de la Cadaverina con los residuos ILE A:239 e ILE A:229. También se aprecian interacciones no covalentes hidrofóbicas y de Van der Waals que estabilizan el ligando en el bolsillo y le confieren las características de unión reversible entre el ligando y receptor.

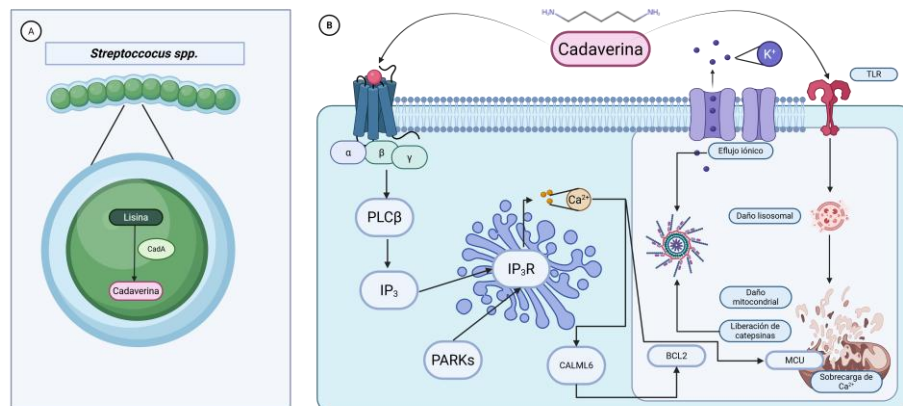


Ilustración 34. Esquematzación de vías de señalización reguladas por Cadaverina. En A se observa el complejo enzimático del *Streptococcus spp.* para la síntesis de cadaverina. En B se observan las diferentes vías moleculares activadas por la Cadaverina implicadas en la regulación del inflamosoma NLRP3 y su implicación en la PD.

Con el objetivo de evaluar la capacidad de trans migración de los diferentes metabolitos bacterianos a través de la barrera hematoencefálica, se llevaron a cabo análisis bioinformáticos de acoplamiento molecular dirigidos al estudio de transportadores endoteliales asociados a xenobióticos y fármacos. Los ensayos se efectuaron sobre ABCG2 y ABCB1 (Ilustración 37 y 38).

Los resultados del acoplamiento mostraron que los diferentes metabolitos empleados en este trabajo tienen una afinidad reversible con los sitios de unión de los receptores ABCB1 y ABCG2, lo cual puede explicar un eflujo de metabolitos a través de la barrera hematoencefálica.

En el contexto de la BHE, se ha modificado la concepción de una estructura meramente de barrera y se ha establecido que hoy en día es una estructura altamente dinámica y que se centra en el transporte de sustancias a partir de diferentes proteínas. Entre las proteínas de relevancia se encuentran diferentes transportadores de resistencia a múltiples fármacos como lo es ABCB1, quien juega un papel relevante en el eflujo de toxinas y fármacos y se ha reconocido que muchos fármacos de naturaleza agonista dopaminérgica pueden ser transportados por este tipo de MDR.

Así, en el contexto de la EP, se ha establecido la hipótesis en la cual este sistema de MDR pueden jugar un papel relevante en la progresión de la enfermedad, mediando la acumulación de toxinas, entre las que se han destacado la importancia de aquellos elementos derivados del microbioma, perdiéndose así la capacidad de expulsar neurotoxinas derivadas del microambiente bacteriano que pueden migrar secundarios a fenómenos disbióticos y el desarrollo de Leaky Gut-Leaky Brain. Es por eso que, bajo este contexto de acumulación de neurotoxinas, podría existir un priming del complejo inflamósoma NLRP3 y favorecer los fenómenos de piroptosis, lo cual lo vuelve un blanco de interés para estudios de acoplamiento molecular y posibles vías de señalización no conocidas al momento en el desarrollo de la EP (Muller, T., 2018).

En estudios experimentales citados por el autor se demostró que modelos de cebado con LPS y A β , favorecen la liberación masiva de IL-1 β y TNF α , modelos similares a los desarrollados

en nuestro modelo con cebado con LPS y metabolitos bacterianos, e induciendo la producción de interleucinas asociadas a procesos piroptóticos. Bajo este contexto documental, Alasmari y cols., resaltan que la vía del complejo inflamósoma NLRP3 juega un papel relevante en la maduración de pro IL-1 β por medio de caspasa-1 de forma activa en el parénquima cerebral.

Es altamente relevante señalar que Alasmari y cols. Destacan que el alza en la producción de estas citocinas proinflamatorias genera una cascada de regulación a la baja asociada a ABCB1, modificando la transcripción y expresión proteica de este MDR en el endotelio de la BHE, favoreciendo la acumulación de neurotoxinas y péptidos endógenos. En este contexto el análisis de acoplamiento de los diferentes metabolitos de relevancia para nuestro proyecto nos permitirá conocer la relación entre afinidad, eflujo y pérdida de la función de ABCB1 favoreciendo el establecimiento de posibles vías implicadas en el EP (Alasmari, F., Ashby, C. R., Jr, Hall, F. S., Sari, Y., & Tiwari, A. K. (2018)).

En el contexto del Inflamósoma NLRP3, Hamilton y cols., hacen referencia a que el inflamósoma es un sistema molecular complejo caracterizado por la activación a través de diferentes vías no clásicas, destacando la relevancia de los segundos mensajeros como elementos de priming a través de los fosfatidilinositoles. Hamilton destaca que ABCB1 no solo es un mecanismo estructural de eflujo a nivel de la BHE, sino que favorece la homeostasis en el contexto de lípidos inmunes, observándose en los experimentos desarrollados por el autor, que los modelos celulares con líneas RAW 264.7 mostraron que los modelos knockout para ABCB1 presentaban una activación defectuosa del complejo inflamósoma NLRP3 frente a estímulos convencionales. En su trabajo, los autores destacan que la alteración funcional de ABCB1 modifican la concentración de lípidos de cadena corta a nivel de la membrana plasmática provocando una alteración en la señalización de la proteína adaptadora de Pis TIRAP y con ello, cambios en la regulación de la vía TLR/MyD88, vía directamente relacionada con la síntesis del subcomplejo NLRP3 de este inflamósoma, frenando la transcripción de este. La alteración de ABCB1 modifica la configuración lipídica y favorece un alza en la actividad de las vías dependientes de PGE₂ y PKA, favoreciendo la fosforilación del residuo de serina 291 del subcomplejo NLRP3, generando una modificación

estructural que inhibe la función del complejo y con ello, los fenómenos de priming, mediados por NLRP3 (Hamilton, C., Olona, A., Leishman, S., MacDonald-Ramsahai, K., Cockcroft, S., Larrouy-Maumus, G., & Anand, P. K. (2022)).

A

Ligando	Afinidad mínima (Kcal/mol)	Afinidad máxima (kcal/mol)	Promedio de afinidad (kcal/mol)	Exhaustividad	Modelos de acoplamiento	Predominio de interacciones	Reversibilidad de unión
Cadaverina	-3,031	-3,687	-3,378	64	20	No covalentes	Si
Acetato de sodio	-1,958	-2,8	-2,268	64	20	No covalentes	Si
Butirato de sodio	-2,67	-3,271	-2,877	64	20	No covalentes	Si
Propionato de sodio	-2,365	-2,943	-2,596	64	20	No covalentes	Si
TMAO	-1,978	-2,268	-2,137	64	20	No covalentes	Si
P-cresol	-3,679	-4,29	-3,984	64	20	No covalentes	Si
O-cresol	-3,671	-4,476	-3,973	64	20	No covalentes	Si

B

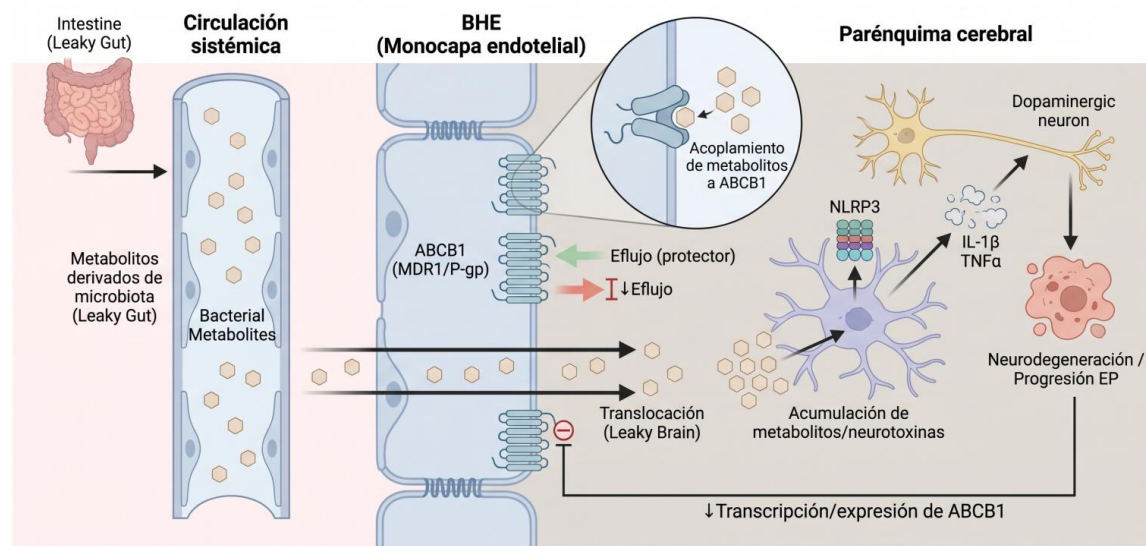


Ilustración 37. Análisis de acoplamiento molecular de metabolitos bacterianos sobre ABCB1/MDR1 y vía propuesta de translocación neurotóxica asociada a activación de NLRP3. La figura muestra dos componentes. **A)** Presenta el resumen del acoplamiento molecular entre metabolitos bacterianos de origen intestinal y el transportador ABCB1/MDR1, incluyendo cadaverina, acetato de sodio, butirato de sodio, propionato de sodio, TMAO, p-cresol y o-cresol. Se reportan la afinidad mínima, afinidad máxima, promedio de afinidad, exhaustividad, número de modelos de acoplamiento, predominio de interacciones no covalentes y reversibilidad de unión. Los valores de afinidad sugieren interacciones espontáneas de baja a moderada energía, compatibles con un acoplamiento reversible de metabolitos bacterianos sobre regiones funcionales del transportador ABCB1. **B)** Representa la vía propuesta mediante la cual metabolitos derivados de disbiosis intestinal y aumento de permeabilidad intestinal podrían alcanzar la circulación sistémica, interactuar con ABCB1 en la barrera hematoencefálica y alterar su función de eflujo protector. El modelo plantea que la saturación, inhibición funcional o disminución transcripcional de ABCB1 favorecería la translocación de metabolitos/neurotoxinas hacia el parénquima cerebral, promoviendo su acumulación y activando respuestas neuroinflamatorias mediadas por células gliales. Esta acumulación podría inducir señalización inflamatoria con participación del inflamasoma NLRP3 y liberación de mediadores como IL-1 β y TNF- α , contribuyendo a daño neuronal dopaminérgico y progresión neurodegenerativa. En conjunto, el modelo propone que ABCB1 pudiese actuar como un nodo regulador entre metabolitos bacterianos periféricos, disfunción de barrera, acumulación parenquimatosas de neurotoxinas y activación del inflamasoma NLRP3, integrando un posible mecanismo de neuroinmunobiosis asociado a progresión de la enfermedad de Parkinson.

ABCG2 comprende una proteína con función de bomba de eflujo transmembrana dependiente de ATP, la cual permite la extrusión de metabolitos endógenos, xenobióticos y toxinas fuera de la célula. Se ha reconocido que la hipofunción de dicha bomba ya sea mediante saturación metabólica, inhibición farmacológica o polimorfismos genéticos favorece la acumulación de diferentes metabolitos endógenos y toxinas, los cuales, son productos fagocitados por parte de la microglía y actúan como un sistema de puente a partir de DAMPS.

Esta ruta favorece la ruptura lisosomal y sirven como señal de oligomerización del inflamosoma NLRP3, favoreciendo los fenómenos de escisión de la pro-caspasa-1 y la maduración de IL-1 β e IL-18 asociados a piroptosis.

Se ha reconocido que la saturación de este sistema de eflujo favorece la retención de metabolitos intracelularmente induciendo estrés celular severo y favoreciendo la liberación masiva de ROS por medio de disfunción mitocondrial, favoreciendo la activación del complejo NLRP3 a través de su vía canónica.

Estos fenómenos son altamente relevantes ya que la expresión de ABCG2 es crítica a nivel de la BHE, permitiendo el aclaramiento de toxinas desde el parénquima cerebral, y cuando existe falla del sistema, estos metabolitos de origen periférico pueden penetrar la BHE y acumularse a nivel cerebral, con posterior censado de la microglía y favoreciendo la activación de la microglía mediada por la vía del complejo NLRP3 y la inducción en la actividad de la vía de NF- κ B.

Bajo esta concepción, ABCG2 juega un papel relevante para estudiar nuevas vías de señalización relacionadas al priming del complejo NLRP3 a partir de los diferentes metabolitos de interés que se relacionan en el desarrollo de este proyecto de investigación (Schulz, J. A., Hartz, A. M. S., & Bauer, B. (2023)).

Chen y cols., en 2018 destacan que la vía del inflamosoma NLRP3 asociado a ABCG2 comprende un circuito de retroalimentación donde el inflamosoma regula la maquinaria de eflujo celular, en modelos intestinales, que sirven como mecanismos de asociación entre los

fenómenos de leaky gut y leaky brain importantes para este proyecto de investigación. En su trabajo Chen demostró a través de modelos celulares con células HT-29 que la acumulación de metabolitos solubles con capacidad de precipitación, como ocurre con el ácido úrico incrementa drásticamente la expresión de ARNm y proteína de ABCG2, así como la translocación proteica desde el compartimiento intracelular a la membrana plasmática, permitiendo el eflujo de metabolitos. Cuando hay una saturación o disfunción de la maquinaria proteica de ABCG2, se desencadenan las señales canónicas de respuestas inmunes que asociación a complejos como ASC y caspasa-1.

Así mismo, Chen reconoce que diferentes metabolitos solubles actúan regulando la actividad al alza del inflamosoma NLRP3 a través de la vía de señalización regulada por TLR4/NLRP3/Caspasa-1, permitiendo el priming del complejo NLRP3 favoreciendo una expresión de la vía regulada por MYD88 y activación de NF- κ B.

Así, Chen señala que el aumento en la expresión de la maquinaria de eflujo inducido por los metabolitos solubles depende parcialmente de la activación de la vía TLR4-NLRP3 y de la vía PI3K/Akt. Estableciéndose así un sofisticado mecanismo de retroalimentación que busca mitigar fenómenos inflamatorios regulado por complejo inmunes del sistema innato.

Esta información juega un papel relevante para comprender mejor los efectos duales observados en los resultados de viabilidad celular de este proyecto y tener un mejor sustento bibliográfico que explique el papel del inflamosoma no solo como un complejo de neurodegeneración sino como un sistema de regulación del grado de inflamación en parénquima cerebral (Chen, M., Lu, X., Lu, C., Shen, N., Jiang, Y., Chen, M., & Wu, H. (2018)).

A

Ligando	Afinidad mínima (Kcal/mol)	Afinidad máxima (kcal/mol)	Promedio de afinidad (kcal/mol)	Exhaustividad	Modelos de acoplamiento	Predominio de interacciones	Reversibilidad de unión
Cadaverina	-2,953	-3,778	-351	64	20	No covalentes	Si
Acetato de sodio	-2,28	-2,654	-2,441	64	20	No covalentes	Si
Butirato de sodio	-2,787	-3,545	-3.139	64	20	No covalentes	Si
Propionato de sodio	-2,631	-3,423	-2,87	64	20	No covalentes	Si
TMAO	-2,12	-2,593	-2,373	64	20	No covalentes	Si
P-cresol	-3,883	-5,117	-4,323	64	20	No covalentes	Si
O-cresol	-4,031	-5,007	-4,323	64	20	No covalentes	Si

B

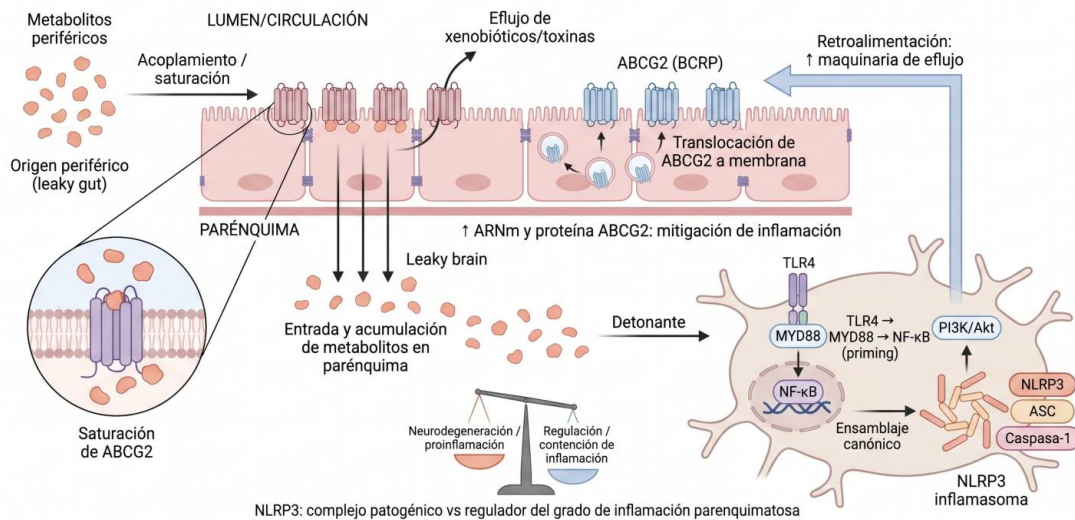


Ilustración 38. Análisis de acoplamiento molecular de metabolitos bacterianos sobre ABCG2 y vía propuesta de activación del inflammasoma NLRP3. La figura muestra dos componentes. **A)** Presenta el resumen del acoplamiento molecular entre metabolitos bacterianos de origen intestinal y el transportador ABCG2/BCRP, incluyendo cadaverina, acetato de sodio, butirato de sodio, propionato de sodio, TMAO, p-cresol y o-cresol. Se reportan la afinidad mínima, afinidad máxima, promedio de afinidad, exhaustividad, número de modelos de acoplamiento, predominio de interacciones no covalentes y reversibilidad de unión. En conjunto, los valores de afinidad sugieren interacciones espontáneas de baja a moderada energía, compatibles con un posible acoplamiento reversible de metabolitos bacterianos sobre regiones funcionales del transportador ABCG2. **B)** Representa la vía propuesta mediante la cual metabolitos bacterianos periféricos podrían modular la barrera hematoencefálica y favorecer la activación inflamatoria parenquimatosa. El modelo plantea que la acumulación luminal/circulante de metabolitos derivados de disbiosis intestinal podría saturar o modificar la actividad de ABCG2, alterando el eflujo de xenobióticos/toxinas y favoreciendo su entrada al parénquima cerebral. Esta acumulación actuaría como detonante de señalización inflamatoria mediada por TLR4/MYD88/NF-κB, promoviendo el priming transcripcional de componentes del inflammasoma. Posteriormente, la activación de PI3K/Akt y el ensamblaje canónico de NLRP3/ASC/Caspasa-1 favorecerían una respuesta inflamatoria parenquimatosa. En conjunto, el modelo propone que ABCG2 pudiese actuar como punto regulador entre exposición metabólica periférica, disfunción de barrera, acumulación de metabolitos bacterianos y activación del inflammasoma NLRP3, integrando un posible eje de neuroinmunobiosis asociado a neuroinflamación y neurodegeneración.

Conclusiones

En los diferentes ensayos experimentales se observó que la caspasa-1 tiene un efecto citotóxico al adicionarse a medios de cultivo constituidos por macrófagos RAW 264.7. Se observó que bajo los cotratamientos con ácidos grasos de cadena corta como acetato el efecto citotóxico de la caspasa-1 incrementaba significativamente, mientras que en el caso del cotratamiento con butirato, el efecto citoprotector era estadísticamente significativo. Se observó que el efecto una mezcla de ácidos grasos de cadena corta tiene un efecto citotóxico estadísticamente significativo en macrófagos. Se llevó a cabo el cálculo de la concentración inhibitoria media de caspasa-1 basado en los resultados obtenidos con estos ensayos, obteniéndose que una concentración igual a 7.5 mg es capaz de producir la muerte celular en un 50% (Ilustración 21).

Los ensayos de estimulación con caspasa-1 en cocultivo de células RAW 264.7 y neuroblastoma SK-N-SH fenotipo neuroblástico mostró que la caspasa presenta un fenómeno citoprotector en estos ensayos. Así mismo las curvas dosis respuesta de los diferentes cotratamientos con AGCC demostraron que butirato presenta un mecanismo de acción dual en el que el empleo de concentraciones de 5 μ g presentan un efecto citoprotector, mientras que a concentraciones de 50 μ g presentaba un patrón de incremento en la citotoxicidad. Se observó una correlación positiva fuerte entre los efectos citoprotectores de tratamientos con acetato y butirato. Ensayos con propionato no demostraron cambios significativos en el porcentaje de viabilidad celular en estos ensayos (Ilustración 22).

Los ensayos realizados con estimulación de ácidos grasos de cadena corta como estímulo exclusivo en macrófagos RAW 264.7 mostraron que la modulación Dosis dependiente de la viabilidad celular mostraba un patrón de correlación positiva fuerte para los ensayos realizados con acetato y butirato, observándose en la curva dosis-respuesta nuevamente un patrón dual a dosis de 5 y 250 μ g favoreciendo la citoprotección de esta estirpe celular (ilustración 5). Respecto a los ensayos en cocultivo, se observó una correlación positiva fuerte en tratamientos con acetato y butirato, evidenciándose también en estos ensayos su efecto citoprotector tanto para células inmunes y de fenotipo neuroblástico (ilustración 23 y 24).

La estimulación de macrófagos RAW 264.7 con LPS de *P. mirabilis* y *A. muciniphila* demostraron un efecto citotóxico dosis dependiente. Así mismo se observó que el empleo de tratamiento con AGCC presentaron un patrón de correlación positiva fuerte en los diferentes ensayos realizados, lo que sugiere su efecto citoprotector frente a diferentes endotoxinas de origen bacteriano. En el contexto de ensayos de cocultivo, se demostró que los ensayos con LPS a dosis de 5 µg presentaron un efecto citoprotector, evidenciándose un efecto dual de la actividad de estas endotoxinas. Así mismo se observó nuevamente el patrón de correlación positiva fuerte en los ensayos de cotratamiento con AGCC demostrándose un efecto citoprotector estadísticamente significativo tanto para células inmunológicas y de fenotipo neuroblástico (Ilustración 25 a 28).

Los ensayos realizados con cadaverina y TMAO en macrófagos RAW 264.7 mostraron un efecto dual a diferentes concentraciones estudiadas, siendo la cadaverina citotóxica a concentraciones de 5 y 50 µg y mostrando un efecto citoprotector a concentraciones de 250 µg; así mismo, los ensayos con TMAO demostraron un efecto dual en la curva dosis respuesta, teniendo un efecto citotóxico a concentraciones de 5 y 250 µg y un efecto citoprotector a dosis de 50 µg. El análisis de los ensayos bajo coestimulo con ácidos grasos de cadena corta, muestran una tendencia dual en las curvas dosis respuesta, siguiendo los mismos patrones previamente mencionados para la cadaverina, mientras que en los ensayos con TMAO, se observó que los ensayos con butirato y la mezcla de los AGCC tienen un efecto citoprotector lineal dosis dependiente. En el análisis de regresión lineal se observó un patrón de correlación positiva fuerte en los ensayos con propionato acetato y butirato. En los ensayos realizados en cocultivo, se observó un patrón dual dosis dependiente en estos ensayos con cadaverina y caspasa, presentando efectos citoprotectores a concentraciones de 5 µg en ambos ensayos. así mismo los ensayos de coestimulación con AGCC muestran una tendencia a la citoprotección en ambos ensayos, siendo el propionato en ensayos con TMAO aquel que muestra una respuesta con mayor tendencia lineal. El análisis de correlación demostró que solo los ensayos con butirato tienen un patrón de correlación positiva fuerte estadísticamente significativo, mientras que, en los ensayos con cadaverina, dicho patrón se

presentó en ensayos con acetato y butirato. Si bien existe una correlación positiva en los ensayos con propionato, no son estadísticamente significativos (ilustración 29 a 32).

A partir del modelado *in silico* de acoplamiento molecular se puede concluir que tanto los AGCC y otros metabolitos derivados de la microbiota intestinal asociados a disbiosis en enfermedad de Parkinson como la cadaverina y la TMAO juegan un papel relevante en la regulación a la baja o a la alta del complejo Inflamosoma NLRP3 comprendiéndose así la relación intrínseca de los fenómenos disbióticos en la regulación de los diferentes procesos fisiopatológicos asociados a la Enfermedad de Parkinson desde una perspectiva integral (Ilustración 33 a 36).

A sí mismo, los diferentes transportadores endoteliales asociados a barrera hematoencefálica podrían jugar un papel relevante en el flujo de metabolitos bacterianos desde torrente sanguíneo hacia parénquima cerebral y con ello un papel relevante en la regulación a la baja o al alta del complejo Inflamosoma NLRP3 comprendiéndose así la interacción entre los sistemas de transporte y la acumulación de derivados metabólicos bacterianos a nivel del parénquima cerebral (Ilustración 37 y 38).

Referencias bibliográficas

- Aho, V. T. E., Houser, M. C., Pereira, P. A. B., Chang, J., Rudi, K., Paulin, L., Hertzberg, V., Auvinen, P., Tansey, M. G., & Scheperjans, F. (2021). Relationships of gut microbiota, short-chain fatty acids, inflammation, and the gut barrier in Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00427-6>
- Alasmari, F., Ashby, C. R., Jr, Hall, F. S., Sari, Y., & Tiwari, A. K. (2018). Modulation of the ATP-Binding Cassette B1 Transporter by Neuro-Inflammatory Cytokines: Role in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 658. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00658>
- Anand, N., Gorantla, V. R., & Chidambaram, S. B. (2023). The Role of Gut Dysbiosis in the Pathophysiology of Neuropsychiatric Disorders. *Cells*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/cells12010054>
- Argimon Pallás, J. M., et al. (2019). *Métodos de investigación clínica y epidemiológica*. España: Elsevier.
- Bai, F., You, L., Lei, H., & Li, X. (2024). Association between increased and decreased gut microbiota abundance and Parkinson's disease: A systematic review and subgroup meta-analysis. *Experimental Gerontology*, 191. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2024.112444>
- Banerjee, S. K., Chatterjee, A., Gupta, S., & Nagar, A. (2022). Activation and Regulation of NLRP3 by Sterile and Infectious Insults. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.896353>
- Berthouzoz, E., Lazarevic, V., Zekeridou, A., Castro, M., Debove, I., Aybek, S., Schrenzel, J., Burkhard, P. R., & Fleury, V. (2023). Oral and intestinal dysbiosis in Parkinson's disease. *Revue Neurologique*, 179(9), 937–946. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2022.12.010>
- Bonnechère, B., Amin, N., & van Duijn, C. (2022). What Are the Key Gut Microbiota Involved in Neurological Diseases? A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22). <https://doi.org/10.3390/ijms232213665>
- Celentano, D., et al. (2019). *Epidemiología*. España: Elsevier.

- Chen, M., Lu, X., Lu, C., Shen, N., Jiang, Y., Chen, M., & Wu, H. (2018). Soluble uric acid increases PDZK1 and ABCG2 expression in human intestinal cell lines via the TLR4-NLRP3 inflammasome and PI3K/Akt signaling pathway. *Arthritis Research & Therapy*, 20(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1512-4>
- Chen, S. J., Chen, C. C., Liao, H. Y., Lin, Y. T., Wu, Y. W., Liou, J. M., Wu, M. S., Kuo, C. H., & Lin, C. H. (2022). Association of Fecal and Plasma Levels of Short-Chain Fatty Acids with Gut Microbiota and Clinical Severity in Patients with Parkinson Disease. *Neurology*, 98(8), E848–E858. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000013225>
- Cheng, Y., Tan, G., Zhu, Q., Wang, C., Ruan, G., Ying, S., Qie, J., Hu, X., Xiao, Z., Xu, F., Chen, L., Chen, M., Pei, Y., Zhang, H., Tian, Y., Chen, D., Liu, X., Huang, H., & Wei, Y. (2023). Efficacy of fecal microbiota transplantation in patients with Parkinson's disease: Clinical trial results from a randomized, placebo-controlled design. *Gut Microbes*, 15(2). <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2284247>
- Choi, J. G., Kim, N., Ju, I. G., Eo, H., Lim, S. M., Jang, S. E., Kim, D. H., & Oh, M. S. (2018). Oral administration of *Proteus mirabilis* damages dopaminergic neurons and motor functions in mice. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19646-x>
- Codolo, G., Plotegher, N., Pozzobon, T., Brucale, M., Tessari, I., Bubacco, L., & de Bernard, M. (2013). Triggering of Inflammasome by Aggregated α -Synuclein, an Inflammatory Response in Synucleinopathies. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055375>
- Costa, H. N., Esteves, A. R., Empadinhas, N., & Cardoso, S. M. (2023). Parkinson's Disease: A Multisystem Disorder. *Neuroscience Bulletin*, 39(1), 113–124. <https://doi.org/10.1007/s12264-022-00934-6>
- Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017). The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 46(1), 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.09.007>

- Fu, J., & Wu, H. (2023). Structural Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Assembly and Activation. *Annual Review of Immunology*, 41, 301–316. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-081022-021207>
- Hamilton, C., Olona, A., Leishman, S., MacDonald-Ramsahai, K., Cockcroft, S., Larrouy-Maumus, G., & Anand, P. K. (2022). NLRP3 Inflammasome Priming and Activation Are Regulated by a Phosphatidylinositol-Dependent Mechanism. *ImmunoHorizons*, 6(8), 642–659. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.2200058>
- Hawkes, C. H., del Tredici, K., & Braak, H. (2007). Parkinson's disease: A dual-hit hypothesis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 33(6), 599–614. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00874.x>
- Heravi, F. S., Naseri, K., & Hu, H. (2023). Gut Microbiota Composition in Patients with Neurodegenerative Disorders (Parkinson's and Alzheimer's) and Healthy Controls: A Systematic Review. *Nutrients*, 15(20). <https://doi.org/10.3390/nu15204365>
- Hirayama, M., & Ohno, K. (2021). Parkinson's Disease and Gut Microbiota. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 77, 28–35. <https://doi.org/10.1159/000518147>
- Holtkamp, C., Koos, B., Unterberg, M., Rahmel, T., Bergmann, L., Bazzi, Z., Bazzi, M., Bukhari, H., Adamzik, M., & Rump, K. (2019). A novel understanding of postoperative complications: In vitro study of the impact of propofol on epigenetic modifications in cholinergic genes. *PLoS ONE*, 14(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217269>
- Isa, A. I. (2024). Modulation of M1/M2 Cytokines and Inflammatory Enzymes by Persicaria Species Leaf Extracts in Lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 Cell Macrophages. *Iranian Journal of Immunology*, 21(3), 212–224. <https://doi.org/10.22034/iji.2024.102221.2780>
- Jia, X., Chen, Q., Zhang, Y., & Asakawa, T. (2023). Multidirectional associations between the gut microbiota and Parkinson's disease, updated information from the perspectives of humoral pathway, cellular immune pathway and neuronal pathway. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1296713>

- Kaur, G., Behl, T., Bungau, S., Kumar, A., Uddin, M. S., Mehta, V., Zengin, G., Mathew, B., Shah, M. A., & Arora, S. (2020). Dysregulation of the Gut-Brain Axis, Dysbiosis and Influence of Numerous Factors on Gut Microbiota Associated Parkinson's Disease. *Current Neuropharmacology*, 19(2), 233–247. <https://doi.org/10.2174/1570159x18666200606233050>
- Kim, C., Ho, D. H., Suk, J. E., You, S., Michael, S., Kang, J., Lee, S. J., Masliah, E., Hwang, D., Lee, H. J., & Lee, S. J. (2013). Neuron-released oligomeric α -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms2534>
- Le, W., Reichmann, H., Yang, X., Zhao, Y., & Zhu, G. (n.d.). Interactions between gut microbiota and Parkinson's disease: The role of microbiota-derived amino acid metabolism.
- Lyte, M. (2011). Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *BioEssays*, 33(8), 574–581. <https://doi.org/10.1002/bies.201100024>
- mac Sweeney, E., Chiochio, I., Mandrone, M., Sanna, C., Bilo, F., Maccarinelli, G., Popescu, V. S., Pucci, M., Morandini, S., Memo, M., Uberti, D. L., Borgese, L., Trincia, S., Poli, F., Mastinu, A., & Abate, G. (2024). Exploring the Anti-Inflammatory and Antioxidant Potential, Metabolite Composition and Inorganic Profile of *Cistus monspeliensis* L. Aerial Parts and Roots. *Antioxidants*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/antiox13070753>
- Martínez-Ramírez, D., Rodríguez-Violante, M., Velázquez-Ávila, E. S., Cervantes-Arriaga, A., González-Cantú, A., Corona, T., & Velásquez-Pérez, L. (2020). Incidencia y distribución geográfica de la enfermedad de Parkinson en México. *Salud Pública de México*, 62(6), 873–875. <https://doi.org/10.21149/11750>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Mou, Y., Du, Y., Zhou, L., Yue, J., Hu, X., Liu, Y., Chen, S., Lin, X., Zhang, G., Xiao, H., & Dong, B. (2022). Gut Microbiota Interact With the Brain Through Systemic Chronic Inflammation: Implications on Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Aging. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.796288>

Müller, T. (2018). ABCB1: Is there a role in the drug treatment of Parkinson's disease? *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 14(2), 127–129. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1416096>

Pahnke, J., Fröhlich, C., Krohn, M., Schumacher, T., & Paarmann, K. (2013). Impaired mitochondrial energy production and ABC transporter function-A crucial interconnection in dementing proteopathies of the brain. *Mechanisms of Ageing and Development*, 134(10), 506–515. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.08.007>

Pajares, M., I Rojo, A., Manda, G., Boscá, L., & Cuadrado, A. (2020). Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/cells9071687>

Pan-Montojo, F., Schwarz, M., Winkler, C., Arnhold, M., O'Sullivan, G. A., Pal, A., Said, J., Marsico, G., Verbavatz, J. M., Rodrigo-Angulo, M., Gille, G., Funk, R. H. W., & Reichmann, H. (2012). Environmental toxins trigger PD-like progression via increased alpha-synuclein release from enteric neurons in mice. *Scientific Reports*, 2. <https://doi.org/10.1038/srep00898>

Pascale, A., Marchesi, N., Govoni, S., & Barbieri, A. (2020). Targeting the microbiota in pharmacology of psychiatric disorders. *Pharmacological Research*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104856>

Pellegrini, C., D'Antongiovanni, V., Miraglia, F., Rota, L., Benvenuti, L., Di Salvo, C., Testa, G., Capsoni, S., Carta, G., Antonioli, L., Cattaneo, A., Blandizzi, C., Colla, E., & Fornai, M. (2022). Enteric α -synuclein impairs intestinal epithelial barrier through caspase-1-inflammasome signaling in Parkinson's disease before brain pathology. *NPJ Parkinson's Disease*, 8(1), 9. <https://doi.org/10.1038/s41531-021-00263-x>

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.937555>

- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A. E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Qiao, G., Lv, T., Zhang, M., Chen, P., Sun, Q., Zhang, J., & Li, Q. (2020). β -hydroxybutyrate (β -HB) exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages in *Liza haematocheila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 107, 444–451. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.11.005>
- Qin, L., Wu, X., Block, M. L., Liu, Y., Breese, G. R., Hong, J. S., Knapp, D. J., & Crews, F. T. (2007). Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *GLIA*, 55(5), 453–462. <https://doi.org/10.1002/glia.20467>
- Rutsch, A., Kantsjö, J. B., & Ronchi, F. (2020). The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host Inflammasome Influence Brain Physiology and Pathology. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604179>
- Salim, S., Ahmad, F., Banu, A., & Mohammad, F. (2023). Gut microbiome and Parkinson's disease: Perspective on pathogenesis and treatment. *Journal of Advanced Research*, 50, 83–105. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.10.013>
- Schulz, J. A., Hartz, A. M. S., & Bauer, B. (2023). ABCB1 and ABCG2 Regulation at the Blood-Brain Barrier: Potential New Targets to Improve Brain Drug Delivery. *Pharmacological Reviews*, 75(5), 815–853. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000025>
- Shandilya, S., Kumar, S., Kumar Jha, N., Kumar Kesari, K., & Ruokolainen, J. (2022). Interplay of gut microbiota and oxidative stress: Perspective on neurodegeneration and neuroprotection. *Journal of Advanced Research*, 38, 223–244. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.09.005>
- Shi, J., Wang, Y., Chen, D., Xu, X., Li, W., Li, K., He, J., Su, W., & Luo, Q. (2023). The alteration of intestinal mucosal α -synuclein expression and mucosal microbiota in Parkinson's disease. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(5–6), 1917–1929. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12410-w>

Socala, K., Doboszewska, U., Szopa, A., Serefko, A., Włodarczyk, M., Zielińska, A., Poleszak, E., Fichna, J., & Wlaż, P. (2021). The role of microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric and neurological disorders. *Pharmacological Research*, 172. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105840>

Sun, S. Y., Yin, X., Ma, J. Y., Wang, X. L., Xu, X. M., Wu, J. N., Zhang, C. W., Lu, Y., Liu, T., Zhang, L., Kang, P. P., Wu, B., & Zhou, G. K. (2024). Histamine H4 receptor and TRPV1 mediate itch induced by cadaverine, a metabolite of the microbiome. *Molecular Pain*, 20, 17448069241272149. <https://doi.org/10.1177/17448069241272149>

Tsubaki, H., Tooyama, I., & Walker, D. G. (2020). Thioredoxin-Interacting Protein (TXNIP) with Focus on Brain and Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9357. <https://doi.org/10.3390/ijms21249357>

Varesi, A., Campagnoli, L. I. M., Fahmideh, F., Pierella, E., Romeo, M., Ricevuti, G., Nicoletta, M., Chirumbolo, S., & Pascale, A. (2022). The Interplay between Gut Microbiota and Parkinson's Disease: Implications on Diagnosis and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20). <https://doi.org/10.3390/ijms232012289>

Villa Romero, A., et al. (2012). *Epidemiología y estadística en salud pública*. México: McGraw Hill.

Wallen, Z. D., Demirkan, A., Twa, G., Cohen, G., Dean, M. N., Standaert, D. G., Sampson, T. R., & Payami, H. (2022). Metagenomics of Parkinson's disease implicates the gut microbiome in multiple disease mechanisms. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34667-x>

Weis, S., Meisner, A., Schwiertz, A., Unger, M. M., Becker, A., Faßbender, K., Schnell, S., Schäfer, K. H., & Egert, M. (2021). Association between Parkinson's disease and the faecal eukaryotic microbiota. *NPJ Parkinson's Disease*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41531-021-00244-0>

Zhang, F., Yue, L., Fang, X., Wang, G., Li, C., Sun, X., Jia, X., Yang, J., Song, J., Zhang, Y., Guo, C., Ma, G., Sang, M., Chen, F., & Wang, P. (2020). Altered gut microbiota in

Parkinson's disease patients/healthy spouses and its association with clinical features. *Parkinsonism and Related Disorders*, 81, 84–88.
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2020.10.034>

Zhang, X., Tang, B., & Guo, J. (2023). Parkinson's disease and gut microbiota: From clinical to mechanistic and therapeutic studies. *Translational Neurodegeneration*, 12(1).
<https://doi.org/10.1186/s40035-023-00392-8>

Zhu, M., Liu, X., Ye, Y., Yan, X., Cheng, Y., Zhao, L., Chen, F., & Ling, Z. (2022). Gut Microbiota: A Novel Therapeutic Target for Parkinson's Disease. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.937555>