



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
SOBRE LOS RECURSOS NATURALES**

**Efecto del enriquecimiento ambiental
sobre la microbiota intestinal de ratas sometidas
a una lesión cerebral traumática pediátrica**

TESIS

**que como requisito para obtener
el grado profesional de**

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN ECOLOGÍA INTEGRATIVA**

presenta

Lic. en Biotecnología

Jonathan Josué Zamudio Flores

Directoras de tesis:

D.C. Esperanza Meléndez Herrera

D.C. Naima Lajud Ávila

ABREVIATURAS

ACTH: Corticotropina

ANS: Sistema nervioso autónomo

CA: Cuerno de Amón

CCI: Impacto cortical controlado

CEA: Área de cobertura celular

CRF: Hormona liberadora de corticotropina

EE: Enriquecimiento ambiental

FPI: Lesión por percusión de fluido

GD: Giro dentado

GLC: Capa de células granulares

Hip: Hipocampo

HPA: Eje hipotálamo-hipofisario-adrenal

LEfSe: Tamaño del efecto de análisis discriminante lineal

Ma: Núcleo magnocelular

Ms: Núcleo septomedial

MWM: Laberinto acuático de Morris

NMDS: Escalamiento multidimensional no métrico

PB: Buffer de fosfatos

PFA: Paraformaldehído

PND: Día post-natal

PTLp: Corteza posterior parietal

RAP: Corteza retrosplenial

SCFAs: Ácidos grasos de cadena corta

STD: Condiciones estándar de bioterio

TBI: Lesión cerebral traumática

WD: Lesión por caída de peso

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Evaluación neurológica aguda y parámetros de control.

Tabla 2. Características morfológicas de la microglia en la corteza.

Tabla 3. Características morfológicas de la microglia en la región CA1 del hipocampo.

Tabla 4. Características morfológicas de la microglia en la región del hilus hipocampal.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Red anatómica y funcional de navegación espacial (imagen propia basada en Solari & Hangya, 2018; modelos de las estructuras cerebrales generadas en Allen Brain Map, Allen Institute).

Figura 2. Ejemplo de estrategias de orientación espacial (Modificado de Lohmann, et al., 2008).

Figura 3. Estructura y circuitos sinápticos del hipocampo en roedores. (Tomada y modificada de Camacho-Ugarte, et al., 2020).

Figura 4. Diagrama esquematizado del CCI neumático. (Tomado y modificado de Xiong, et al., 2013).

Figura 5. Eje microbiota-intestino-cerebro (tomado y modificado de Cryan & Dinan, 2012).

Figura 6. Grupos experimentales.

Figura 7. Esquema del diseño experimental.

Figura 8. Imágenes de las condiciones de alojamiento.

Figura 9. Desempeño cognitivo en el MWM.

Figura 10. Desempeño cognitivo en el MWM de ratas SHAM e intactas.

Figura 11. Análisis de activación microglial en la corteza.

Figura 12. Análisis de activación microglial en la región CA1 del hipocampo.

Figura 13. Análisis de activación microglial en la región del hilus hipocampal.

Figura 14. Diversidad alfa de la microbiota intestinal.

Figura 15. Diversidad beta de la microbiota intestinal.

Figura 16. Abundancia relativa a nivel phylum y género.

Figura 17. Análisis microbiano cecal basado en LEfSe a nivel género.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN..... | 7 |
| ABSTRACT | 8 |
| INTRODUCCIÓN..... | 9 |
| MARCO TEÓRICO..... | 11 |
| APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL..... | 11 |
| EL HIPOCAMPO Y SU RELACIÓN CON EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA..... | 15 |
| LESIONES CEREBRALES TRAUMÁTICAS..... | 17 |
| MODELOS ANIMALES DE TBI..... | 20 |
| EL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL COMO MODELO DE REHABILITACIÓN DESPUÉS DE UNA TBI | 22 |
| LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EL EJE INTESTINO-CEREBRO | 24 |
| ANTECEDENTES DIRECTOS | 27 |
| JUSTIFICACIÓN | 29 |
| HIPÓTESIS | 29 |
| OBJETIVOS | 30 |
| GENERAL | 30 |
| PARTICULARES..... | 30 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| ANIMALES | 30 |
| IMPACTO CORTICAL CONTROLADO..... | 32 |
| EVALUACIÓN NEUROLÓGICA AGUDA..... | 33 |
| ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL | 33 |
| LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS | 34 |
| MUESTREO DE MATERIA CECAL, EXTRACCIÓN DE DNA Y ANÁLISIS DE MICROBIOTA | 35 |
| PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO | 36 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICOS | 38 |
| RESULTADOS | 39 |
| EVALUACIÓN NEUROLÓGICA AGUDA Y PARÁMETROS DE CONTROL | 39 |
| DESEMPEÑO COGNITIVO EN EL MWM..... | 41 |
| Efecto del EE y la TBI sobre el aprendizaje y la memoria espacial..... | 41 |
| Efecto de la craneotomía y los procedimientos quirúrgicos sobre el aprendizaje y la memoria espacial | 42 |

| | |
|---|----|
| EFFECTO DEL EE SOBRE LA MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES DESPUÉS DE UNA TBI EN ANIMALES JUVENILES..... | 43 |
| Corteza | 43 |
| Región CA1 del hipocampo | 45 |
| Región hilus del hipocampo | 48 |
| EFFECTO DE LA TBI Y EL EE SOBRE LA DIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA INTESTINAL | 50 |
| Diversidad alfa y beta..... | 50 |
| Abundancia relativa a nivel de phylum y género | 53 |
| Análisis de abundancia diferencial entre taxones | 55 |
| DISCUSIÓN..... | 57 |
| CONCLUSIÓN..... | 63 |
| REFERENCIAS | 64 |

RESUMEN

Se ha demostrado que la exposición al enriquecimiento ambiental (EE) en ratas promueve la recuperación cognitiva después de una lesión cerebral traumática pediátrica (TBI). Investigaciones previas indican que tanto la TBI como el EE modifican la composición de la microbiota intestinal de manera independiente. Por esto, se ha propuesto que la microbiota podría jugar un papel crucial en los mecanismos subyacentes a los efectos benéficos del EE. Para probar esta hipótesis, se sometió a ratas macho de la cepa Sprague-Dawley a un impacto cortical controlado (impacto de 2,5 mm a 4 m/s) o permanecieron como controles (SHAM) al día 21 posnatal (PND 21). Luego, fueron asignadas aleatoriamente a condiciones de alojamiento estándar (STD) o EE con diferentes escenarios de cohabitación y se les dejó recuperar durante 14 días. El desempeño cognitivo se evaluó en la prueba del laberinto acuático de Morris (MWM) al PND 35-40. Después de las pruebas de conducta, las ratas se sacrificaron para evaluar la morfología microglial mediante una inmunotinción con IBA1 y se les extrajo el contenido cecal. Se secuenció el ADN microbiano intestinal y se analizó la diversidad alfa y beta, así como la abundancia relativa. Los resultados mostraron que las ratas TBI+STD presentaron un déficit cognitivo en el MWM. El desempeño del grupo TBI+EE no fue diferente al de los animales SHAM, pero tampoco al del grupo TBI+STD. Los animales sometidos a EE sin contacto con animales SHAM tuvieron un desempeño significativamente mejor que el de los animales TBI+STD. La TBI aumentó la activación microglial en la subregión hilus del hipocampo y en la corteza ipsilateral. El EE también aumentó el porcentaje de células IBA1+ activadas en CA1 en animales con TBI, mientras que se redujo en la corteza en animales en cohabitación con SHAM. Además, en EE, los animales SHAM tuvieron un aumento de diversidad bacteriana alfa y beta y una reducción en los animales TBI. Un análisis de abundancia bacteriana diferencial mostró

a los géneros *Lactobacillus* y *Eubacterium* y a las familias Prevotellaceae y Lachnospiraceae como potenciales blancos terapéuticos. Estos resultados sugieren que la EE restaura el desempeño cognitivo que fue afectado por la TBI. La exposición al EE también modula la activación microglial de manera diferencial y modifica la composición de la microbiota intestinal, lo que puede explicarse por el papel de la microbiota en la respuesta inmunitaria.

Palabras clave: Traumatismo craneoencefálico, lesión cerebral pediátrica, neurorehabilitación, eje intestino-cerebro, neuroinflamación

ABSTRACT

Exposure of rats to environmental enrichment (EE) has been found to promote cognitive recovery following a pediatric traumatic brain injury (TBI). Previous studies have shown that both TBI and EE independently modify gut microbiota composition. Thus, it has been proposed that gut microbiota might play a crucial role in the mechanisms underlying the beneficial effects of EE. To investigate this hypothesis, post-natal day 21 (PND 21) male Sprague-Dawley rats underwent either a controlled cortical impact (2.5 mm impact at 4 m/s) or sham surgery. They were then randomly assigned to standard (STD) or EE housing conditions at different co-housing settings and allowed to recover for 14 days. Cognitive performance was evaluated in the Morris water maze test (MWM) on PND 35-40. After behavioral testing, rats were sacrificed for assessment of microglial morphology by IBA1 immunostaining and caecal content extraction. Gut microbial DNA was sequenced and alpha and beta diversity as well as relative abundance were analyzed. Results showed that TBI+STD rats exhibited cognitive impairments in the MWM. Animals underwent to EE with no SHAM cohabitants had a significantly better performance than TBI+STD animals. TBI increased microglial activation in the ipsilateral hippocampal hilus subregion and cortex. EE also increased percentage of activated IBA1+ cells in CA1 in TBI

animals, while in cortex it was reduced in animals co-housed with non-injured mates. Additionally, in EE, SHAM animals had increased alpha and beta bacterial diversity while TBI decreased them. A differential abundance analysis showed *Lactobacillus* and *Eubacterium* genera and Prevotellaceae and Lachnospiraceae families as potential therapeutic targets. These results suggest that EE restores cognitive performance impaired by TBI. Interestingly, EE exposure also modulates microglial activation differentially and modifies gut microbiota composition, which may be explained by the role of microbiota in the immune response.

Key words: Head trauma, pediatric brain injury, neurorehabilitation, gut-brain axis, neuroinflammation

INTRODUCCIÓN

Los animales en vida silvestre son vulnerables a sufrir traumatismos craneoencefálicos, ya sea por luchas territoriales entre individuos adultos o ataques a las crías por caídas o por depredadores (Ackermans et al., 2021). Estos impactos pueden causar lesiones cerebrales traumáticas (traumatic brain injury, TBI, por sus siglas en inglés), que ocasionan déficits cognitivos debido a que dañan estructuras esenciales para procesos como el aprendizaje y la memoria (Ackermans et al., 2021; Centers for Disease Control and Prevention, 2015). Además, se sabe que estos déficits son mayores si la TBI se presenta en etapas tempranas del desarrollo, lo que compromete la supervivencia de los individuos durante su vida tardía al dificultar la ejecución de actividades como la búsqueda de recursos y estrategias de escape y evasión de depredadores (Goldberg et al., 2010; Semple et al., 2016). Debido a lo discapacitante de estas lesiones, se requieren estrategias efectivas para tratar fauna lesionada y poderla re-introducir en su hábitat.

El enriquecimiento ambiental (environmental enrichment, EE, por sus siglas en inglés), es un modelo de rehabilitación en roedores que consiste en proveer a los individuos un entorno abundante en estímulos sensoriales, sociales y motores (Fuller, 2018). El EE ha demostrado disminuir los efectos deletéreos de la TBI (de la Tremblaye et al., 2017; Minchew et al., 2021; Penn et al., 2009). Sin embargo, aún no se determinan los mecanismos que subyacen el efecto del EE. También se ha reportado que el EE modifica la composición de la microbiota intestinal de forma positiva, previniendo la aparición de distintas patologías (Saladrigas-García et al., 2021). Por ejemplo, Fuller et al. (2018), reportaron que el EE incrementa la diversidad bacteriana en ratones con cáncer de colon.

La microbiota intestinal es la comunidad de microorganismos residentes dentro o sobre los individuos y está asociada al funcionamiento del cerebro (Chen et al., 2013). Se sabe que la microbiota intestinal regula muchas funciones metabólicas, inmunológicas y nerviosas (Nicholson, et al., 2018; Rice, et al., 2019). Cualquier alteración en la composición de la microbiota normal del intestino, se conoce como “disbiosis” (Iebba et al., 2016). La disbiosis intestinal puede inducir cambios en la actividad cerebral (Ait-Belgnaoui et al., 2014; Wang & Wang, 2016; Zhu et al., 2018). En humanos, la disbiosis intestinal ha sido relacionada con neuropatologías como el trastorno del espectro autista, depresión, ansiedad, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson (Dinan & Cryan, 2013; Matharu et al., 2019; Rice et al., 2019; Rinninella et al., 2019; Urban et al., 2020). Se ha propuesto que la relación entre la microbiota intestinal y el cerebro está mediada por una compleja red de comunicación molecular de naturaleza neuroendocrina e inmunitaria llamada “eje microbiota-intestino-cerebro” (Cryan & Dinan, 2012).

Se ha demostrado que las TBI inducen una disbiosis intestinal (Celorrio & Friess, 2022). Esta disbiosis puede perdurar hasta varios meses después de la lesión (Urban et al., 2020). Se ha sugerido que la restauración de la composición normal de la microbiota intestinal evita, y hasta cierto grado, revierte los efectos de la TBI sobre el desempeño cognitivo (Rice et al., 2019; Treangen et al., 2018). Sin embargo, aún no existen estrategias efectivas para promover la restauración del equilibrio del eje microbiota-intestino-cerebro. Por esta razón, es pertinente proponer a la microbiota intestinal como un posible mediador del efecto del EE sobre la recuperación funcional después de una TBI. Por tanto, este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto del EE sobre la microbiota intestinal y su relación con los déficits en el desempeño cognitivo después de una TBI pediátrica en ratas.

MARCO TEÓRICO

APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL

El aprendizaje puede definirse como el proceso biológico de adquisición de conocimiento que se ve reflejado en cambios en la conducta de los individuos, a menudo como resultado de sus experiencias (Lafontaine, 2020; Melfi et al., 2020). De acuerdo con Tolman (1948), el aprendizaje espacial es una capacidad inherente de muchas especies animales de procesar y utilizar la información del entorno para ubicarse y adquirir conductas de organización y orientación (Silvers et al., 2003). Esta función de adquisición informativa se caracteriza por la construcción de una representación mental del ambiente de los individuos, o “mapa cognitivo” (Brodbeck, 2016).

El hipocampo es una región cerebral fundamental para el proceso de aprendizaje espacial (Belchev, 2021). Para esto, el hipocampo realiza una representación interna del ambiente basada en la adquisición e integración de la información. Finalmente, utiliza esta

información para guiar la exploración (Belchev, 2021; Oess et al., 2017). Esta exploración se considera “alocéntrica” porque está dada en función de las referencias del medio externo y es independiente del punto de vista del individuo (Belchev, 2021). Junto al hipocampo, las cortezas retrosplenial y parietal posteriores son las principales regiones del cerebro involucradas en la adquisición de aprendizaje y generación de memoria espacial, así como en la navegación (Kreutzer et al., 2011; Solari & Hangya, 2018). Para crear una representación mental completa, la información procesada en el hipocampo y en la corteza parietal posterior, es integrada en la corteza retrosplenial (Figura 1; Solari & Hangya, 2018).

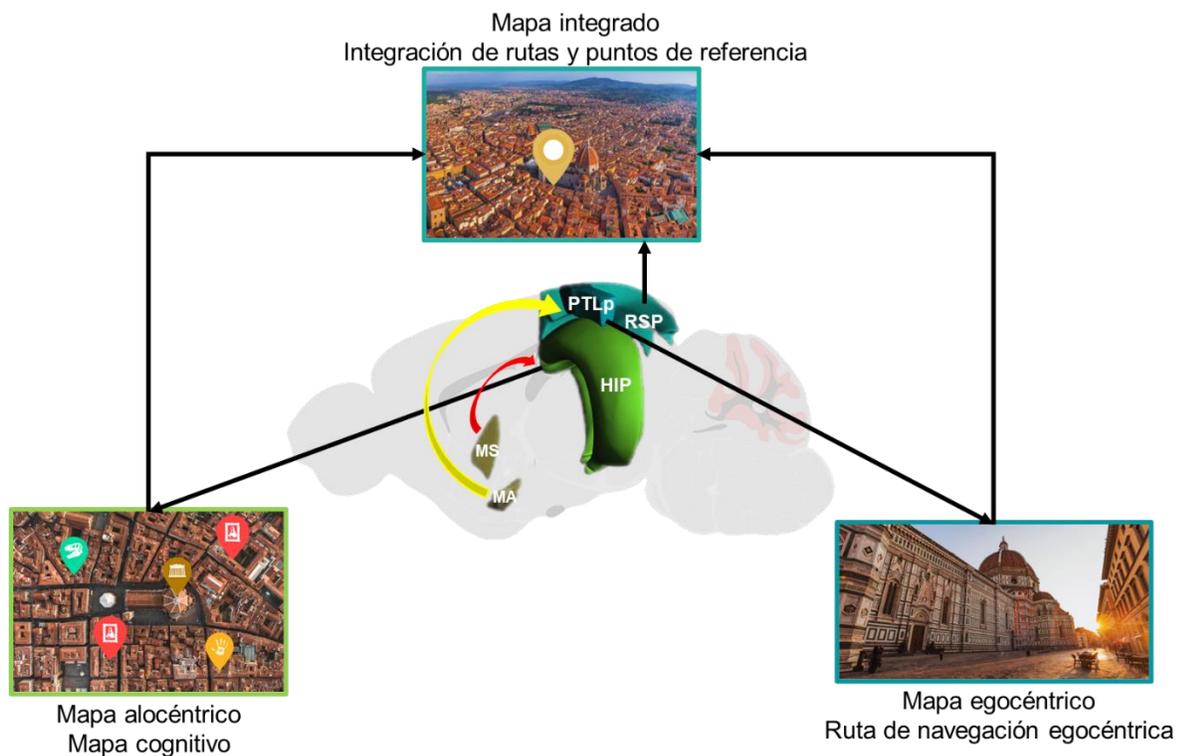


Figura 1. Red anatómica y funcional de la navegación espacial. Hipocampo (HIP), Núcleo basal magnocelular (MA), Núcleo septal medial (MS), Corteza posterior parietal (PTLp), Corteza retrosplenial (RSP; imagen propia basada en Solari & Hangya, 2018; modelos de las estructuras cerebrales generadas en Allen Brain Map, Allen Institute).

El aprendizaje y la memoria espacial representan una ventaja adaptativa importante para los individuos (Nolfi & Floreano, 1999). Esto es debido a que dichas funciones cognitivas les permiten modificar su conducta en respuesta a los ambientes naturales que se encuentran en constante cambio. En este sentido, existen factores ambientales negativos y positivos que modulan las conductas de navegación espacial (Gawel et al., 2018; Lohmann et al., 2008). Dichos factores ambientales son de distinta naturaleza física, por lo que hay especies que utilizan señales visibles, sonido o magnetismo como puntos de referencia para generar su mapa cognitivo (Hoare, 2009; Lohmann, 2008). Por ejemplo, las tortugas (Figura 2), marinas deben organizar sus estrategias de navegación con el objetivo de evadir depredadores o eventos adversos en el espacio o encontrar alimento y lugares adecuados para ovipositar (Lohmann et al., 2008).

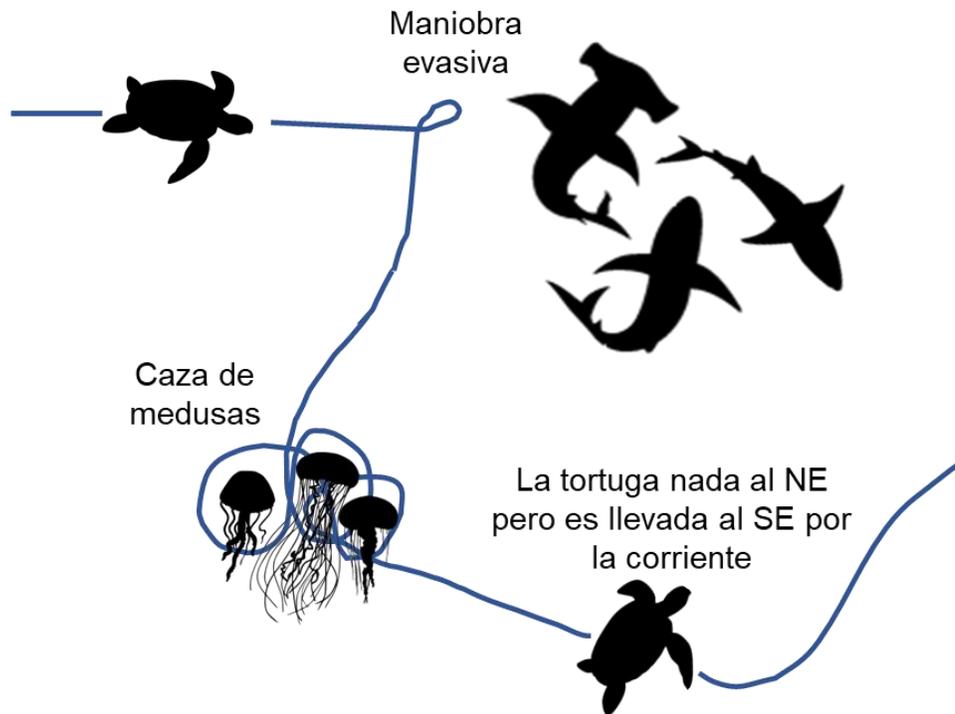


Figura 2. Ejemplo de estrategias de orientación espacial. Noreste (NE); sureste (SE; modificado de Lohmann, et al., 2008).

Otro ejemplo son los caribúes, los cuales se orientan mediante señales visuales, magnéticas y la luz del sol para migrar entre la tundra y los bosques boreales buscando líquenes. Estos animales trazan trayectos transitables en la nieve y evaden a su depredador natural: el lobo del ártico (Hoare, 2009). Por su parte, el pingüino de Magallanes busca señales visuales desde el agua hasta el cielo para evadir aves depredadoras, pero también buscan aguas más cálidas durante el invierno donde hay mayor suministro de alimento (Hoare, 2009). Los topos ciegos de Israel (*Spalax*), utilizan las vibraciones sísmicas y ondas que sensan mediante el sistema auditivo para navegar bajo tierra (Barth & Schmid, 2001).

Estas capacidades cognitivas, a menudo se ven comprometidas debido a eventos que infligen un daño al sistema nervioso central, afectando alguna de las estructuras involucradas. Uno de estos eventos son las lesiones cerebrales traumáticas, que son muy comunes en

muchas especies cuyos individuos adultos y subadultos están sujetos a encuentros violentos en la competencia por territorios o parejas. Las crías también son atacadas por individuos de su misma especie en temporada reproductiva (Ackermans et al., 2021; Semple et al., 2016). Un ejemplo de ello ocurre en el león marino de Nueva Zelanda, el borrego cimarrón y el jabalí, en donde los machos adultos atacan a otros y a las crías con el objetivo de que sólo prolifere su descendencia (Ackermans et al., 2022; Roe et al., 2014).

EL HIPOCAMPO Y SU RELACIÓN CON EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA

El hipocampo es una estructura que forma parte del sistema límbico y tiene un papel fundamental en la adquisición de aprendizaje espacial y en la consolidación de la memoria (Camacho-Ugarte et al., 2020; Izquierdo et al., 2016; Kivissari et al., 2013; Toni & Schinder, 2015). Anatómicamente, se ubica en la cara interna del lóbulo temporal, y se extiende lateralmente al cuerno temporal del ventrículo lateral (Kivissari et al., 2013). El hipocampo se compone del cuerno de Amón (*cornus ammonis*, CA), que a su vez se divide en las regiones: CA1, CA2, CA3 y giro dentado (GD; Camacho-Ugarte et al., 2020). El GD tiene una característica forma de “V” que se subdivide en tres capas. La primera, es una capa de células granulares (GLC) en el estrato medio, que tiene forma de cono invertido con un árbol de dendritas apicales que se proyectan a la segunda capa. La segunda, es la capa molecular, que es la más superficial y contiene axones provenientes de la corteza entorrinal que forman contacto con las células granulares. La tercera capa, que también se le conoce como “capa polimórfica”, es el hilus. Es la capa más interna y contiene neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas, axones de las células granulares y células musgosas (Toni & Schnider, 2015).

Dada su estructura, el hipocampo recibe información sensorial multimodal de distintas áreas dorsales asociadas con la codificación de la localización espacial de estímulos, así como información espacial de la corteza entorrinal a CA1 (Kandel et al., 2014; Witter et al., 2000). El hipocampo recibe información a través de dos vías excitatorias: una directa y una indirecta, que se denominan “vías perforantes”. En la vía directa, los axones provenientes de la capa III de la corteza entorrinal forman sinapsis con las dendritas apicales distales de CA1. En la vía indirecta, la información proveniente de la capa II de la corteza entorrinal llega a CA1 a través del circuito trisináptico (Kandel et al., 2014). El circuito trisináptico clásico, tiene como principal punto de entrada al GD. Este circuito comprende un conjunto lamelar de conexiones unidireccionales que conectan a la corteza entorrinal con el GD, al GD con CA3, a CA3 con CA1 y a CA1 de vuelta con la corteza entorrinal (Toni & Schinder, 2015). En la figura 3, se ilustra la ubicación y anatomía del hipocampo maduro en los roedores. Se presentan las tres regiones del cuerno de Amón, el giro dentado y las conexiones celulares que incluyen las entradas de información provenientes de la corteza prefrontal, amígdala y otras estructuras, así como la integración del circuito trisináptico.

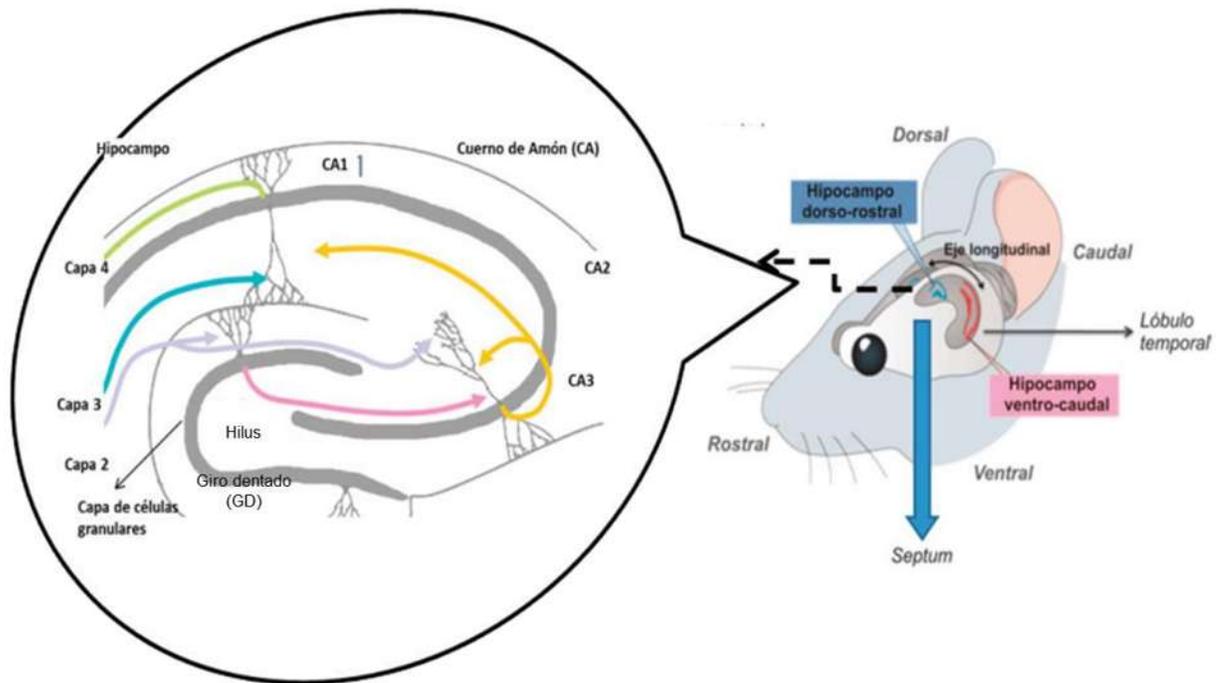


Figura 3. Estructura y circuitos sinápticos del hipocampo en roedores (Tomada y modificada de Camacho-Ugarte, et al., 2020).

LESIONES CEREBRALES TRAUMÁTICAS

Una TBI se define como un daño cerebral causado por una fuerza física externa, que puede provocar alteraciones en las funciones cognitivas superiores (como la orientación, aprendizaje, memoria y habilidades sociales) o motrices de los individuos que la sufren (Centers for Disease Control and Prevention, 2015; Kreutzer et al., 2011; Redell et al., 2002). En aves, por ejemplo, entre las secuelas de las TBI se encuentran las deficiencias motoras, anomalías en la postura o el vuelo e incapacidad de mantenerse levantadas y disfunciones en los pares craneales I, IX, X, XI y XII (Jolly, 2015). En roedores y mustélidos (como los hurones), los déficits post-lesión que aparecen se encuentran en la motricidad, en el aprendizaje y memoria espacial, la emocionalidad (conductas tipo-ansiosa y tipo depresiva), la flexibilidad conductual y en la

memoria social; además, estos déficits son mayores después de TBI en etapas tempranas, lo que reduce las probabilidades de los individuos de alcanzar la edad reproductiva o encontrar pareja (Fujimoto et al., 2004; Xiong et al., 2013; Semple et al., 2016; Demerdash et al., 2023).

Las TBI poseen muchas clasificaciones; una de ellas se basa en el tipo de lesión, que puede ser penetrante (con deformación cerebral directa) o de cabeza cerrada (mediante fuerzas de aceleración/desaceleración; Finnie, 2014). Algunos autores consideran a la TBI por explosiones como una tercera categoría (mediante ondas de choque; Ackermans et al, 2021; Ng & Lee, 2019). Existe otra clasificación de las TBI basada en su fisiopatología y que está dada en función del momento de inicio, distinguiendo de esta manera la lesión primaria y la lesión secundaria (Andriessen et al., 2010).

La lesión primaria corresponde al daño infligido por el impacto de forma inmediata, es decir, a la deformación y ruptura del tejido cerebral debido a las fuerzas físicas. La lesión secundaria, por su parte, involucra cambios estructurales a nivel celular y molecular que resultan de la lesión primaria y que aparece horas o días después de ésta (Andriessen et al., 2010; Bird et al., 2016; Prieto et al., 2009). Dentro de los procesos involucrados en la lesión secundaria, se encuentran la disfunción mitocondrial/metabólica, el aumento del estrés oxidativo, el debilitamiento de la integridad de la barrera hematoencefálica, la ruptura del citoesqueleto y la agregación de proteínas, la desregulación del flujo sanguíneo cerebral, la degeneración axonal, la citotoxicidad y la neuroinflamación (Andriessen et al., 2010; Fraunberger, 2020; Ng & Lee, 2019; Semple et al., 2016).

La neuroinflamación es una de las mayores respuestas moleculares de la lesión secundaria que, además, son determinantes en los resultados neurológicos después de la TBI (Finnie, 2014). Los principales mediadores de la respuesta inflamatoria inducida por la TBI son

los leucocitos (mediadores periféricos), así como los astrocitos y la microglia (mediadores centrales). Estas células interactúan entre sí mediante citocinas para montar la respuesta inflamatoria (Chiu et al., 2016; Fraunberger, 2020). Una activación prolongada y retardada de la neuroinflamación produce el reclutamiento de macrófagos, la activación de las células microgliales circundantes y promueve la gliosis reactiva (Ng & Lee, 2019). En este proceso, los astrocitos y la microglia alteran su estructura y función a lo largo de una activación continua, que ocurre dentro de un espectro en el cual las mismas células expresan marcadores tanto "pro" como "anti" inflamatorios tradicionales (Fraunberger, 2020).

La neuroinflamación aguda después de una TBI no sólo regula los eventos de daño y reparación en el proceso de recuperación del cerebro, sino que también propicia los procesos neurodegenerativos a largo plazo (Tweedie et al., 2013). Un cerebro en desarrollo responde de manera distinta ante una lesión que uno adulto (Giza et al., 2007). Esto se debe a diferencias fisiológicas entre el cerebro maduro y el cerebro que se encuentra en etapas tempranas de desarrollo. Entre tales diferencias, se encuentran la mielinización y sinaptogénesis. Durante el desarrollo, estos procesos se encuentran en su punto máximo en la vida. Se ha reportado que la densidad sináptica alcanza sus niveles adultos cerca de los 2 años de edad en los humanos (Semple et al., 2016).

El cerebro en desarrollo requiere de cantidades de oxígeno superiores que los cerebros adultos, por lo cual también posee un mayor flujo sanguíneo (Fraunberger, 2020; Prins & Hovda, 2003; Semple et al., 2016; Takahashi et al., 1999; Wu et al., 2016). Por otro lado, se sabe que la mayor tasa de crecimiento del hipocampo y el máximo volumen de materia gris se producen durante los primeros 26 días de edad en las ratas (que corresponde aproximadamente a los primeros 4 años en humanos; Diamond et al., 1975; Semple et al., 2016). Otro motivo de la vulnerabilidad del hipocampo durante esta fase es que la TBI provoca un aumento

descontrolado en la liberación de neurotransmisores, principalmente, glutamato. Debido a que el hipocampo tiene una alta cantidad de receptores de glutamato, es una estructura especialmente susceptible a la muerte celular excitotóxica (Ansari et al., 2008; Finnie, 2012).

El estrés oxidativo después de una TBI también contribuye a la respuesta inflamatoria, y a edades tempranas, los individuos son más susceptibles a él (Abdul-Muneer et al., 2014; Chang et al., 2005). Todos estos eventos tempranos pueden alterar el desarrollo normal del hipocampo (Belchev, 2021; Finnie, 2012). La muerte por excitotoxicidad, así como la alteración de la función, crecimiento y plasticidad de las neuronas que sobreviven en el hipocampo como consecuencia de una TBI, conducen a una disminución en las capacidades de aprendizaje y memoria dependientes de esta estructura cerebral (Belchev et al., 2020; Redell et al., 2003). Todos estos factores, junto con otras características fisionómicas como la proporción entre el tamaño del cuerpo y la cabeza, hacen que los cerebros en desarrollo sean más vulnerables a las TBI en comparación con los cerebros maduros (Semple et al., 2016).

MODELOS ANIMALES DE TBI

Debido a que las TBI que ocurren en la naturaleza son muy diversas en cuanto a causas y resultados neurológicos, existe la necesidad de replicar ciertos aspectos biomecánicos, celulares y moleculares mediante el uso de modelos animales (Xiong et al., 2013). De esta manera, se han generado modelos en gatos, conejos, perros, ovejas, monos, cerdos, hurones, entre otros, pero los más utilizados son las ratas y ratones debido a su bajo costo, tamaño, existencia de mediciones estandarizadas de los resultados, fácil manipulación y rápida generación (Fraunberger, 2020; Xiong et al., 2013).

Para recrear las lesiones en individuos jóvenes, se han adaptado modelos utilizados en roedores adultos a individuos con edades desde los 7-11 días, recién nacidos, y 17-21 días,

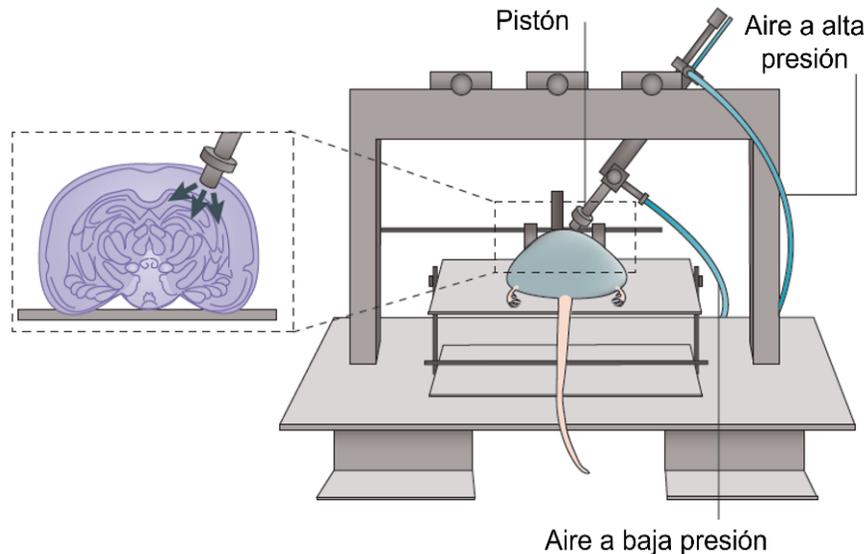
postnatales. Este último periodo representa una ventana de vulnerabilidad debido a que coincide con el pico máximo del desarrollo hipocampal (Fraunberger, 2020; Kochanek, 2017). Algunos de los modelos de TBI que se han adaptado en roedores jóvenes, son la lesión por percusión por fluido, el impacto por aceleración de caída de peso (ya sea con el cráneo abierto o cerrado) y el impacto cortical controlado (CCI). Los parámetros de estos modelos pueden ser modificados para proporcionar un rango de daños variables provocados por la lesión. También se pueden realizar muchos impactos leves para simular las lesiones repetidas (Semple et al., 2016). Se puede considerar que cada modelo representa un subconjunto de lesiones, por lo tanto, algunos modelos representan mejor una lesión axonal difusa, mientras que otros son más representativos de una lesión craneal cerrada con contusiones (Leker et al., 2002).

El CCI es el modelo de TBI más utilizado para el estudio de la fisiopatología y el tratamiento de la TBI en animales (Kochanek, 1995; Semple et al, 2016; Sempere et al., 2018). Este método permite un control preciso de los parámetros mecánicos, incluida la velocidad y la profundidad, lo que resulta en una neuropatología reproducible en la corteza y el hipocampo de roedores (Semple et al, 2016). El CCI consiste en la fijación de la cabeza del animal a un marco estereotáxico, que garantiza una alta reproducibilidad entre los animales, además de limitar el mecanismo de la lesión a uno que no implica aceleración/desaceleración o fuerzas de rotación. Como consecuencia, el CCI produce predominantemente una cavidad de lesión focal con lesión axonal difusa limitada (Semple et al., 2016).

El CCI utiliza un dispositivo de impacto neumático o electromagnético para impulsar un impactador rígido sobre la duramadre intacta expuesta a través de una craneotomía unilateral (con frecuencia entre bregma y lambda; Figura 4). Esta lesión imita la pérdida de tejido cortical, hematoma subdural agudo, lesión axonal, conmoción cerebral y disfunción de la barrera

hematoencefálica (Leker et al., 2002; Xiong et al., 2013). Los daños tisulares en la materia gris y blanca resultantes del impacto dan lugar a discapacidades motoras y cognitivas, así como a

CCI



una conducta tipo ansiosa, las cuales pueden persistir hasta un año después de la lesión (Leker et al., 2002). Estos déficits cognitivos pueden estar asociados con atrofia cerebral y una disminución progresiva del flujo sanguíneo cerebral junto a cambios en la conectividad de la materia blanca y la reorganización neuronal (Semple et al., 2016; Xiong et al., 2013).

Figura 4. Diagrama esquematizado del CCI neumático (Tomado y modificado de Xiong et al., 2013).

EL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL COMO MODELO DE REHABILITACIÓN DESPUÉS DE UNA TBI

El enriquecimiento ambiental (environmental enrichment, EE, por sus siglas en inglés), constituye un modelo terapéutico reportado en mamíferos (principalmente roedores, pero también en cerdos), aves y reptiles (Burghardt et al., 1996; Wen et al., 2021). Este, consiste en una condición de alojamiento que proporciona a los individuos un entorno propicio para la estimulación de tres tipos principales: sensorial (objetos de diversos colores, formas y tamaños,

túneles, chozas), social (habitáculos más grandes y grupos de animales más numerosos en cohabitación) y motora (ejercicio físico; Fuller et al., 2018; Lajud et al., 2019; Radabaugh et al., 2016). Se ha demostrado que dichos componentes aportan mayores beneficios si se combinan, en lugar de presentar sólo uno o dos de ellos, por lo que es probable que la recuperación funcional se deba a una interacción compleja de los tres componentes (Folweiler et al., 2017; Sozda et al., 2010).

El EE produce numerosos efectos relacionados con la plasticidad, como el incremento en la neurogénesis hipocampal y en la expresión del factor de crecimiento nervioso y sinaptofisina, además de mejoras conductuales significativas en roedores con lesiones, modelos animales enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, lesión en la médula espinal y lesión hipóxica crónica (Belchev, 2021; Bondi et al., 2014; Matter et al., 2011). Asimismo, el EE promueve la recuperación motora y mejoras en el aprendizaje espacial y la retención de la memoria después de una TBI experimental, independientemente del modelo de TBI, el sexo, la edad y el periodo de exposición al paradigma, ya sea retardado, abreviado, temprano o continuo (Bondi, 2014; Bondi, 2015; Kline, 2007; Lajud et al., 2019; Monaco et al., 2014; Sozda, 2010). Específicamente, en ratas se ha observado que en la prueba de laberinto acuático de Morris, la exposición continua al EE promueve significativamente la retención de la memoria después de una TBI (Kline et al., 2012; Lyeth et al., 1990). Además, se ha demostrado que el EE tiene un efecto neuroprotector después de una TBI al disminuir el tamaño de la lesión cortical y la pérdida de neuronas hipocampales en CA1 y CA3 (de Witt et al., 2011; Hoffman et al., 2008; Kline et al., 2007; Matter et al., 2011; Sozda et al., 2010).

LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EL EJE INTESTINO-CEREBRO

Se define a la microbiota como el colectivo de especies de bacterias, arqueas, protistas, virus y microorganismos eucariotas que conforman a la comunidad ecológica normal dentro o sobre un organismo hospedero (Aya et al., 2021; Wang & Wang, 2016). En individuos humanos sanos, el establecimiento de la microbiota comienza desde el nacimiento y termina a los 3 años de edad (Wilson et al., 2013).

La microbiota gastrointestinal es de las comunidades más diversas y con interacciones más complejas de microorganismos que en otros sistemas en los mamíferos, así como la de mayor relevancia en su salud (Chen et al., 2013; Morais et al., 2020). Está dominada por bacterias y compuesta por al menos 1000 especies diferentes conocidas (con hasta 10^{11} - 10^{12} células bacterianas). La microbiota intestinal tiene una interacción mutualista con el hospedero, donde a cambio de nutrientes y el medio para existir, desempeña funciones sustantivas. Entre estas funciones se encuentran el mantenimiento de la homeóstasis intestinal (el pH, motilidad, permeabilidad, absorción de nutrientes), la producción de nutrientes (p. ej., vitaminas y ácidos grasos) y el procesamiento de metabolitos. Además, esta microbiota evita la colonización de organismos patógenos y juega un papel importante en la regulación del sistema inmunitario e incluso, del sistema nervioso central (Chen et al., 2013; Matenchuk et al., 2020; Matharu et al., 2019; Nicholson et al., 2019; Rinninella et al., 2018). Los grupos bacterianos que colonizan el intestino varían entre áreas geográficas e incluso entre individuos, debido a la heterogeneidad de condiciones que influyen en su establecimiento (Zhu et al., 2018). Sin embargo, existen algunos grupos que se encuentran bien establecidos y la alteración de su composición propicia la aparición de trastornos mentales y emocionales. Dentro de estos grupos, conocidos en conjunto como “probióticos”, se encuentran los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Bacteroides* (Codella et al., 2017; Matenchuk et al., 2020; Wilson et al., 2020).

El eje microbiota-intestino-cerebro, es una compleja red de comunicación bidireccional entre la microbiota residente en el intestino del hospedero y su cerebro, y comprende tres vías principales; la primera vía es directa y está mediada por el nervio vago (Cryan & Dinan, 2012). Las vías indirectas actúan a través de los sistemas neuroendocrino e inmunitario mediante la secreción o la regulación de la síntesis de citocinas, hormonas, neurotransmisores, neuromoduladores y otros metabolitos (Figura 5; Carabotti et al., 2015; Cryan & Dinan, 2012; Wang & Wang, 2016). Adicionalmente, se sabe que algunos ácidos grasos de cadena corta producidos por la microbiota intestinal están involucrados en el desarrollo, maduración y activación de la microglia (Morais et al., 2020).

Diversos autores han propuesto que la microbiota intestinal también está relacionada con la estimulación del aprendizaje y la consolidación de la memoria (Bercik et al., 2012; Carabotti et al., 2015; Foster & McVey, 2013). Asimismo, se ha demostrado que la alteración de la microbiota intestinal tiene relación con la aparición de neuropatologías como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, trastorno del espectro autista y desórdenes conductuales (Carbotti et al., 2015; Gómez-Eguílaz et al., 2019; Rice et al., 2019; Zhu et al., 2018).

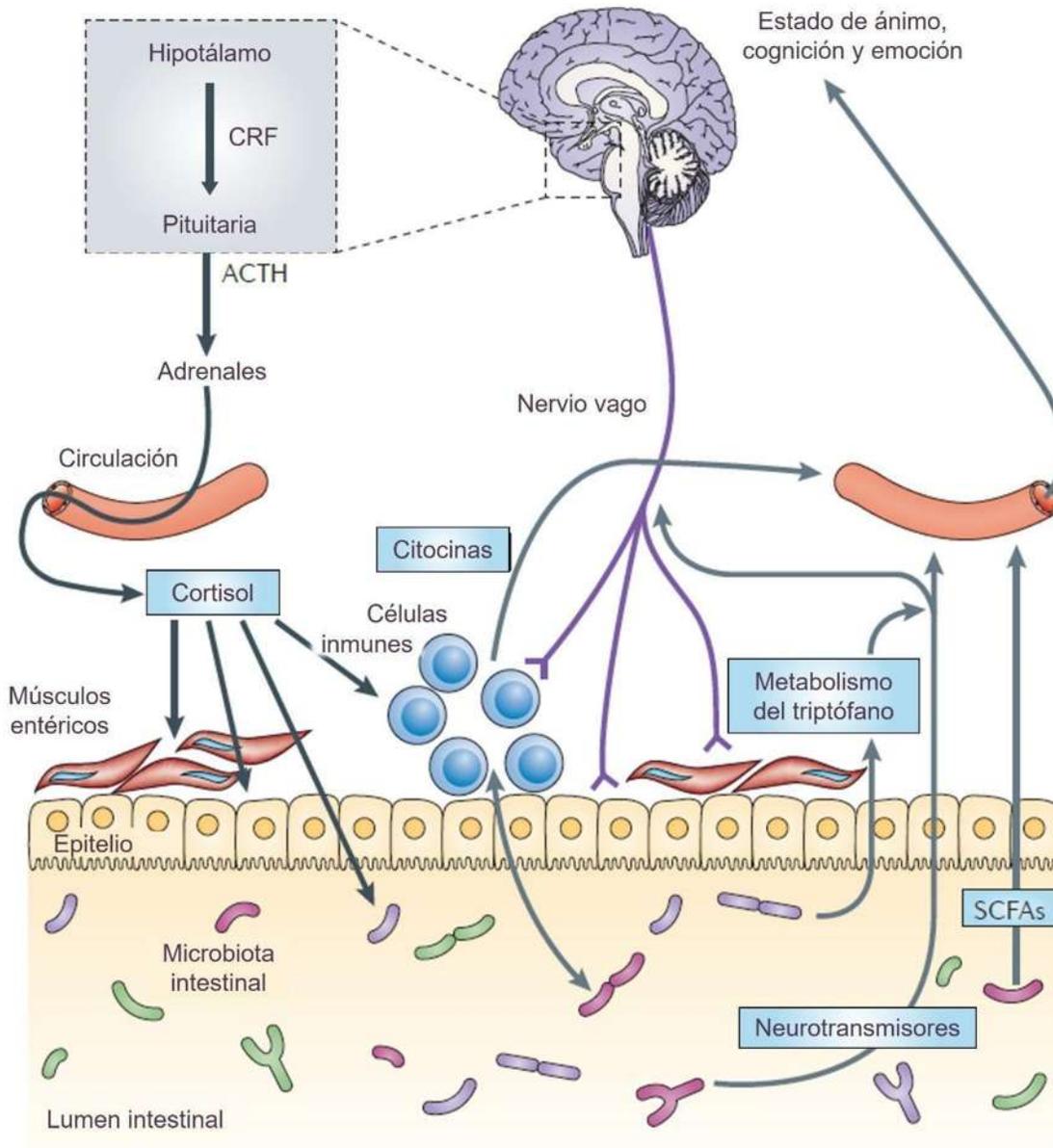


Figura 5. Eje microbiota-intestino-cerebro. Se esquematizan las vías endocrinas (cortisol), inmunitarias (citocinas) y neurales (nervio vago y sistema nervioso entérico) del eje. Corticotropina (ACTH); Hormona liberadora de corticotropina (CRF); Ácidos grasos de cadena corta (SCFAs; tomado y modificado de Cryan & Dinan, 2012).

ANTECEDENTES DIRECTOS

Las TBI se han asociado con la aparición de disfunciones gastrointestinales, como cambios en la permeabilidad y la motilidad, así como con alteraciones en la composición de la microbiota intestinal, lo que se conoce como disbiosis (Celorrio & Friess, 2022; Urban et al., 2020; Wang et al., 2021; Zhu et al., 2018). Se ha observado una activación microglial crónica y una reducción en la neurogénesis hipocampal de ratones lesionados que recibieron tratamiento con antibióticos, lo que resalta la importancia de la microbiota en el funcionamiento del cerebro (Celorrio & Friess, 2021). También, se ha demostrado que la microbiota intestinal influye en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y que una TBI produce cambios en la diversidad bacteriana (Nicholson et al., 2019). Los principales filos que se han visto afectados en el ciego intestinal después de una TBI son Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes (de donde se destaca la familia Porphyromonadaceae). Estos dos últimos son los filos que suelen dominar la comunidad en una microbiota intestinal sana (Jandhyala et al., 2015; Zhu et al., 2018).

Matharu y colaboradores (2019), reportaron que una TBI repetida causa un aumento en la abundancia relativa de proteobacterias del yeyuno en ratas, acompañado de una disminución en la abundancia relativa de *Firmicutes*. A nivel de género, se observaron cambios significativos en la abundancia de *Helicobacter*, *Lactobacillus*, *Campylobacter*, y *Streptococcus* (Matharu et al., 2019). De forma destacable, se ha visto que la exposición al EE tiene un efecto positivo sobre la composición de la microbiota intestinal, disminuyendo las alteraciones que se relacionan con la disbiosis, como la reducción de neurogénesis hipocampal y de retención de memoria (Celorrio et al., 2021; Saladrigas-García et al., 2021). Por ejemplo, en un modelo de exposición temprana al EE en cerdos, se observó que se reducen las conductas dañinas, se incrementa la inmunocompetencia, y también se acelera el establecimiento de una microbiota

sana (Wen et al., 2021). Debido a esto, se propone que esta estrategia pudiera contribuir a promover el establecimiento de un eje microbiota-intestino-cerebro saludable (Wen et al., 2021).

En un estudio previo de nuestro equipo de trabajo, se sometió a ratas de 21 días de edad a una TBI moderada. La lesión provocó déficits en la adquisición de aprendizaje y retención de la memoria espacial evaluados en el laberinto acuático de Morris, mientras que la exposición al EE restauró tales procesos cognitivos (Zamudio, 2022). Sin embargo, debido a la naturaleza coprófaga de las ratas y a que los grupos control y lesionados cohabitaron en la caja de enriquecimiento ambiental durante el experimento, es posible que los efectos observados sean debidos a una transferencia de microbiota fecal entre los individuos. Para determinar esto y la efectividad del modelo de EE en la restauración del equilibrio del eje microbiota-intestino-cerebro, el objetivo del presente estudio es evaluar el efecto del EE sobre la diversidad de la microbiota intestinal después de una TBI en ratas pediátricas y su correlación con el desempeño cognitivo. Adicionalmente, debido a que hasta el momento se desconoce el mecanismo mediante el cual el EE promueve la restauración de la eubiosis intestinal y la recuperación de funciones cognitivas, se estudiará su efecto sobre la activación microglial hipocampal como marcador de neuroinflamación.

JUSTIFICACIÓN

Hasta la fecha, no existen terapias veterinarias efectivas ni accesibles para todos los candidatos rescatados que han sufrido una TBI y que les posibilite sobrevivir al ser liberados en su hábitat. Aunque estudios previos sugieren que el EE puede ser una estrategia terapéutica prometedora después de una TBI, aún no comprendemos completamente los mecanismos subyacentes de su efecto neuroprotector. Se reconoce que los ambientes precarios para animales en cautiverio y los ambientes antropizados para organismos silvestres pueden ser menos beneficiosos que los ambientes naturales o aquellos que ofrecen mayor estimulación. Por lo tanto, el EE podría considerarse una estrategia terapéutica potencial tanto para restablecer la eubiosis intestinal como para mitigar los efectos adversos posteriores a una TBI.

Este trabajo tiene el potencial de proporcionar información valiosa para diversas disciplinas, incluyendo la práctica veterinaria, los programas de cría en cautiverio para la conservación biológica y la medicina humana. Esto se debe a que se utilizan modelos que reproducen eventos comúnmente observados en la clínica, lo que podría contribuir al desarrollo de enfoques terapéuticos más efectivos y comprensión más profunda de los mecanismos involucrados en la recuperación después de una lesión cerebral.

HIPÓTESIS

La exposición al enriquecimiento ambiental disminuye la disbiosis intestinal ocasionada por una lesión cerebral traumática pediátrica en ratas. Esto se asocia con una mejora en el desempeño cognitivo y una disminución en la neuroinflamación.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto del enriquecimiento ambiental sobre el desempeño cognitivo y la neuroinflamación, y determinar su relación con la diversidad de la microbiota intestinal

PARTICULARES

1. Evaluar el efecto del EE sobre el desempeño cognitivo en el laberinto acuático de Morris después de una TBI en animales juveniles.
2. Evaluar el efecto del EE sobre la morfología de las células microgliales después de una TBI en animales juveniles, a través de la cuantificación del área de cobertura celular (CEA), el tamaño del soma y el radio CEA/soma de las células microgliales de la corteza, la región CA1 e hilus hipocampales ipsi y contralaterales a la lesión.
3. Determinar si el EE modifica la diversidad alfa y beta así como la abundancia relativa de la microbiota intestinal de animales que sufrieron una TBI.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Se obtuvieron ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley gestantes sincronizadas, provenientes del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, las cuales se habituaron durante una semana al vivario del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI-IMSS) antes del parto. Los animales se mantuvieron en condiciones de temperatura controlada, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 hrs. y comida y agua *ad libitum*.

El día del nacimiento fue considerado como el día postnatal (PND) 0. Al PND 1, las crías fueron mezcladas y asignadas aleatoriamente a las madres y las camadas se ajustaron a 8-10 crías por madre. Al PND 21, los animales fueron destetados y las ratas macho se asignaron aleatoriamente a dos condiciones quirúrgicas; la cirugía de impacto cortical controlado (como

modelo de TBI) o cirugía SHAM, que consiste en las mismas condiciones quirúrgicas a excepción del impacto (como control; Figura 6). Después de la cirugía, los animales fueron divididos y asignados aleatoriamente a las dos condiciones de alojamiento, estándar (STD) y enriquecimiento ambiental (EE) durante su recuperación (PND 21-42). Debido a que las ratas son coprófagas y los dos grupos alojados en EE se encontraban en cohabitación, se incluyó un quinto grupo de animales lesionados sin contacto con animales SHAM para descartar un posible efecto de la cohabitación sobre el desempeño cognitivo y la activación microglial influenciado por la transferencia de microbiota. Adicionalmente, se consideró un sexto grupo de animales completamente intactos (NAÏVE) para evaluar los posibles efectos de la anestesia y la craneotomía en el desempeño cognitivo. De esta forma, nuestro diseño se consolidó por 6 grupos (Figura 6). Los animales sometidos a cirugía se dejaron recuperar por dos semanas en las diferentes condiciones de alojamiento y se evaluó el desempeño cognitivo en el MWM a partir del PND 35 (Figura 7).

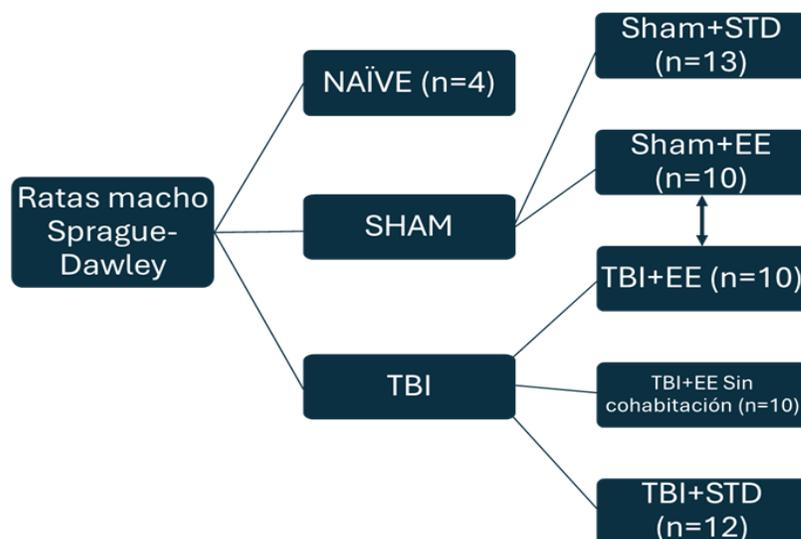


Figura 6. Grupos experimentales. Lesión cerebral traumática (TBI); animales con las mismas condiciones que los del grupo TBI, pero sin lesión (SHAM); en condiciones estándar de bioterio (STD); enriquecimiento ambiental (EE) con o sin cohabitación; animales intactos (NAÏVE).

Se monitoreó la masa corporal de los individuos durante todo el experimento. El cuidado y mantenimiento de los animales se llevó a cabo siguiendo la norma oficial de uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética de la Comisión Nacional de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (R-2016-785-054).

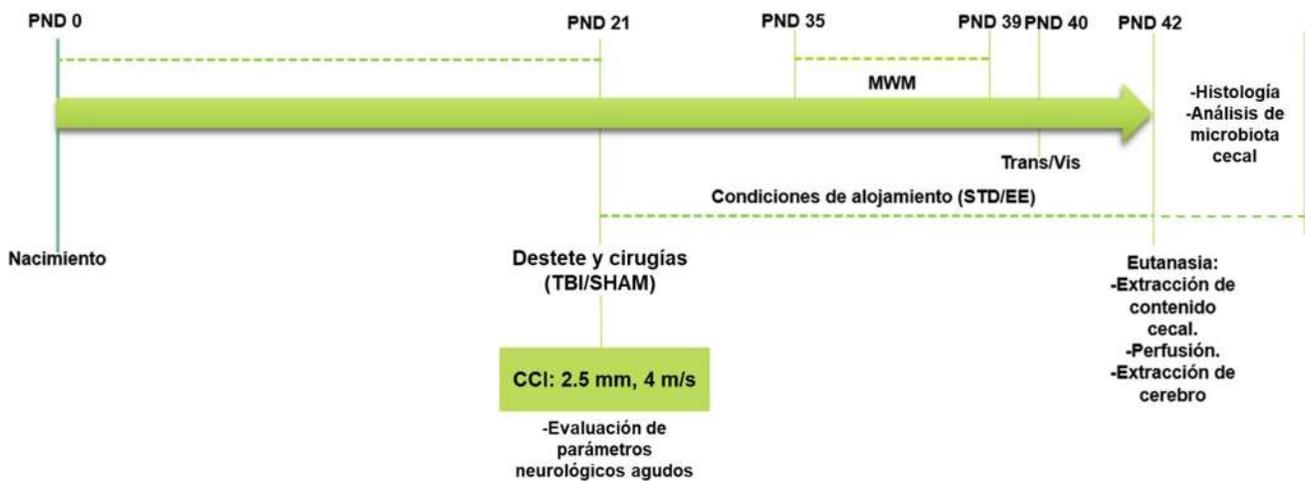


Figura 7. Esquema del diseño experimental. Lesión cerebral traumática (TBI); Enriquecimiento ambiental (EE); Laberinto acuático de Morris (MWM); Día post-natal (PND); Impacto cortical controlado (CCI); Condiciones estándar de bioterio (STD); Ensayo de transferencia (Trans); Ensayo con plataforma visible (Vis).

IMPACTO CORTICAL CONTROLADO

Para el CCI, los animales fueron anestesiados con isoflurano en O₂ (5% para la inducción y 2% para el mantenimiento). Las ratas se aseguraron en un marco estereotáxico y se les realizó una incisión en la parte superior de la cabeza, retrayendo la piel para exponer el cráneo. Posteriormente se realizó una craneotomía a la altura del hemisferio derecho, entre bregma, lambda y las comisuras sagital y coronal. La pieza de hueso cortada fue removida, dejando espacio para la inserción de la punta de un impactador electromagnético (5 mm de diámetro).

Con el impactador, se realizó una lesión moderada sobre la corteza parietal, con un impacto de 2.5 mm de profundidad a una velocidad de 4 m/s, e inmediatamente se suturó la incisión. Para las ratas SHAM, se realizaron los mismos procedimientos a excepción del impacto, como ha sido descrito anteriormente (Diaz-Chávez et al., 2020; Lajud et al., 2021).

EVALUACIÓN NEUROLÓGICA AGUDA

Para controlar la severidad de la lesión y determinar si esta se indujo correctamente en los animales, inmediatamente después de la cirugía se realizó la medición de parámetros neurológicos agudos. Esta evaluación consiste en registrar el tiempo que tardan los animales en presentar reflejo en cada una de las patas anteriores (izquierda y derecha) después de un pinchazo suave, y el tiempo que tardan en enderezarse justo después de ser retirada la anestesia (Fujimoto et al., 2004).

ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL

Inmediatamente después de que los animales se recuperaron de la anestesia, los asignados a EE fueron colocados en una caja con dimensiones 75 cm x 75 cm x 155 cm que tiene dos pisos y posee una plataforma intermedia, una rampa y un túnel en cada piso. La jaula cuenta, además, con juguetes de distintas formas, tamaños y colores (pelotas, cadenas, llantas, figurillas, tubos; Figura 8). Se suministró comida con base en la dieta estándar de bioterio (nutricubos Labdiet 5001) y agua *ad libitum*. Los juguetes fueron reordenados diariamente para mantener la novedad y se cambiaron por juguetes limpios dos veces por semana. El material de cama de los alojamientos STD y EE fue reemplazado cada dos días.



Figura 8. Imágenes de las condiciones de alojamiento. Se observa la combinación de elementos tanto sensoriales como de mayor interacción social y espacio exploratorio (A y B) con relación a las cajas de condiciones STD (C).

LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS

Se evaluó el desempeño cognitivo de las ratas asignadas a los cinco grupos experimentales del PND 35 al 40 en el MWM. Además, para esta prueba se incluyó otro grupo de animales intactos (NAÏVE, $n = 4$) para descartar un posible efecto de la craneotomía en los animales SHAM. El MWM consistió en una tina de plástico (180 cm de diámetro) dividida en cuatro cuadrantes con

señales visuales extra-laberinto y se colocó una plataforma sumergida como ha sido descrito anteriormente (Morris, 1984). La prueba está compuesta de dos fases: la fase de entrenamiento (adquisición) y la fase de transferencia (retención).

La fase de entrenamiento se realizó durante 5 días consecutivos (PND 35-39).

Cada sesión diaria de entrenamiento consistió en cuatro ensayos por rata; un ensayo por cada uno de los cuadrantes, con un intervalo interensayo de 4 minutos. Cada ensayo tuvo un máximo de 2 minutos y consistió en dejar a la rata en libre exploración en el agua. Se evaluó el tiempo que tardó la rata en llegar a la plataforma (latencia de escape). Si al finalizar los 2 minutos de exploración la rata no encontraba la plataforma, se la llevaba manualmente hasta ella. En todos los casos, una vez que la rata estaba en la plataforma, se la dejaba allí durante 20 segundos para que se familiarizara con las señales visuales extra-laberinto (Morris, 1984).

Al PND 40 se realizó la fase de transferencia, que consistió en un solo ensayo de 30 segundos, pero con la plataforma removida. Posteriormente, se ejecutó una prueba con una plataforma visible, con el fin de determinar la contribución de factores no-espaciales en el desempeño cognitivo (de la Tremblaye et al., 2017; Lajud et al., 2019; Radabaugh et al., 2016). Se cuantificó el tiempo que los animales permanecieron explorando el cuadrante objetivo durante la prueba de transferencia, la latencia de escape en la prueba visible y, como medida de control adicional para descartar la influencia de déficits motores en la prueba, se evaluó la velocidad de nado (Matter et al., 2011).

MUESTREO DE MATERIA CECAL, EXTRACCIÓN DE DNA Y ANÁLISIS DE MICROBIOTA

Al PND 42, las ratas recibieron una sobredosis de pentobarbital sódico (tres veces la dosis para anestesia; 75 mg/Kg), se les extrajo el ciego y se almacenó a -80°C la materia fecal (cecal) contenida en él. Se extrajo el DNA bacteriano total de las muestras mediante el uso de un kit

comercial (Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit – ZYMO RESEARCH) de acuerdo con los protocolos previamente descritos (Ruiz-González et al., 2022). Las muestras de DNA se ajustaron a una concentración de ~20 ng/μL con el uso de un NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher; Waltham, USA) y el amplicón 16S fue secuenciado mediante la plataforma Illumina MiSeq (2X150 BP; Microbiome Insights Inc., BC, Canada). Brevemente, los genes de rRNA 16S bacterianos fueron amplificados mediante PCR con primers con código de barras dual dirigidos a la región V4 (515F 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' y 806R 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), de acuerdo con el protocolo de Kozich et al. (2013). Los amplicones fueron secuenciados con Illumina MiSeq utilizando el kit de extremo pareado de 300 pb (v.3). Las secuencias fueron procesadas con la base QIIME2 para evaluar la calidad de las lecturas (Bolyen et al., 2019). Se utilizó la extensión DADA2 (Callahan et al., 2016) para resolver las variantes de secuencias de amplicones (ASVs, por sus siglas en inglés), y eliminar las lecturas artefactuales. Las secuencias representativas fueron asignadas taxonómicamente con la extensión “classify-consensus-vsearch” utilizando la base de datos SILVA (v.138). Se realizó una alineación con el algoritmo MAFFT (Kato et al., 2009). Después de enmascarar las conservaciones posicionales y el filtrado de brechas, se construyó una filogenia con el algoritmo FastTree (Price et al., 2010). Las tablas de abundancias y las filogenias obtenidas fueron exportadas a un ambiente R para calcular la diversidad alfa y beta mediante la librería phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013).

PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

Después de la eutanasia y la extracción de contenido cecal (PND 42), los animales fueron perfundidos intracardiamente con solución salina (0.9%) y una solución fijadora de tejido (paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M), con ayuda de una bomba peristáltica. A continuación, se obtuvieron los cerebros, los cuales fueron criopreservados en sacarosa (20%

y 30%), para su posterior procesamiento en criostato (Leica). Se obtuvieron cortes coronales de 40 μm de grosor, los cuales fueron mantenidos en solución crioprotectora hasta el procesamiento inmunohistoquímico.

Se realizaron tinciones inmunohistoquímicas contra el marcador de microglia IBA1, como ha sido previamente descrito (Díaz-Chávez et al., 2020). Los cortes fueron lavados en buffer de fosfatos (0.1 M) e incubados en metanol con peróxido de hidrógeno (3%) y buffer de fosfatos+Tritón con peróxido de hidrógeno (3%) para inactivar peroxidases endógenas. Enseguida, fueron incubados durante 30 min con solución de bloqueo (buffer de fosfatos+Tritón+suero de caballo al 5%). Posteriormente, se incubaron con anticuerpo primario levantado en conejo (Anti-Iba1 1:2000, Wako, Cat.: 019-19741, Lot.: SKL0615) preparado en solución de bloqueo. Las secciones se mantuvieron en incubación por 48 h a 4 °C. Pasado este tiempo, fueron lavadas con buffer de fosfatos+Tritón e incubadas durante 2 h en el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (1:750, Vectastain, Vector Laboratories). Se lavó el anticuerpo en buffer de fosfatos y a continuación se amplificó la señal mediante la incubación en el complejo avidina-biotina (1:100 en buffer de fosfatos. Elite ABC kit, Vector Laboratories) durante 90 mins. Enseguida, se realizaron lavados en buffer de fosfatos y se reveló con solución Ni-DAB (DAB staining kit, Vector Laboratories), durante 5 min según las indicaciones del proveedor. Los cortes teñidos se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados y, una vez secos, se sellaron con Cytoseal (Richard-Allan Scientific).

Las muestras se observaron en un microscopio óptico (Axioscope, Karl Zeiss) y se tomaron fotografías con una magnificación 200x. Se fotografiaron las zonas CA1 e *hilus* del hipocampo, y la corteza ipsi y contralaterales de cuatro cortes por rata. De cada fotografía, se eligieron aleatoriamente cinco células microgliales con buena visibilidad, a las cuales se les

midió el área del soma y el área de cobertura celular (CEA) mediante el programa ZEISS ZEN (Karl Zeiss Microscopy GmbH). A continuación, se les realizó una caracterización morfológica bajo los criterios previamente descritos por Salinas-García et al. (2023). En ese estudio, se estableció que un radio CEA/soma menor a 23 corresponde con un fenotipo activado con un 99.5% de confianza, por lo que se utilizó este parámetro para calcular el porcentaje de células activadas en cada una de las tres regiones por individuo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se analizó la ganancia de masa y las latencias de escape en el MWM mediante un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas, donde el tiempo actuó como factor repetido y la lesión, así como las condiciones de alojamiento, se consideraron como variables independientes. Los parámetros neurológicos agudos, la latencia de escape en la prueba visible, el tiempo de exploración en el cuadrante objetivo, la velocidad de nado en la prueba de transferencia y el porcentaje de células microgliales activadas se analizaron mediante una ANOVA de dos vías para cada variable utilizando la TBI y el alojamiento como factores independientes mediante el programa estadístico GraphPad Prism 9. La significancia estadística se estableció como $p \leq 0.05$. En los casos en que la ANOVA reveló diferencias significativas se utilizó una prueba post-hoc de Tukey.

Para el análisis de microbiota, la riqueza total de los ASVs (diversidad alfa) fue calculada utilizando los índices de Shannon y Simpson a partir de la abundancia relativa mediante phyloseq en RStudio. Los índices de diversidad alfa fueron comparados de acuerdo con los factores lesión, alojamiento y cohabitación. Se realizó un análisis de comparaciones múltiples entre los cuatro grupos para datos no-paramétricos mediante la prueba de Wilcoxon. Para la diversidad beta, se realizó un análisis de escalamiento multidimensional no-métrico (NMDS), con las lecturas ASV para visualizar las diferencias entre los grupos usando la distancia de

Bray-Curtis como métrica. Se realizó un análisis multivariado permutacional de la varianza (PERMANOVA), con la función `adonis2` para determinar los factores que influyen cambios en la estructura de la comunidad microbiana entre los grupos. Se realizaron comparaciones múltiples entre todos los grupos de acuerdo con los factores lesión, alojamiento y cohabitación. La abundancia taxonómica fue normalizada a abundancia relativa (porcentaje) y se visualizó mediante la librería `ggplot2` a nivel de phylum, clase, familia, y género.

Adicionalmente, se realizó un análisis de abundancia diferencial utilizando la herramienta LEfSe para determinar los principales ASVs discriminantes entre los grupos. Además, realizamos análisis de LEfSe pareados para determinar la contribución de los factores lesión, alojamiento y cohabitación a la abundancia diferencial.

RESULTADOS

EVALUACIÓN NEUROLÓGICA AGUDA Y PARÁMETROS DE CONTROL

Los datos de tiempo de respuesta en pata izquierda y de enderezamiento, no pasaron la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, por lo que se presentan la mediana y el rango intercuartil (IQR) como descriptores estadísticos más apropiados para ellos (Tabla 1). El análisis de los parámetros neurológicos agudos comparando todos los animales SHAM contra todos los animales TBI, mostraron que los animales TBI (Mediana: 254, IC95% 205-328) tuvieron un tiempo de enderezamiento significativamente mayor que los SHAM (mediana: 205, IC95% 170-220, U de Mann Whitney $p = 0.01$). No se observaron diferencias en el tiempo de reacción de la pata derecha y la izquierda. Al analizar todos los grupos por separado, no se encontró efecto de los tratamientos sobre el tiempo de respuesta de reacción de las patas derecha e izquierda ni en el enderezamiento ($p > 0.05$), lo que nos indica que todos los animales lesionados considerados en el experimento recibieron la misma severidad de lesión (Tabla 1). Cinco

animales fueron excluidos del estudio debido a que no cumplieron con los criterios de eliminación para controlar la severidad de lesión. Se le aplicó punto final humanitario a un animal que mostró una pérdida de masa corporal por debajo del 80% de su masa previa a la cirugía.

El análisis de la ganancia de masa durante el experimento mediante una ANOVA, mostró un efecto significativo del tratamiento [$F_{(3, 35)} = 6.773$, $p = 0.001$]. Las comparaciones múltiples indicaron que los animales SHAM alojados en EE tuvieron una menor ganancia de masa corporal que los alojados en condiciones STD (Tabla 1). Para descartar que esta diferencia se debiera a otras variables relacionadas con el estado de salud de los animales, se calculó la tasa de ganancia de masa corporal, que es el porcentaje en gramos ganados por día mediante la ecuación $((a/b)^{1/T} - 1) * 100$, donde “a” y “b” son la masa final e inicial, respectivamente, y “T” son los días transcurridos entre una y otra medición. Los resultados de este análisis no mostraron ningún efecto.

Tabla 1. Evaluación neurológica aguda y parámetros de control.

| Grupo | Tiempo de respuesta en pata derecha (s) | Tiempo de respuesta en pata izquierda (s) | Tiempo de respuesta en enderezamiento (s) | Ganancia de masa (g) |
|-------------------------|---|---|---|----------------------|
| SHAM+STD | 110.3±17.42 | 116; IQR=122 | 213.5; IQR=55 | 139.5±4.6 |
| SHAM+EE | 116.4±15.87 | 104.5; IQR=99 | 191; IQR=124 | 109.9±7** |
| TBI+STD | 124.3±16.78 | 117.5; IQR=91 | 319.5; IQR=552 | 134.8±3.2## |
| TBI+EE | 106.67±8.46 | 109; IQR=44 | 253; IQR=188 | 122.78±5 |
| TBI+EE Sin cohabitación | 90.4±5.34 | 86.5; IQR=33 | 269.5; IQR=136 | 118.8±5.2 |

STD: condiciones estándar, EE: ambiente enriquecido, TBI: lesión cerebral traumática. Promedio ± EST o mediana e IC95%. ** $p < 0.01$ vs SHAM+STD; ## $p < 0.01$ vs SHAM+EE ($n = 9-10$).

DESEMPEÑO COGNITIVO EN EL MWM

Efecto del EE y la TBI sobre el aprendizaje y la memoria espacial

En las latencias de escape de la prueba de MWM, la ANOVA mostró un efecto significativo del tratamiento [$F_{(4, 44)} = 7.929$, $p < 0.001$] y del día de entrenamiento [$F_{(2.713, 119.4)} = 75.95$, $p < 0.001$]. No hubo interacción significativa entre ambos factores. Los animales TBI+STD presentaron el peor desempeño cognitivo en la fase de adquisición del MWM, siendo diferentes de los animales SHAM ($p < 0.001$). No hubo diferencias entre los grupos TBI+EE y los grupos SHAM y tampoco entre ambos grupos SHAM ($p > 0.05$). Sin embargo, el grupo TBI+EE sin cohabitación, sí tuvo un desempeño significativamente mejor que el grupo TBI+STD ($p < 0.01$), mientras que el grupo en cohabitación, no. Adicionalmente, el análisis de comparaciones múltiples entre días mostró que durante los días 4 y 5, el grupo TBI+EE sin cohabitación con animales SHAM obtuvo un mejor desempeño que el grupo TBI+STD ($p < 0.01$ y $p < 0.001$), mientras que el grupo TBI+EE en cohabitación, no fue diferente en ningún día ($p > 0.05$). Además, se observó que el grupo TBI+EE sin cohabitación tuvo un mejor desempeño que el grupo en cohabitación al día 4 ($p < 0.05$; Figura 9).

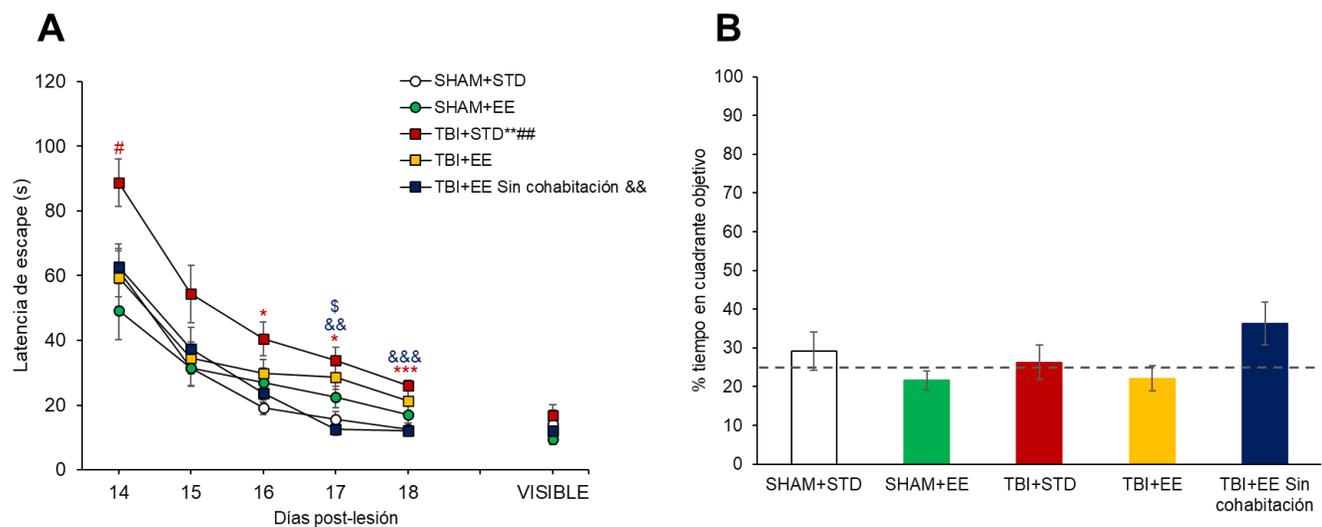


Figura 9. Desempeño cognitivo en el MWM. Las ratas fueron sometidas a una cirugía de impacto cortical controlado (TBI) al día postnatal 21 o permanecieron como testigos (SHAM). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de alojamiento (STD) o enriquecimiento ambiental (EE) con y sin cohabitación con animales SHAM. **A)** Se evaluó la latencia de escape durante la fase de entrenamiento del día post-lesión 14 al 19. Al día post lesión 20 se realizó un ensayo con una plataforma visible para determinar la agudeza visual. **B)** El mismo día se realizó una prueba de transferencia sin plataforma en la que se evaluó el porcentaje de tiempo que los animales permanecieron explorando el cuadrante objetivo. La línea punteada indica el valor correspondiente a una exploración azarosa. *Promedio \pm EST, ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs SHAM+STD; # $p < 0.05$ y ## $p < 0.01$ vs Grupo SHAM+EE; && $p < 0.01$ y &&& $p < 0.001$ vs TBI+STD; \$ $p < 0.05$ vs Grupo TBI+EE. ($n = 9-10$).*

Efecto de la craneotomía y los procedimientos quirúrgicos sobre el aprendizaje y la memoria espacial

Para descartar un posible efecto de la craneotomía sobre el desempeño de los animales SHAM, se compararon los dos grupos de animales SHAM y un grupo de animales intactos en la fase de adquisición del MWM mediante una ANOVA de medidas repetidas y se encontró un efecto del día de entrenamiento [$F_{(2.6, 59.9)} = 22.15, p < 0.001$] pero no del tratamiento ($p > 0.05$; Figura 10A). En la prueba de transferencia, no se observó efecto principal de ningún factor en la ANOVA [$F_{(2, 23)} = 3.00, p > 0.05$; Figura 10B].

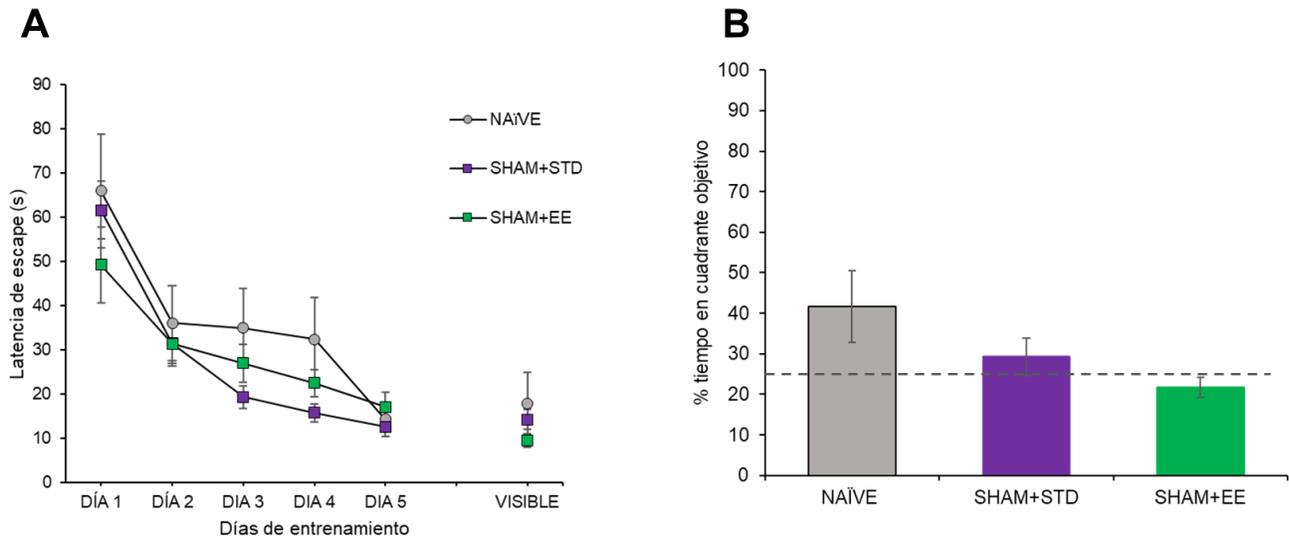


Figura 10. Desempeño cognitivo en el MWM de ratas SHAM e intactas. Las ratas fueron sometidas a una craneotomía al día postnatal 21 (SHAM) o permanecieron intactas (NAÏVE). **A)** Se evaluó la latencia de escape durante la fase de entrenamiento del día post-lesión 14 al 19. Al día post lesión 20 se realizó un ensayo con una plataforma visible para determinar la agudeza visual. **B)** El mismo día se realizó una prueba de transferencia sin plataforma en la que se evaluó el porcentaje de tiempo que los animales permanecieron explorando el cuadrante objetivo. La línea punteada indica el valor correspondiente a una exploración azarosa. *Promedio ± EST (NAÏVE: n = 4; SHAM: n = 10.)*

EFFECTO DEL EE SOBRE LA MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES DESPUÉS DE UNA TBI EN ANIMALES JUVENILES

Corteza

El análisis estadístico del área de cobertura celular (CEA) de las células microgliales en la corteza ipsilateral a la lesión, mostró un efecto significativo del tratamiento [$F_{(4, 35)} = 11.55, p < 0.0001$]. Las comparaciones múltiples indicaron que los tres grupos de animales lesionados tuvieron una CEA significativamente menor que los animales SHAM (Tabla 2). No se observaron diferencias significativas en la corteza contralateral ni en el tamaño del soma ($p > 0.05$).

Tabla 2. Características morfológicas de la microglia en la corteza.

| Grupo | CORTEZA | | | |
|-------------------------|---------------------------|---------------|---|----------------|
| | Tamaño del soma (μ) | | Área de cobertura celular (μm^2) | |
| | Ipsilateral | Contralateral | Ipsilateral | Contralateral |
| SHAM+STD | 64.22±2.97 | 67.40±4.34 | 2297.81±70.32 | 2288.48±105.29 |
| SHAM+EE | 67.58±4.63 | 66.85±5.34 | 2248.78±103.92 | 2274.27±67.3 |
| TBI+STD | 66.25±3.27 | 66.39±4.87 | 1484.38±134.9***### | 2251.89±121 |
| TBI+EE | 60.94±1.91 | 63.28±2.84 | 1761.91±173.5*# | 2232.04±87.7 |
| TBI+EE Sin cohabitación | 63.09±3.76 | 61.58±2.77 | 1487.65±66.27***### | 2311.63±112.99 |

STD: condiciones estándar, EE: ambiente enriquecido, TBI: lesión cerebral traumática. Promedio \pm EST, ANOVA, * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ vs SHAM+STD; # $p < 0.05$ y ### $p < 0.001$ vs SHAM+EE COH. (n=8).

Posteriormente, analizamos el radio CEA/soma y el porcentaje de células con morfología activada como parámetros de neuroinflamación (Figura 11). El ANOVA indicó un efecto significativo de los tratamientos sobre el porcentaje de células microgliales activadas [$F_{(4, 35)} = 4.96$, $p = 0.0028$] y del radio CEA/soma [$F_{(4, 35)} = 6.09$, $p = 0.0008$] en la corteza ipsilateral. Las pruebas post hoc mostraron una mayor activación microglial en los grupos TBI+STD y TBI+EE sin cohabitación con respecto a los animales SHAM (Figura 11). No se observaron diferencias en el porcentaje de células activadas ni el radio CEA/soma de la corteza contralateral.

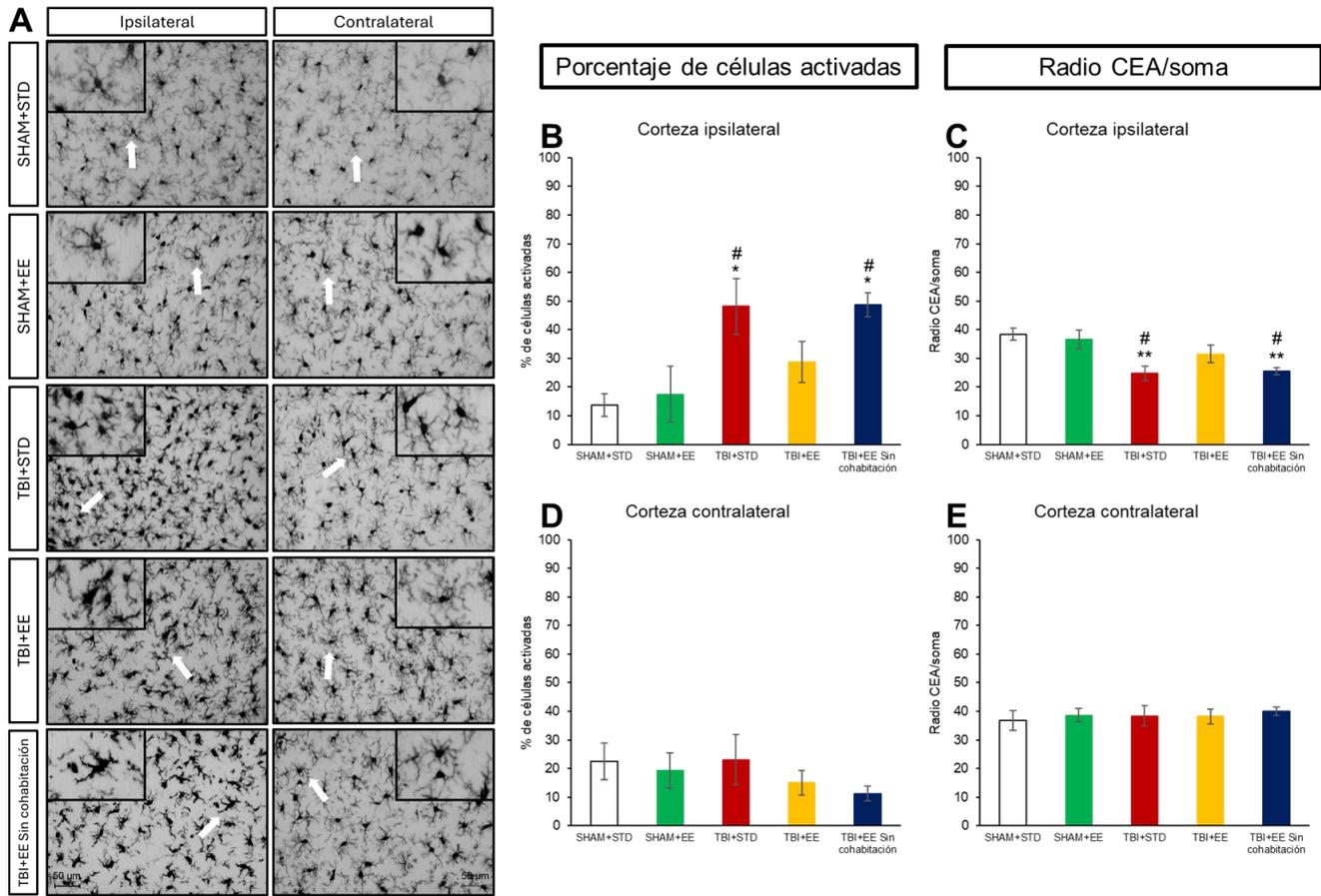


Figura 11. Análisis de activación microglial en la corteza. Las ratas fueron sometidas a una cirugía de impacto cortical controlado (TBI) al día postnatal 21 o permanecieron como testigos (SHAM). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de alojamiento (STD) o enriquecimiento ambiental (EE) con y sin cohabitación con animales SHAM. A) Imágenes representativas de las inmunotinciones de IBA 1 en la corteza. Los insertos muestran imágenes amplificadas de las células señaladas por las flechas. Al día post lesión 21 se cuantificó el porcentaje de células microgliales que presentan fenotipo activado (B y D) y el radio CEA/soma (C y E) en la corteza ipsilateral y contralateral a la lesión. *Promedio ± EST, ANOVA, **p < 0.005 vs SHAM+STD; ###p < 0.01 vs SHAM+EE; &&p < 0.01 vs TBI+STD. (n = 8).*

Región CA1 del hipocampo

El ANOVA para nuestros datos de CEA de las células microgliales en la región CA1 hipocampal ipsilateral, indicó un efecto significativo del tratamiento [$F_{(4, 35)} = 15.03, p < 0.0001$]. Las

comparaciones múltiples revelaron que los tres grupos TBI tuvieron una menor cobertura celular en comparación con ambos grupos SHAM (Tabla 3). No se observó efecto de los tratamientos sobre la CEA en la región contralateral ni sobre el tamaño del soma en ninguno de los lados.

Tabla 3. Características morfológicas de la región CA1 del hipocampo.

| Grupo | CA1 | | | |
|-------------------------|---------------------------|---------------|---|----------------|
| | Tamaño del soma (μ) | | Área de cobertura celular (μm^2) | |
| | Ipsilateral | Contralateral | Ipsilateral | Contralateral |
| SHAM+STD | 59.32±2.63 | 59.06±2.36 | 2466.76±133.6 | 2595.84±116.88 |
| SHAM+EE | 62.83±4.5 | 60.07±2.51 | 2701.99±102.68 | 2731.5±152.27 |
| TBI+STD | 52.14±2.66 | 53.94±2 | 1771.47±110.49**### | 2538.59±165.67 |
| TBI+EE | 65.64±4.43 | 61.66±2.03 | 1943.86±176.73*## | 2589.37±184.56 |
| TBI+EE Sin cohabitación | 61.76±4.29 | 61.52±5.77 | 1532.46±84.52***### | 2567.42±113.34 |

STD: condiciones estándar, EE: ambiente enriquecido, TBI: lesión cerebral traumática. Promedio \pm EST, ANOVA, * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ vs SHAM+STD; # $p < 0.05$ y ### $p < 0.001$ vs SHAM+EE COH. (n=8).

Los análisis mostraron un efecto del tratamiento sobre el porcentaje de células microgliales activadas en la región CA1 del hipocampo ipsilateral [$F_{(4, 35)} = 8.255$, $p < 0.0001$]. La prueba *post hoc* de Tukey indicó un mayor porcentaje de activación en los dos grupos TBI+EE con respecto a los animales SHAM. Además, el grupo TBI+EE sin cohabitación, también presentó mayor activación de células microgliales que el grupo TBI+STD ($p < 0.05$). Se encontró un efecto similar en el parámetro radio CEA/soma [$F_{(4, 35)} = 7.659$, $p = 0.0002$], en el que los animales alojados en EE tuvieron un menor radio en comparación con los STD. No se observaron diferencias en la zona CA1 contralateral ($p < 0.05$; Figura 12).

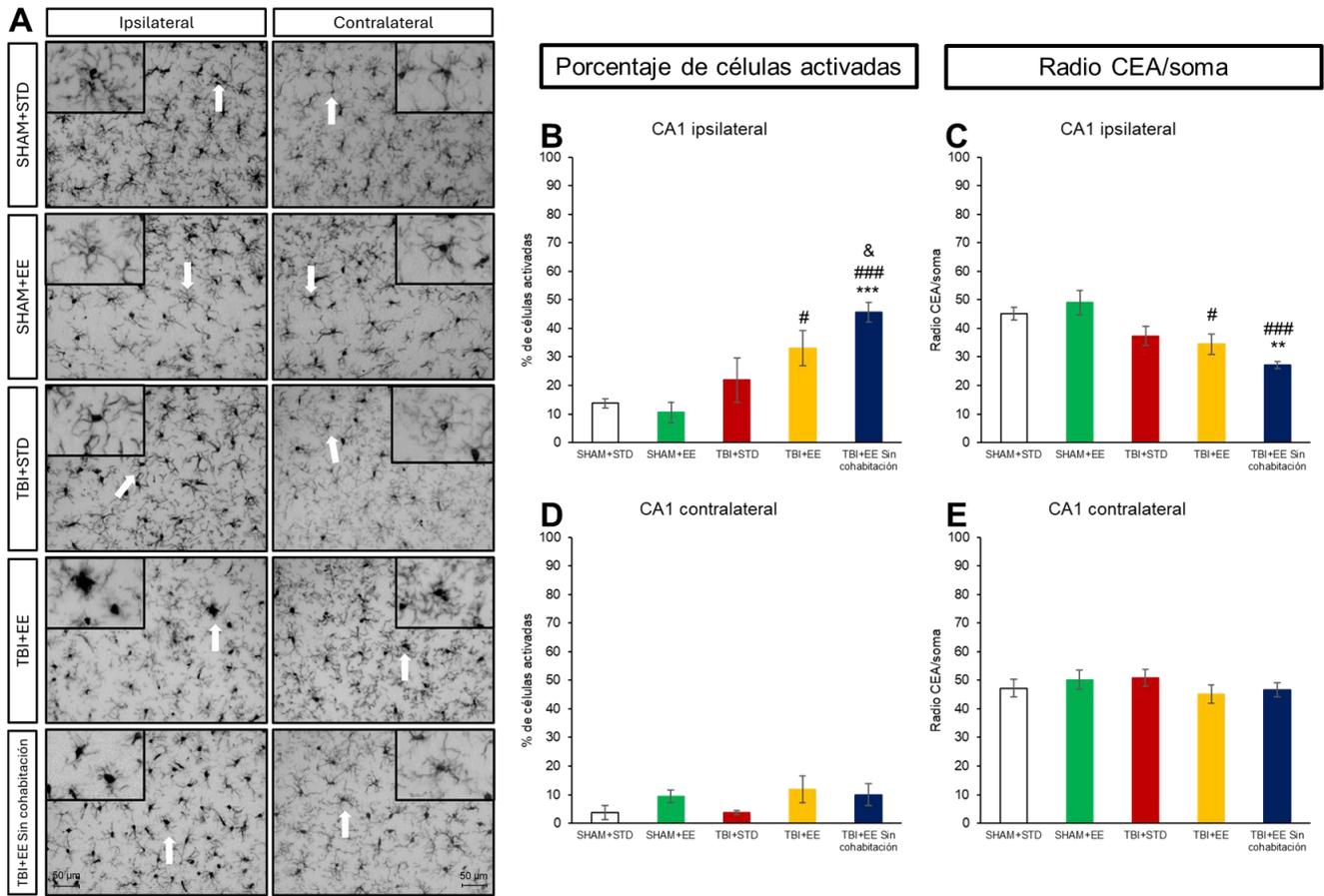


Figura 12: Análisis de activación microglial en la región CA1 del hipocampo. Las ratas fueron sometidas a una cirugía de impacto cortical controlado (TBI) al día postnatal 21 o permanecieron como testigos (SHAM). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de alojamiento (STD) o enriquecimiento ambiental (EE) con y sin cohabitación con animales SHAM. **A)** Imágenes representativas de las inmunotinciones de IBA 1 en región CA1 del hipocampo. Los insertos muestran imágenes amplificadas de las células señaladas por las flechas. Al día post lesión 21 se cuantificó el porcentaje de células microgliales que presentan fenotipo activado (**B y D**) y el radio CEA/soma (**C y E**) en el hipocampo ipsilateral y contralateral a la lesión. *Promedio ± EST, ANOVA, **p < 0.01y ***p < 0.001 vs SHAM+STD; #p < 0.05 y ##p < 0.01 vs SHAM+EE; &p < 0.05 vs TBI+STD. (n=8).*

Región hilus del hipocampo

Se encontró un efecto del tratamiento en el CEA de las células microgliales de la región hilus ipsilateral [$F_{(4, 35)} = 20.64$, $p < 0.0001$], pero no en el tamaño del soma ni en las zonas contralaterales ($p > 0.05$). El análisis de comparaciones múltiples indicó que los grupos TBI tuvieron una menor área de cobertura en comparación con los dos grupos de animales SHAM (Tabla 4).

Tabla 4. Características morfológicas de la región del hilus hipocampal.

| Grupo | HILUS | | | |
|-------------------------|---------------------------|---------------|---|----------------|
| | Tamaño del soma (μ) | | Área de cobertura celular (μm^2) | |
| | Ipsilateral | Contralateral | Ipsilateral | Contralateral |
| SHAM+STD | 62.28±4.06 | 62.09±4.38 | 1968.84±102.05 | 2076.85±124.55 |
| SHAM+EE | 62.41±5.12 | 64.1±2.98 | 1923.76±81.33 | 2056.16±60.55 |
| TBI+STD | 66.47±3.18 | 63.5±4.37 | 1081.84±79.89***### | 1949.43±128.15 |
| TBI+EE | 63.82±3.69 | 65.88±1.99 | 1321.97±130.53***### | 1862.57±156.85 |
| TBI+EE Sin cohabitación | 65.99±4.01 | 63.43±3.82 | 1089.87±79.3***### | 2059.04±149.47 |

STD: condiciones estándar, EE: ambiente enriquecido, TBI: lesión cerebral traumática. Promedio \pm EST, ANOVA, * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ vs SHAM+STD; # $p < 0.05$ y ### $p < 0.001$ vs SHAM+EE COH. ($n=8$).

En la región hilus del hipocampo ipsilateral, se observó un efecto del tratamiento sobre la activación microglial [$F_{(4, 35)} = 14.15$, $p < 0.0001$] y el radio CEA/soma [$F_{(4, 35)} = 15.94$, $p < 0.0001$], donde las comparaciones múltiples mostraron un mayor porcentaje de activación y un menor radio en los tres grupos TBI con respecto a los animales SHAM (Figura 13).

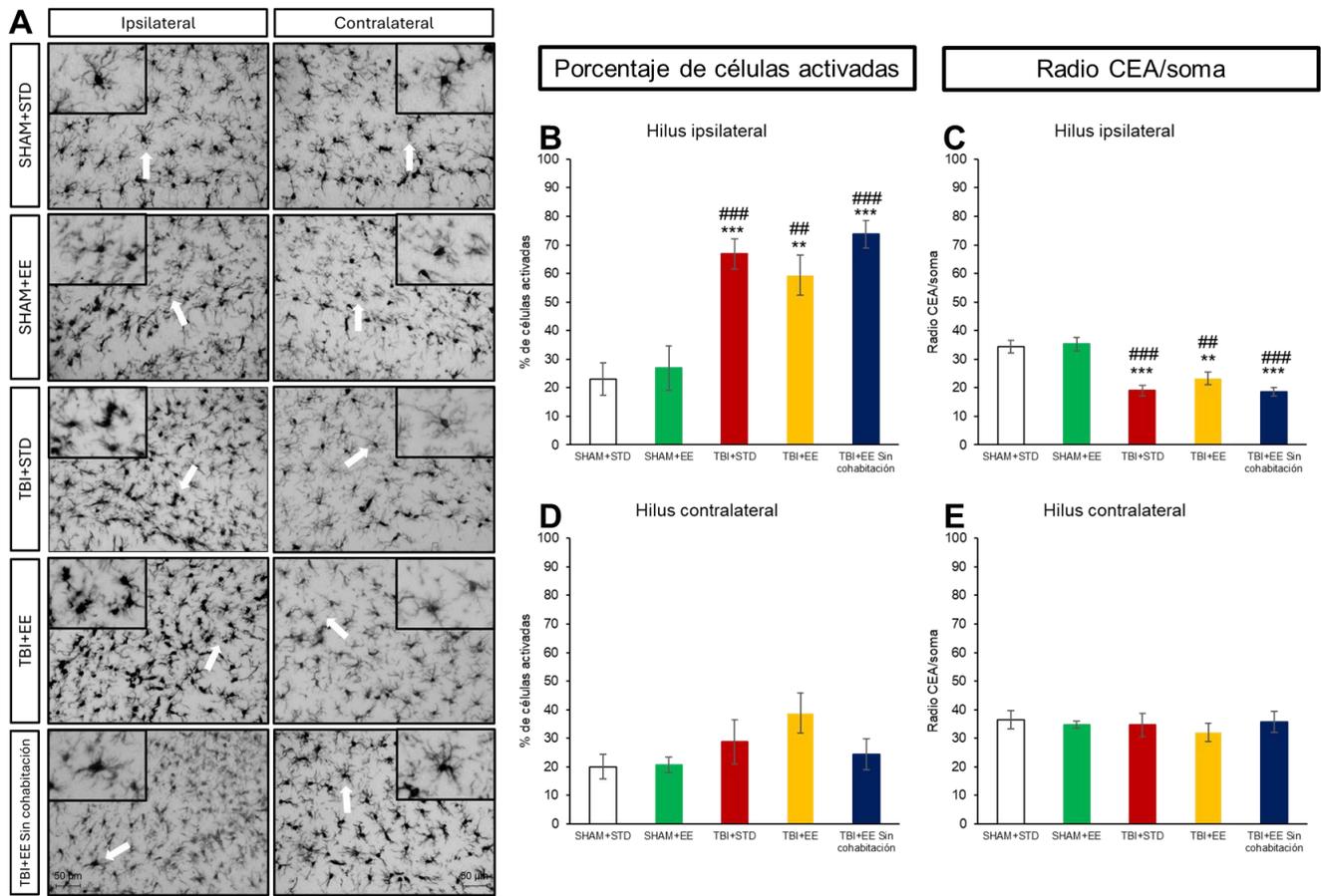


Figura 13: Análisis de activación microglial en la región del hilus hipocampal. Las ratas fueron sometidas a una cirugía de impacto cortical controlado (TBI) al día postnatal 21 o permanecieron como testigos (SHAM). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de alojamiento (STD) o enriquecimiento ambiental (EE) con y sin cohabitación con animales SHAM. **A)** Imágenes representativas de las inmunotinciones de IBA 1 el hilus del hipocampo. Los insertos muestran imágenes amplificadas de las células señaladas por las flechas. Al día post lesión 21 se cuantificó el porcentaje de células microgliales que presentan fenotipo activado (**B y D**) y el radio CEA/soma (**C y E**) en el hipocampo ipsilateral y contralateral a la lesión. *Promedio ± EST, ANOVA, **p < 0.01 y ***p < 0.001 vs SHAM+STD; ##p < 0.01 y ###p < 0.001 vs SHAM+EE; (n=8).*

EFFECTO DE LA TBI Y EL EE SOBRE LA DIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

Diversidad alfa y beta

Al realizar el alineamiento, se encontraron 839 especies en el grupo SHAM+STD; 1417 en el grupo SHAM+EE, 918 en el grupo TBI+STD, 1254 en el grupo TBI+EE y 920 en el grupo TBI+EE sin cohabitación. Se calcularon los índices de Shannon y Simpson de diversidad alfa para comparar la riqueza de especies entre los cinco grupos de animales (Figura 14). Las comparaciones se realizaron mediante una prueba de Wilcoxon para medidas no-paramétricas que indicaron que los grupos TBI+STD y TBI+EE que no tuvieron contacto con animales SHAM (medianas 2.96 y 3.15, respectivamente) tuvieron una riqueza significativamente menor que el grupo SHAM+EE ($M_e = 3.64$; $p = 0.0087$). El grupo TBI+EE en cohabitación ($M_e = 3.59$) no fue diferente del grupo SHAM+STD ($M_e = 3.05$) ni de ningún otro grupo. En el índice de Simpson, las comparaciones múltiples mediante la prueba de Wilcoxon indicaron que el grupo SHAM+EE ($M_e = 0.93$) tuvo una mayor riqueza que el grupo SHAM+STD ($M_e = 0.9$; $p = 0.041$). De forma similar al índice de Shannon, en el índice de Simpson también se encontró que los grupos TBI+STD ($M_e = 0.87$) y TBI+EE sin cohabitación ($M_e = 0.89$) tuvieron una menor riqueza que el grupo SHAM+EE ($p < 0.01$). El grupo TBI+EE ($M_e = 0.94$) no fue diferente de ningún otro grupo ($p > 0.05$).

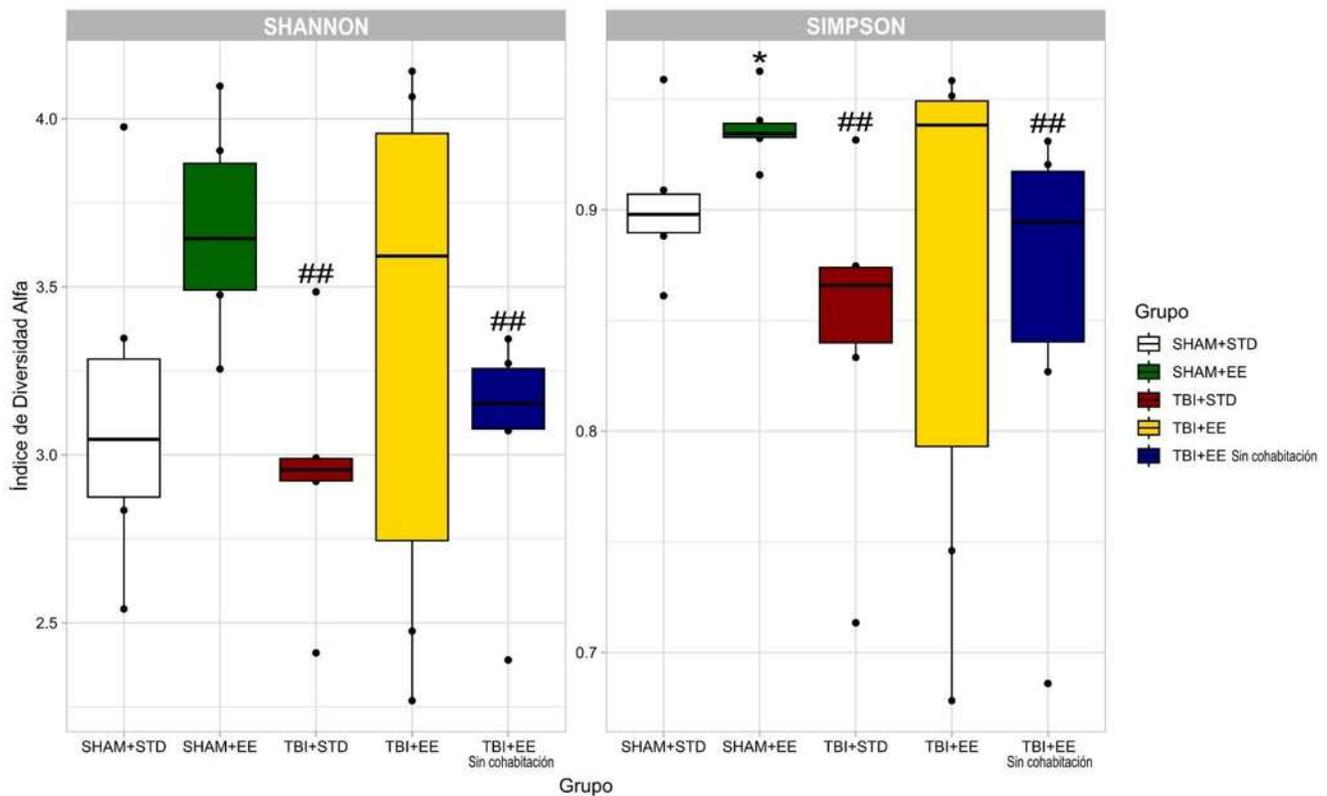


Figura 14. Diversidad alfa de la microbiota intestinal. Las ratas fueron sometidas a una cirugía de impacto cortical controlado (TBI) al día postnatal 21 o permanecieron como testigos (SHAM). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de alojamiento (STD) o enriquecimiento ambiental (EE) con y sin cohabitación con animales SHAM. La eutanasia se realizó al día post lesión 21 y se caracterizó la diversidad de la microbiota intestinal mediante secuenciación del gen de rRNA 16S. **A)** Índice de Shannon y **B)** Simpson. Mediana; IQR, Wilcoxon rank sum test, * $p < 0.05$ vs SHAM+STD; ## $p < 0.01$ vs SHAM+EE ($n = 6$).

Se determinó la distancia de Bray-Curtis como medida de diversidad beta, que indica la variación en la composición de las poblaciones microbianas entre los grupos, y se realizó un análisis de NMDS (Figura 15). La PERMANOVA reveló un efecto significativo de la lesión [$F_{(1, 28)} = 2.67$, $p = 0.009$] y de la cohabitación [$F_{(1, 28)} = 4.22$, $p = 0.001$], pero no del alojamiento [$F_{(1, 28)} = 2.67$, $p = 0.083$]. Además, considerando que los factores lesión y alojamiento podrían depender entre sí, se realizó una prueba mediante un modelo de anidado de PERMANOVA y

se encontró un efecto de la lesión [$F_{(1, 26)} = 2.67, p = 0.0035$] y de la interacción entre la lesión y el alojamiento [$F_{(2, 26)} = 2.67, p = 0.0024$]. Posteriormente, se realizaron Adonis pareados como pruebas post-hoc y se encontró que el grupo SHAM+EE y el grupo TBI+EE tuvieron una composición microbiana diferente de los SHAM+STD ($p < 0.05$). El grupo TBI+STD fue diferente de los SHAM ($p < 0.05$). TBI+EE sin cohabitación también tuvo una composición diferente a la del grupo SHAM+EE ($p < 0.01$). Por último, ambos grupos TBI+EE (con y sin cohabitación) tuvieron una composición diferente en su comunidad microbiana ($p < 0.05$).

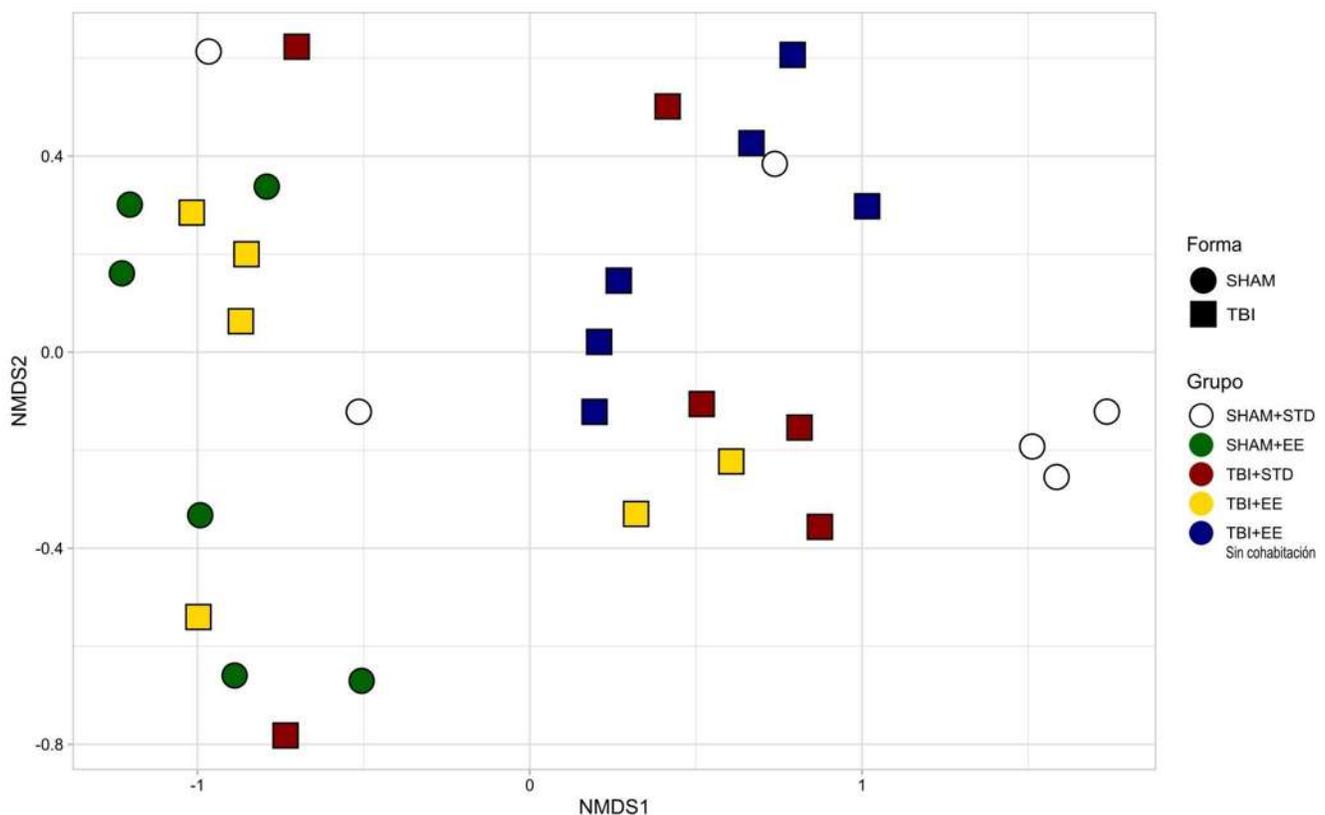


Figura 15. Diversidad beta de la microbiota intestinal. Las ratas fueron sometidas a una cirugía de impacto cortical controlado (TBI) al día postnatal 21 o permanecieron como testigos (SHAM). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de alojamiento (STD) o enriquecimiento ambiental (EE) con y sin cohabitación con animales SHAM. La eutanasia se realizó al día post lesión 21 y se caracterizó la diversidad de la microbiota intestinal mediante secuenciación del gen de rRNA 16S.

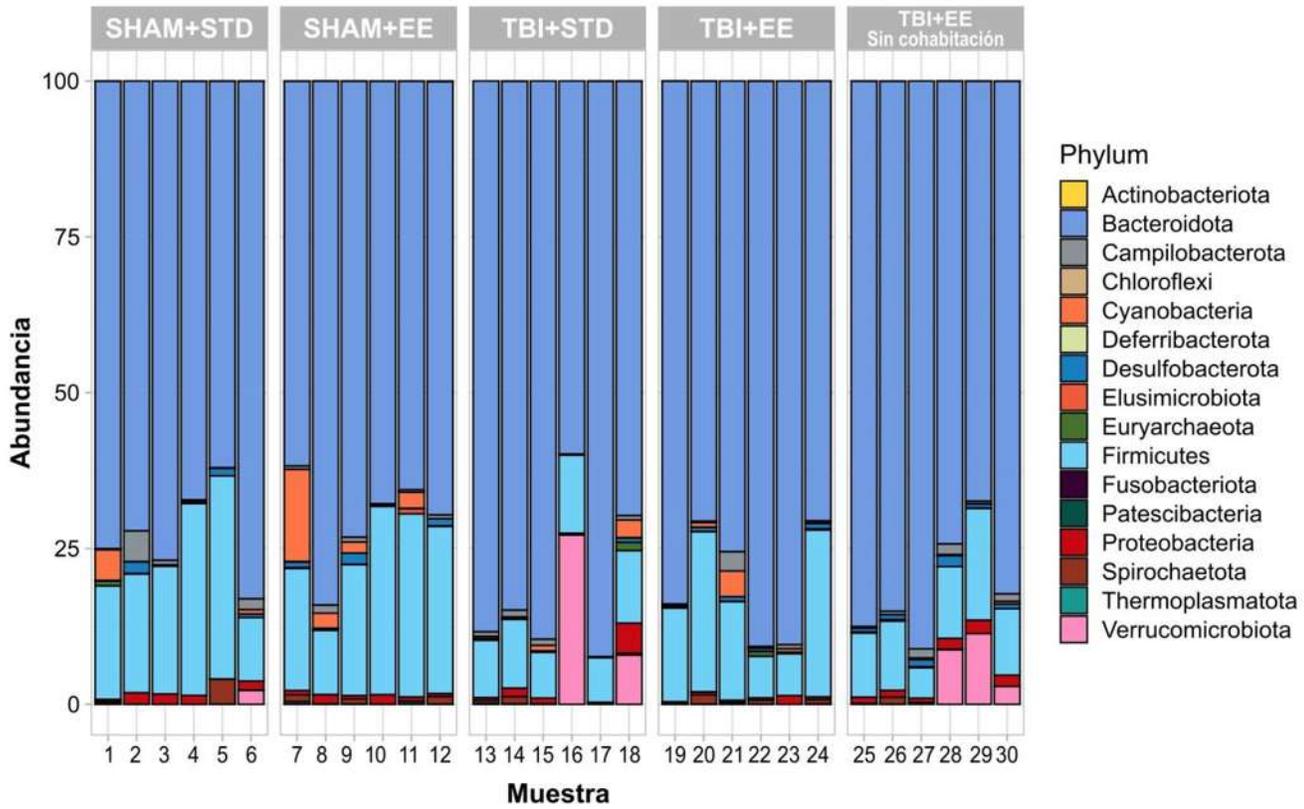
Gráfica NMDS de la distancia de Bray-Curtis como medida de diversidad beta evaluada en animales sujetos a una TBI pediátrica o controles (SHAM) alojados en condiciones estándar de bioterio (STD) o de enriquecimiento ambiental (EE), con (CO) y sin cohabitación (NO CO) con animales SHAM. *Mediana; IQR, Wilcoxon rank sum test, *p < 0.05 vs SHAM+STD; ##p < 0.01 vs SHAM+EE. (n = 6).*

Abundancia relativa a nivel de phylum y género

El análisis de abundancia relativa a nivel de phylum (Figura 16A) reveló que el más abundante en todos los grupos fue Bacteroidota (entre 70% y 81%). Los grupos SHAM presentaron una mayor representación del phylum Firmicutes (21.9% y 22.9%,) que los animales lesionados (TBI+STD: 9.84%; TBI+EE: 16.15%; TBI+EE Sin cohabitación: 11.09%).

A nivel de género, se observó un importante incremento en la representación del grupo *Prevotellaceae NK3B31* en los animales TBI en comparación con los animales SHAM. Asimismo, se observó una reducción de la representación de *Bacteroides* en los tres grupos TBI y en el grupo SHAM que se alojó en cohabitación con animales TBI + EE. También, observamos un incremento de *Prevotella*, *Lactobacillus* y *Alloprevotella* en los grupos SHAM y TBI que se alojaron en cohabitación en EE (Figura 16B).

A)



B)

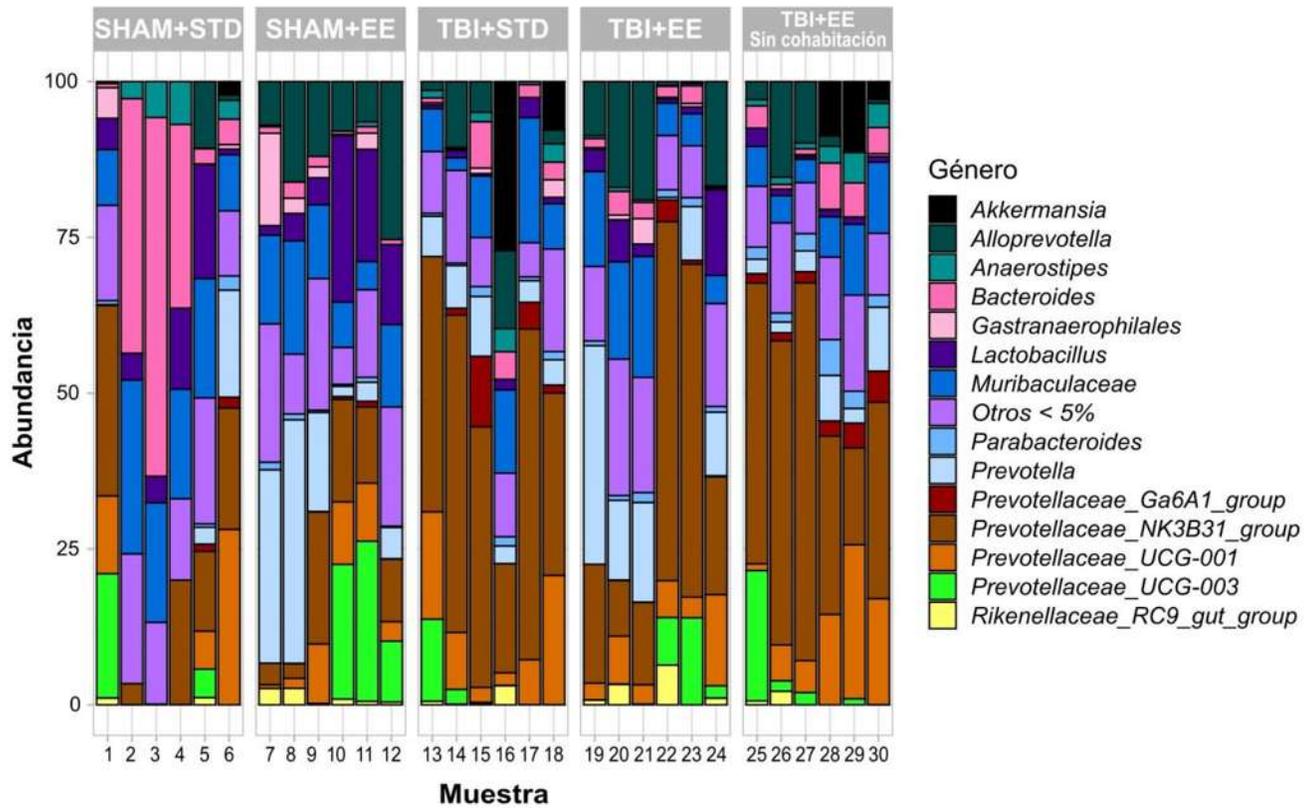


Figura 16. Abundancia relativa a nivel phylum y género. Las ratas fueron sometidas a una cirugía de impacto cortical controlado (TBI) al día postnatal 21 o permanecieron como testigos (SHAM). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de alojamiento (STD) o enriquecimiento ambiental (EE) con y sin cohabitación con animales SHAM. La eutanasia se realizó al día post lesión 21 y se caracterizó la diversidad de la microbiota intestinal mediante secuenciación del gen de rRNA 16S. Se muestra la abundancia en porcentaje a nivel de **A) Phylum** y **B) Género** (n = 6).

Análisis de abundancia diferencial entre taxones

El análisis discriminante lineal (LDA) del tamaño del efecto (LEfSe) a nivel de género (puntuación LDA > 2, $p \leq 0,05$) permitió identificar que existen 13 taxones que se expresaron de forma diferencial entre los animales SHAM y los TBI+STD. Como podemos observar en la gráfica (Figura 17), de los géneros más abundantes de los grupos TBI+STD y TBI+EE con respecto a los otros grupos, corresponden a la familia Prevotellaceae. Por otro lado, el género *Lactobacillus* se encontró enriquecido en el grupo SHAM+EE.

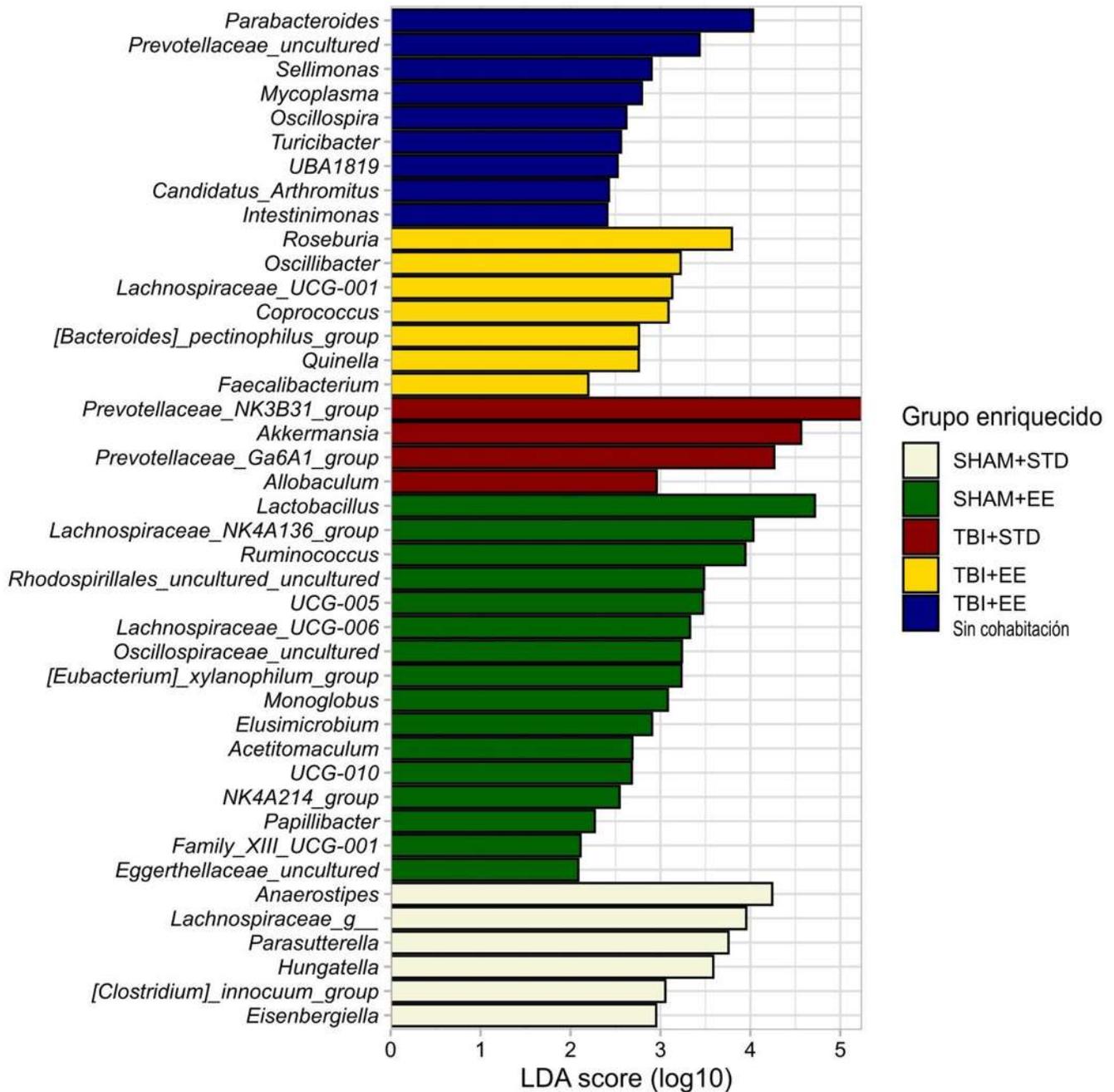


Figura 17. Análisis microbiano cecal basado en LEfSe a nivel género. Se muestra el puntaje LDA que indica los géneros más representados en animales que fueron sometidas a una cirugía de impacto cortical controlado (TBI) al día postnatal 21 o permanecieron como testigos (SHAM). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de alojamiento (STD) o enriquecimiento ambiental (EE) con y sin cohabitación con animales SHAM. Los parámetros predeterminados fueron puntuación LDA > 2 y p ≤ 0,05 (n = 6).

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó por primera vez el efecto del enriquecimiento ambiental sobre la microbiota intestinal y su relación con el desempeño cognitivo y la activación microglial de ratas sometidas a una lesión cerebral traumática pediátrica. Los resultados mostraron que la TBI causó déficits en el desempeño cognoscitivo que se acompañaron de un aumento en la activación microglial de la corteza y el hilus ipsilaterales a la lesión, así como cambios en la diversidad de la microbiota intestinal. Observamos que únicamente el grupo TBI+EE sin cohabitación mostró una recuperación completa en la evaluación de desempeño cognitivo. No obstante, en contradicción con nuestra hipótesis, este efecto benéfico no mostró asociación con la activación microglial ni con la diversidad de la microbiota.

La evaluación neurológica aguda en roedores post-TBI es un análogo de la Escala de Coma de Glasgow utilizada en humanos y se emplea como una medida de control para determinar la homogeneidad de la lesión y la reproducibilidad del modelo (Fujimoto et al., 2014). De acuerdo con lo esperado, observamos que los animales lesionados mostraron un incremento en el tiempo de enderezamiento con respecto a los SHAM y que no se observaron diferencias significativas entre los grupos lesionados. Esto nos indica que todos los animales incluidos en el análisis tuvieron una severidad de lesión similar y nos permite asumir que las diferencias observadas en la conducta no son debidas a un sesgo experimental.

Los animales SHAM alojados en condiciones de EE mostraron una menor ganancia de masa corporal. Estos datos se encuentran en congruencia con estudios previos que demostraron que el EE disminuye la ganancia de peso en animales adolescentes debido a la actividad física (Zaias et al., 2008). Sin embargo, este efecto no se observó en los animales TBI alojados en condiciones de EE; esto puede deberse al incremento de la fatiga e intolerancia al

ejercicio después de una TBI que ha sido reportada en la literatura (Hamel & Smoliga, 2019; Ouellet et al., 2015). Adicionalmente, para asegurarnos de que ningún tratamiento estuviera interfiriendo con el crecimiento normal de los animales, se evaluó la tasa de crecimiento y no se encontró ninguna diferencia significativa, lo que indica que ni la lesión ni la exposición al EE influyeron en el crecimiento de las ratas.

De acuerdo con lo previamente reportado (Monaco et al., 2014; Dill et al., 2023), los animales TBI+STD mostraron latencias de escape significativamente mayores que los animales SHAM durante la fase de adquisición del aprendizaje del MWM, lo cual se interpreta como un déficit cognoscitivo. En el presente trabajo, el grupo TBI+EE sin cohabitación, más no el grupo TBI+EE que se mantuvo en condiciones de cohabitación con animales SHAM, mostró latencias de escape significativamente diferentes a los animales TBI+STD, mientras que los animales TBI+EE sin cohabitación no tuvieron un desempeño diferente de ningún grupo. Estos resultados se encuentran en discrepancia con lo previamente reportado por Monaco et al. (2014) quienes observaron que el paradigma tradicional de EE, en el que los animales lesionados son mantenidos en condiciones de cohabitación con SHAM promueve la recuperación conductual en un modelo de TBI al PND17. Es importante destacar que, si bien no observamos una diferencia en el desempeño cognoscitivo de los animales TBI+STD con respecto a los TBI+EE sin cohabitación, este último grupo no mostró diferencias significativas con respecto al desempeño cognoscitivo de los SHAM. Esta falta de efecto sugiere que si bien, el EE sin cohabitación no revierte completamente los efectos del TBI como el EE sin cohabitación, si ejerce un papel protector moderado.

El efecto de la cohabitación durante el EE puede deberse a muchos factores. Particularmente, proponemos que los animales SHAM ejercen algún tipo de dominancia social

sobre los animales con TBI, lo que pudo haber limitado el aprovechamiento de los recursos del EE en cohabitación. En apoyo a esta idea, se ha reportado que los niños que han experimentado una TBI son más propensos a sufrir rechazo social de sus congéneres y, en ratas, esto se ha replicado principalmente en hembras en pruebas de conducta social como el juego de peleas (Mychasiuk, et al., 2014). Por otra parte, un estudio reciente llevado a cabo por Dill et al. (2023) reportó que el EE promueve la recuperación conductual en animales que sufrieron una TBI al PND21 de forma independiente al nivel de socialización. Los autores compararon a animales TBI que se mantuvieron en condiciones STD y EE sin cohabitación con animales SHAM, pero que contaban con diversos niveles de interacción social (dos animales por caja vs 6 animales por caja) y observaron que los grupos ambos TBI mantenidos en condiciones STD mostraron déficits cognoscitivos de forma independiente del nivel de socialización. Adicionalmente observaron que estos déficits no están presentes en los animales EE (Dill et al., 2023).

El criterio alcanzado en la retención de memoria durante la prueba de transferencia fue el mínimo incluso para los animales SHAM y no se observó ningún efecto del tratamiento. Cole et al. (2011) han reportado que la craneotomía aumenta el perfil proinflamatorio en tejido cortical y no les resultó ser un control apropiado. Por ello, se realizó otro experimento utilizando animales intactos (NAÏVE) para corroborar que la craneotomía bajo nuestras condiciones no provoca un déficit cognitivo en las ratas. El resultado de la fase de entrenamiento en el MWM no mostró ningún efecto del tratamiento, por lo que podemos asegurar que la craneotomía no afecta el desempeño bajo nuestras condiciones. En la prueba de transferencia, no se observó ninguna diferencia. El-Demerdash et al. (2023) reportaron que los animales TBI, a pesar del claro déficit observado en la fase de entrenamiento, su preferencia por el cuadrante objetivo en las pruebas de transferencia sigue siendo mayor que una exploración azarosa. Además, observaron que los animales SHAM no tuvieron déficits en las latencias de escape, pero su

desempeño en las pruebas de transferencia fue similar al de los animales TBI, pero esto está más relacionado con las estrategias de búsqueda que poseen que con la memoria espacial (El-Demerdash et al., 2023). Esto nos indica que todos los animales logran recordar dónde estaba la plataforma independientemente de cuánto tardaron en aprenderlo y que nuestra craneotomía no produce déficits.

Se estudió a la población de células microgliales en las zonas hipocampales CA1 e hilus, así como en la corteza adyacente a la lesión como indicadores de neuroinflamación. Debido a que el marcador IBA1 tiñe a todas las células microgliales y no necesariamente a aquellas en estado activado, fue necesario realizar una evaluación morfológica para clasificarlas en sus distintos estadios como fue previamente descrito por Diz-Chaves et al. (2012). Se escogió la región de CA1 del hipocampo porque, además de participar en el circuito trisináptico característico del aprendizaje espacial, ahí se ha reportado una reducción de daño ocasionado por la TBI después de la exposición al EE (Camacho-Ugarte et al., 2020; Kandel et al., 2014; Kline et al., 2010). También se seleccionó al hilus por su cercanía con el mayor nicho neurogénico del giro dentado y de los plexos coroideos, lo que hace más rápida su interacción con las células del sistema inmunológico periférico (Kandel et al, 2014; Toni & Schnider, 2021). En un estudio previo de nuestro equipo de trabajo, se encontró un efecto de la lesión mediante nuestro modelo de CCI sobre la activación microglial en esta región. Además, en dicho estudio, se determinó que el parámetro que predice con mayor precisión el fenotipo microglial activado es el radio CEA/soma (Salinas-García et al., 2023).

En el presente trabajo, encontramos que el TBI causó un aumento en la activación microglial en la corteza y el hilus ipsilaterales a la lesión con respecto a los animales SHAM. No obstante, este aumento no solo prevalece en los animales TBI+EE sin cohabitación, sino que,

además, el EE causó un aumento en la activación microglial de CA1. Esto fue contrario a nuestra hipótesis, ya que este último grupo mostró el mejor desempeño cognoscitivo en el MWM. Es importante destacar que el grupo TBI+EE sin cohabitación no mostró una reducción significativa en la inflamación con respecto a los animales TBI+STD, pero tampoco mostró un aumento significativo respecto a los SHAM. Esto sugiere que de forma similar a lo observado en el desempeño cognoscitivo, el EE sin cohabitación ejerce un efecto protector moderado. En congruencia con esto, se ha reportado que el EE en condiciones de cohabitación con animales SHAM promueve la recuperación parcial, mas no total, del desempeño cognoscitivo y reduce la inmunoreactividad de Iba1+ en después de una TBI en animales adultos (Tapias et al., 2022).

Actualmente, se reconoce que la microglía activada puede tener diferentes roles, siendo considerada neuroprotectora cuando desempeña funciones beneficiosas, como la eliminación de agentes patógenos y la promoción de la supervivencia celular, y neuroinflamatoria cuando contribuye a exacerbar el daño neuronal (Harry, 2016; Fujita & Yamashita, 2021). Por ejemplo, se ha reportado que, inmediatamente después de la lesión, la TBI causa un aumento en la neurogénesis hipocampal (Villasana et al., 2015). La microglía puede modular la integración de estas células nuevas y la reparación tisular después de la TBI (Willis et al., 2020). Asimismo, se propone que la microglía activada participa en el proceso de poda sináptica modulando la plasticidad y eliminando las conexiones aberrantes (Paolicelli et al., 2011). Este fenotipo celular se caracteriza por la expresión de marcadores como CD68, y Arginasa 1 (Arg1), los cuales están asociados con la fagocitosis de materiales extracelulares y la producción de factores de crecimiento que promueven la supervivencia neuronal (Kumar & Loane, 2012; Chiu et al., 2016; Loane & Kumar, 2016; Simon et al., 2017). Por otro lado, la microglía activada asociada a la neuroinflamación produce citocinas proinflamatorias como IL-1 β , y presenta marcadores como CD11b, CD86 y CD40 (Kumar & Loane, 2012; Loane & Kumar, 2016; Huang et al., 2021). Esta

activación puede resultar en un ciclo de inflamación crónica y daño neuronal que contribuye al desarrollo y progresión del daño asociado a la TBI. Dado que, en el presente trabajo, el grupo que mostró el mejor desempeño cognoscitivo (TBI+EE sin cohabitación) no mostró una disminución en la neuroinflamación (evaluada mediante la morfología microglial) inducida por la lesión, podemos proponer que la activación microglial no es el principal mecanismo que subyace los efectos benéficos de EE. No obstante, nuestro estudio tiene limitaciones debido a que el análisis de morfología microglial no permite distinguir entre los diferentes fenotipos microgliales mencionados previamente. Por lo tanto, es pertinente suponer que el aumento en la activación microglial observado en el grupo con mejor desempeño cognoscitivo pudiera estar asociado a un aumento en la microglía activada neuroprotectora y no a la neuroinflamatoria. Es necesario realizar más estudios de seguimiento encaminados a evaluar la expresión de citocinas proinflamatorias y marcadores de fenotipo microglial como Arg1 o CD11b que nos permitan diferenciar entre los diferentes fenotipos microgliales.

De acuerdo a lo previamente reportado (Nicholson et al., 2019; Davis IV et al., 2022), la TBI provocó una disminución en los índices de diversidad de la microbiota intestinal; este efecto no se revirtió en los animales lesionados mantenidos en condiciones de EE sin cohabitación, pero si en los que cohabitaron con animales SHAM. Estos datos, sugieren que, si bien la transferencia de microbiota fecal entre individuos SHAM y TBI dentro de la caja de EE provocó una "homogenización" de la diversidad de su microbiota, este parámetro no se asocia con el desempeño cognoscitivo debido a lo observado en la prueba de MWM. Bajo este contexto, es importante resaltar que, aunque no hubo efecto del EE sin cohabitación sobre la diversidad de la microbiota, no es posible descartar que existan diferencias en algunos de los taxones específicos que son relevantes en la fisiopatología de la lesión (por ejemplo, los de la familia Prevotellaceae), y que pudieran tener un impacto en el desempeño cognitivo observado. Es de

notable importancia que ambos grupos SHAM presentan mayor abundancia de bacterias de la familia Lachnospiraceae. Se ha reportado que estas bacterias están involucradas en la producción de butirato (Louis et al., 2019; Saladrigas-García et al, 2021). El butirato es un ácido graso de cadena corta asociado, según diversos estudios, con una mejor integridad de la barrera intestinal, así como con un efecto neuroprotector y antiinflamatorio en modelos de TBI y de lesión en médula espinal (Dalile et al., 2019; Lanza et al., 2019; Rice, et al., 2019; Jing, et al., 2021; Davis et al., 2022). Además, también se ha reportado una reducción de la abundancia de Lachnospiraceae asociada con un incremento de Verrucomicrobiaceae después de la TBI, lo que también podemos observar de este estudio (Celorrio et al., 2023).

CONCLUSIÓN

Los resultados mostraron que la TBI causó déficits en el desempeño cognitivo acompañados de un aumento en la activación microglial de la corteza y el hilus ipsilaterales a la lesión, así como cambios en la diversidad de la microbiota intestinal. El TBI+EE sin cohabitación causó una recuperación completa en la evaluación de desempeño cognitivo. No obstante, en contradicción con nuestra hipótesis, este efecto benéfico no mostró asociación con la activación microglial ni con la diversidad de la microbiota.

Si bien, nuestros resultados mostraron información valiosa respecto a los mecanismos fisiopatológicos que subyacen los efectos de la TBI, aún es necesario llevar a cabo estudios más detallados que permitan determinar el fenotipo celular de las células microgliales y los cambios en taxones específicos de la microbiota para confirmar estos datos.

REFERENCIAS

- 1) Abdul-Muneer, P. M.; Chandra, Namas; Haorah, James (2015). Interactions of Oxidative Stress and Neurovascular Inflammation in the Pathogenesis of Traumatic Brain Injury. *Molecular Neurobiology*, 51(3), 966–979. doi: 10.1007/s12035-014-8752-3.
- 2) Ackermans, N. L., Varghese, M., Wicinski, B., Torres, J., De Gasperi, R., Pryor, D., Elder, G. A., Gama Sosa, M. A., Reidenberg, J. S., Williams, T. M., & Hof, P. R. (2021). Unconventional animal models for traumatic brain injury and chronic traumatic encephalopathy. *Journal of neuroscience research*, 99(10), 2463–2477. doi: 10.1002/jnr.24920.
- 3) Ackermans, N. L., Varghese, M., Williams, T. M., Grimaldi, N., Selmanovic, E., Alipour, A., Balchandani, P., Reidenberg, J. S., & Hof, P. R. (2022). Evidence of traumatic brain injury in headbutting bovids. *Acta neuropathologica*, 144(1), 5–26. doi: 10.1007/s00401-022-02427-2.
- 4) Ait-Belgnaoui, A., Colom, A., Braniste, V., Ramalho, L., Marrot, A., Cartier, C., Houdeau, E., Theodorou, V., & Tompkins, T. (2014). Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 26(4), 510–520. doi: 10.1111/nmo.12295
- 5) Andriessen, T. M. J. C., Jacobs, B., & Vos, P. E. (2010). Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(10), 2381–2392. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01164.x.
- 6) Ansari, M. A., Roberts, K. N., & Scheff, S. W. (2008). Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. *Free radical biology & medicine*, 45(4), 443–452. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.038.
- 7) Aya, V., Flórez, A., Perez, L., & Ramírez, J. D. (2021). Association between physical activity and changes in intestinal microbiota composition: A systematic review. *PloS one*, 16(2), e0247039. doi: 10.1371/journal.pone.0247039.

- 8) Bailey, M. T., Dowd, S. E., Galley, J. E., Hufnagle, A. R., Allen, R. G. & Lyte, M. (2011). Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation. *25*(3), 0–407. doi: 10.1016/j.bbi.2010.10.023.
- 9) Barth, F. G. & Schmid, A. (2001). *Ecology of sensing* (). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. ISBN: 3-540-66901-9.
- 10) Belchev, Z., Boulos, M. E., Rybkina, J., Johns, K., Jeffay, E., Colella, B., Ozubko, J., Bray, M., Di Genova, N., Levi, A., Changoor, A., Worthington, T., Gilboa, A., & Green, R. (2021). Remotely delivered environmental enrichment intervention for traumatic brain injury: Study protocol for a randomised controlled trial. *BMJ open*, *11*(2), e039767. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-039767>.
- 11) Bercik, P., Collins S. M. & Verdu, E. F. (2012). Microbes and the gut-brain axis. *24*(5), 405–413. doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01906.x.
- 12) Besagar, S., Radabaugh, H. L., Bleimeister, I. H., Meyer, E. A., Niesman, P. J., Cheng, J. P., Bondi, C. & Kline, A. E. (2019). Aripiprazole and environmental enrichment independently improve functional outcome after cortical impact injury in adult male rats, but their combination does not yield additional benefits. *Experimental Neurology*, *314*, 67–73. doi: 10.1016/j.expneurol.2019.01.010.
- 13) Bird, S. M., Sohrabi, H. R., Sutton, T. A., Weinborn, M., Rainey-Smith, S. R., Brown, B., Patterson, L., Taddei, K., Gupta, V., Carruthers, M., Lenzo, N., Knuckey, N., Bucks, R. S., Verdile, G., & Martins, R. N. (2016). Cerebral amyloid- β accumulation and deposition following traumatic brain injury--A narrative review and meta-analysis of animal studies. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *64*, 215–228. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.01.004.

- 14) Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 37, 852–857 (2019). doi: 0.1038/s41587-019-0209-9.
- 15) Bondi, C. O., Klitsch, K. C., Leary, J. B. & Kline, A. E. (2014). Environmental Enrichment as a Viable Neurorehabilitation Strategy for Experimental Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, 31(10), 873–888. doi: 10.1089/neu.2014.3328.
- 16) Briones, T. L., Woods, J., & Rogozinska, M. (2013). Decreased neuroinflammation and increased brain energy homeostasis following environmental enrichment after mild traumatic brain injury is associated with improvement in cognitive function. *Acta neuropathologica communications*, 1, 57. doi: 10.1186/2051-5960-1-57 (Retraction published *Acta Neuropathol Commun.* 2022 May 17;10(1):77).
- 17) Brodbeck, D. R. (2012). Spatial Learning. *Encyclopedia of the Sciences of Learning*, 3166–3168. doi: 10.1007/978-1-4419-1428-6_44.
- 18) Burghardt, G. M., Ward, B., & Rosscoe, R. (1996). Problem of reptile play: Environmental enrichment and play behavior in a captive Nile soft-shelled turtle, *Trionyx triunguis*. *Zoo Biology*, 15(3), 223–238. doi: 10.1002/(sici)1098-2361(1996)15:3<223::aid-zoo3>3.0.co;2-d.
- 19) Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M. et al. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13, 581–583 . doi: 10.1038/nmeth.3869.
- 20) Camacho Ugarte, M. V., Bastida Codina, D. A. & Giovana Zarate, D. S. (2020). Estudio anatómico del hipocampo como una de las regiones de neurogénesis más relevante: Circuito hipocampal en el proceso de integración neuronal. *Revista Científica Ciencia Medica*, 23(2), 221-230. doi: 10.51581/rccm.v23i2.254.

- 21) Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M. A., & Severi, C. (2015). The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of gastroenterology*, 28(2), 203–209.
- 22) Chen, X., D'Souza, R., & Hong, S. T. (2013). The role of gut microbiota in the gut-brain axis: current challenges and perspectives. *Protein & cell*, 4(6), 403–414. doi: 10.1007/s13238-013-3017-x.
- 23) Celorrio, M., Abellanas, M. A., Rhodes, J., Goodwin, V., Moritz, J., Vadivelu, S., Wang, L., Rodgers, R., Xiao, S., Anabayan, I., Payne, C., Perry, A. M., Baldrige, M. T., Aymeritch, M. S., Steed, A. & Friess, S. H. (2021). Gut microbial dysbiosis after traumatic brain injury modulates the immune response and impairs neurogenesis. *Acta Neuropathologica Communications*, 9(1). doi: 10.1186/s40478-021-01137-2.
- 24) Celorrio, M., Friess, S. H. (2022). Gut-brain axis in traumatic brain injury: impact on neuroinflammation. *Neural Regen Res* 17(5):1007-1008.
- 25) Centers for Disease Control and Prevention. (2015). *Traumatic Brain Injury in the United States: Epidemiology and Rehabilitation*. U.S.: Department of Health and Human Services. Recuperado de: www.cdc.gov/injury.
- 26) Cerdó, T., Diéguez, E., & Campoy, C. (2020). Impact of gut microbiota on neurogenesis and neurological diseases during infancy. *Current Opinion in Pharmacology*, 50, 33–37. doi: 10.1016/j.coph.2019.11.006.
- 27) Chang, E. F., Claus, C. P., Vreman, H. J., Wong, R. J. & Noble-Haeusslein, L. J. (2005). Heme regulation in traumatic brain injury: relevance to the adult and developing brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:1401–1417. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600147.

- 28) Chiu, C.-C., Liao, Y.-E., Yang, L.-Y., Wang, J.-Y., Tweedie, D., Karnati, H. K., Greig, N. H. & Wang, J.-Y. (2016). Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Methods*, 272, 38–49. doi: 10.1016/j.jneumeth.2016.06.018.
- 29) Codella, R., Luzi, L., & Terruzzi, I. (2018). Exercise has the guts: How physical activity may positively modulate gut microbiota in chronic and immune-based diseases. *Digestive and Liver Disease*, 50(4), 331–341. doi: 10.1016/j.dld.2017.11.016.
- 30) Cole, J. T., Yarnell, A., Kean, W. S., Gold, E., Lewis, B., Ren, M., McMullen, D. C., Jacobowitz, D. M., Pollard, H. B., O'Neill, J. T., Grunberg, N. E., Dalgard, C. L., Frank, J. A., & Watson, W. D. (2011). Craniotomy: true sham for traumatic brain injury, or a sham of a sham? *Journal of neurotrauma*, 28(3), 359–369. doi: 10.1089/neu.2010.1427.
- 31) Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(10), 701–712. doi:10.1038/nrn3346.
- 32) Dalile, B., Van Oudenhove, L., Vervliet, B., & Verbeke, K. (2019). The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 16(8), 461–478. doi: 10.1038/s41575-019-0157-3.
- 33) Davis, B. T., 4th, Chen, Z., Islam, M. B. A. R., Timken, M. E., Procissi, D., & Schwulst, S. J. (2022). Fecal Microbiota Transfer Attenuates Gut Dysbiosis and Functional Deficits After Traumatic Brain Injury. *Shock (Augusta, Ga.)*, 57(6), 251–259. doi: 10.1097/SHK.0000000000001934.
- 34) Davis, J. A., Collier, F., Mohebbi, M., Pasco, J. A., Shivappa, N., Hébert, J. R., ... Loughman, A. (2021). The associations of butyrate-producing bacteria of the gut microbiome with diet quality and muscle health. *Gut Microbiome*, 2, e2. doi:10.1017/gmb.2021.2.
- 35) de la Tremblaye, P. B., Bondi, C. O., Lajud, N., Cheng, J. P., Radabaugh, H. L., & Kline, A. E. (2017). Galantamine and Environmental Enrichment Enhance Cognitive Recovery after

Experimental Traumatic Brain Injury But Do Not Confer Additional Benefits When Combined. *Journal of Neurotrauma*, 34(8), 1610–1622. doi: 10.1089/neu.2016.4790.

- 36) de la Tremblaye, P. B., Cheng, J. P., Bondi, C. O. & Kline, A. E. (2018). Environmental enrichment, alone or in combination with various pharmacotherapies, confers marked benefits after traumatic brain injury. *Neuropharmacology*, (), S0028390818300984–. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.02.032.
- 37) de Witt, B. W., Ehrenberg, K. M., McAloon, R. L., Panos, A. H., Shaw, K. E., Raghavan, P. V., Skidmore, E. R., et al. (2011). Abbreviated environmental enrichment enhances neurobehavioral recovery comparably to continuous exposure after traumatic brain injury. *Neurorehabilitation and Neural Repair* 25, 343–350. doi: 10.1177/1545968310390520.
- 38) Diamond, M. C., Johnson R. E., Ingham C. A. (1975). Morphological changes in the young, adult and aging rat cerebral cortex, hippocampus, and diencephalon. 14(2), 163–174. doi: 10.1016/s0091-6773(75)90161-3.
- 39) Diaz-Chávez, A., Lajud, N., Roque, A., Cheng, J. P., Meléndez-Herrera, E., Valdéz-Alarcón, J. J., Bondi, C. O. & Kline, A. E. (2020). Early life stress increases vulnerability to the sequelae of pediatric mild traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, 113318. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113318.
- 40) Dill, L. K., Teymornejad, S., Sharma, R., Bozkurt, S., Christensen, J., Chu, E., Rewell, S. S., Shad, A., Mychasiuk, R., & Semple, B. D. (2023). Modulating chronic outcomes after pediatric traumatic brain injury: Distinct effects of social and environmental enrichment. *Experimental neurology*, 364, 114407. doi: 10.1016/j.expneurol.2023.114407.
- 41) Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2013). Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression? *Neurogastroenterology & Motility*, 25(9), 713–719. doi: 10.1111/nmo.12198.

- 42) Diz-Chaves, Y., Astiz, M., Bellini, M.J. & Garcia-Segura, L.M. (2012). Prenatal stress increases the expression of proinflammatory cytokines and exacerbates the inflammatory response to LPS in the hippocampal formation of adult male mice. *Brain Behav. Immun.* 28, 196–206. doi: 10.1016/j.bbi.2012.11.013.
- 43) El-Demerdash, N., Pan, T., Choi, O., Saraswati, M., Koehler, R. C., Robertson, C. L., & Savonenko, A. (2023). Importance of Control Groups for Evaluating Long-Term Behavioral and Cognitive Outcomes of Controlled Cortical Impact in Immature Rats. *Journal of neurotrauma*, 40(11-12), 1197–1215. doi: 10.1089/neu.2021.0376.
- 44) Finnie, J. (2012). Comparative approach to understanding traumatic injury in the immature, postnatal brain of domestic animals. *Australian Veterinary Journal*, 90(8), 301–307. doi: 10.1111/j.1751-0813.2012.00955.x.
- 45) Finnie J. W. (2014). Pathology of traumatic brain injury. *Veterinary research communications*, 38(4), 297–305. doi: 10.1007/s11259-014-9616-z.
- 46) Folweiler, K. A., Bondi, C. O., Ogunsanya, E. A., LaPorte, M. J., Leary, J. B., Radabaugh, H. L., Monaco, C. M. & Kline, A. E. (2017). Combining the Antipsychotic Drug Haloperidol and Environmental Enrichment after Traumatic Brain Injury Is a Double-Edged Sword. *Journal of Neurotrauma*, 34(2), 451–458. doi:10.1089/neu.2016.4417.
- 47) Foster, Jane A.; McVey Neufeld, Karen-Anne (2013). Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in Neurosciences*, 36(5), 305–312. doi: 10.1016/j.tins.2013.01.005.
- 48) Fraunberger, E. A. (2020). Mitochondria, Inflammation, and T-Cell Metabolism in a Rat Model of Pediatric Mild Traumatic Brain Injury (Unpublished doctoral thesis). University of Calgary, Calgary, AB. doi:10.11575/PRISM/38045.

- 49) Fujita, Y., & Yamashita, T. (2021). Neuroprotective function of microglia in the developing brain. *Neuronal signaling*, 5(1), NS20200024. doi: 10.1042/NS20200024.
- 50) Fujimoto, S. T., Longhi, L., Saatman, K. E., & McIntosh, T. K. (2004). Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(4), 365–378. doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.06.002.
- 51) Fuller, A. K., Bice, B. D., Venancio, A. R., Crowley, O. M., Staab, A. M., Georges, S. J., Hidalgo, J. R., Warncke, A. V. & Angus-Hill, M. L. (2018). A Method to Define the Effects of Environmental Enrichment on Colon Microbiome Biodiversity in a Mouse Colon Tumor Model. *Journal of Visualized Experiments*, (132). doi:10.3791/57182.
- 52) Gawel, K., Gibula, E., Marszalek-Grabska, M., Filarowska, J., & Kotlinska, J. H. (2018). Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents—methodological consideration. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. doi: 10.1007/s00210-018-1589-y.
- 53) Goldberg, D. W., Adeodato, A., Almeida, D. T. de, Corrêa, L. G., & Wanderlinde, J. (2010). Green turtle head trauma with intracerebral hemorrhage: image diagnosis and treatment. *Ciência Rural*, 40(11), 2402–2405. doi: 10.1590/s0103-84782010001100026.
- 54) Gómez-Eguílaz, M., Ramón-Trapero, J. L., Pérez-Martínez, L. & Blanco, J. R. (2019). El eje microbiota-intestino-cerebro y sus grandes proyecciones. *Rev Neurol.*, 68 (03):111-117. doi: 10.33588/rn.6803.201822.
- 55) Hamel, Renee N. & Smoliga, James M. (2019). Physical Activity Intolerance and Cardiorespiratory Dysfunction in Patients with Moderate-to-Severe Traumatic Brain Injury. *Sports Medicine*. doi: 10.1007/s40279-019-01122-9.

- 56) Harry, G. J. (2010). Microglia: Neuroprotective and Neurodestructive Properties en Harry, G. J. & Tilson, H. A. (Ed.), *Neurotoxicology* (3rd. ed., Vol. 28, pp. 175–202). Informa Healthcare USA, Inc. doi: 10.3109/9781420054880.
- 57) Hoare, Ben. (2009). *Animal migration: remarkable journeys in the wild* (). Marshall Editions. ISBN: 987-0-520-2582-3-5.
- 58) Hoffman, A. N., Malena, R. R., Westergom, B. P., Luthra, P., Cheng, J. P., Aslam, H. A., Zafonte, R. D., et al. (2008). Environmental enrichment-mediated functional improvement after experimental traumatic brain injury is contingent on task-specific neurobehavioral experience. *Neurosci. Lett.* 431, 226–230. doi: 10.1016/j.neulet.2007.11.042.
- 59) Iebba, V., Totino, V., Gagliardi, A., Santangelo, F., Cacciotti, F., Trancassini, M., Mancini, C., Cicerone, C., Corazziari, E., Pantanella, F., & Schippa, S. (2016). Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *The new microbiologica*, 39(1), 1–12. PMID: 26922981.
- 60) Izquierdo, I., Furini, C. R. G., & Myskiw, J. C. (2016). Fear Memory. *Physiological Reviews*, 96(2), 695–750. doi: 10.1152/physrev.00018.2015.
- 61) Jiang, H., Ling, Z., Zhang, Y., Mao, H., Ma, Z., Yin, Y., Wang, W., Tang, W., Tan, Z., Shi, J., Li, L. & Ruan, B. (2015). Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 48, 186–194. doi: 10.1016/j.bbi.2015.03.016.
- 62) Jing, Y., Yu, Y., Bai, F., Wang, L., Yang, D., Zhang, C., Qin, C., Yang, M., Zhang, D., Zhu, Y., Li, J. & Chen, Z. (2021). Effect of fecal microbiota transplantation on neurological restoration in a spinal cord injury mouse model: involvement of brain-gut axis. doi: 10.21203/rs.3.rs-20108/v1.
- 63) Kato H., Asiminos G. & Toh H. (2009). Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Bioinformatics For DNA Sequence Analysis*. pp. 39–64. doi: 10.1007/978-1-59745-251-9_3 PMID: 19378139.

- 64) Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M., Siegelbaum S.A., Hudspeth A.J., & Mack S(Eds.), (2014). Principles of Neural Science, Fifth Edition. McGraw Hill. <https://neurology.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1049§ionid=59138139>.
- 65) Kelly, J. R., Keane, V. O', Cryan, J. F., Clarke, G. & Dinan, T. G. (2019). Mood and Microbes. *Gastroenterology Clinics of North America*, (), S0889855319300329-. doi: 10.1016/j.gtc.2019.04.006.
- 66) Kivisaari, S. L., Probst, A., & Taylor, K. I. (2013). The Perirhinal, Entorhinal, and Parahippocampal Cortices and Hippocampus: An Overview of Functional Anatomy and Protocol for Their Segmentation in MR Images. *fMRI*, 239–267. doi:10.1007/978-3-642-34342-1_19.
- 67) Kline, A. E., Wagner, A. K., Westergom, B. P., Malena, R. R., Zafonte, R. D., Olsen, A. S., Sozda, C. N., et al. (2007). Acute treatment with the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH DPAT and chronic environmental enrichment confer neurobehavioral benefit after experimental brain trauma. *Behavioural Brain Research* 177, 186–194. doi: 10.1016/j.bbr.2006.11.036.
- 68) Kline, A.E., Olsen, A.S., Sozda, C.N., Hoffman, A.N., and Cheng, J.P. (2012). Evaluation of a combined treatment paradigm consisting of environmental enrichment and the 5-HT_{1A} receptor agonist buspirone after experimental traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 29, 1960-1969. doi: 10.1089/neu.2012.2385.
- 69) Kochanek, P. M., Marion, D. W., Zhang, W., Schiding, J. K., White, M., Palmer, A. M., Robert, S. B., O'Malley, Mark E., Styren, Scot D., Ho, Chien & DeKosky, Steven T. (1995). Severe Controlled Cortical Impact in Rats: Assessment of Cerebral Edema, Blood Flow, and Contusion Volume. *Journal of Neurotrauma*, 12(6), 1015–1025. doi: 10.1089/neu.1995.12.1015.
- 70) Kozich, James J., Sarah L. Westcott, Nielson T. Baxter, Sarah K. Highlander, and Patrick D. Schloss. (2013). Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for

Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Applied and Environmental Microbiology*, June, AEM.01043–13. doi: 10.1128/AEM.01043-13.

- 71) Kreutzer, J. S., DeLuca, J., & Caplan, B. (Eds.). (2011). *Encyclopedia of Clinical Neuropsychology*. doi: 10.1007/978-0-387-79948-3.
- 72) Kumar, A., & Loane, D. J. (2012). Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain, behavior, and immunity*, 26(8), 1191–1201. doi: 10.1016/j.bbi.2012.06.008.
- 73) Lafontaine, M. P., Knoth, I. S., & Lippé, S. (2020). Learning abilities. *Neurocognitive Development: Normative Development*, 241–254. doi: 10.1016/b978-0-444-64150-2.00021-6.
- 74) Lagier, J.-C., Million, M., Hugon, P., Armougom, F., & Raoult, D. (2012). Human Gut Microbiota: Repertoire and Variations. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2. doi: 10.3389/fcimb.2012.00136.
- 75) Lajud, N., Díaz-Chávez, A., Radabaugh, H., Cheng, J. P., Rojo-Soto, G., Valdéz-Alarcón, J., Bondi, C. O. & Kline, A. E. (2019). Delayed and abbreviated environmental enrichment after brain trauma promotes motor and cognitive recovery that is not contingent on increased neurogenesis. *Journal of Neurotrauma*. doi: 10.1089/neu.2018.5866.
- 76) Lajud, N., Roque, A., Cheng, J. P., Bondi, C. O., & Kline, A. E. (2021). Early life stress preceding mild pediatric traumatic brain injury increases neuroinflammation but does not exacerbate impairment of cognitive flexibility during adolescence. *Journal of Neurotrauma*. doi: 10.1089/neu.2020.7354.
- 77) Lanza, M., Campolo, M., Casili, G., Filippone, A., Paterniti, I., Cuzzocrea, S., Esposito, Emanuela (2018). Sodium Butyrate Exerts Neuroprotective Effects in Spinal Cord Injury. *Molecular Neurobiology*, (), -. doi: 10.1007/s12035-018-1347-7.

- 78) Leker, R. R., Shohami, E., & Constantini, S. (2002). Experimental models of head trauma. *Acta neurochirurgica. Supplement*, 83, 49–54. doi: 10.1007/978-3-7091-6743-4_9.
- 79) Loane, D. J., & Kumar, A. (2016). Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Experimental neurology*, 275 Pt 3(0 3), 316–327. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.08.018.
- 80) Lohmann, K. J., Lohmann, C. M. F., & Endres, C. S. (2008). The sensory ecology of ocean navigation. *Journal of Experimental Biology*, 211(11), 1719–1728. doi: 10.1242/jeb.015792.
- 81) Louis, P., Young, P., Holtrop, G., & Flint, H. J. (2010). Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environmental microbiology*, 12(2), 304–314. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02066.x.
- 82) Lyeth, B.G., Jenkins, L.W., Hamm, R.J., Dixon, C.E., Phillips, L.L., Clifton, G.L., Young, H.F., and Hayes R.L. (1990). Prolonged memory impairment in the absence of hippocampal cell death following traumatic brain injury in the rat. *Brain Res.* 526, 249-258. doi: 10.1016/0006-8993(90)91229-a.
- 83) Matenchuk, B. A., Mandhane, P. J., & Kozyrskyj, A. L. (2020). Sleep, Circadian Rhythm, and Gut Microbiota. *Sleep Medicine Reviews*, 101340. doi: 10.1016/j.smrv.2020.101340.
- 84) Matharu, D., Dhotre, D., Balasubramanian, N., Pawar, N., Sagarkar, S., & Sakharkar, A. (2019). Repeated mild traumatic brain injury affects microbial diversity in rat jejunum. *Journal of Biosciences*, 44(5). doi: 10.1007/s12038-019-9940-0.
- 85) Matter, A. M., Folweiler, K. A., Curatolo, L. M., & Kline, A. E. (2011). Temporal Effects of Environmental Enrichment–Mediated Functional Improvement After Experimental Traumatic Brain Injury in Rats. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 25(6), 558–564. doi: 10.1177/1545968310397206.

- 86) McKenzie, V. J., Song, S. J., Delsuc, F., Prest, T. L., Oliverio, A. M., Korpita, T. M., Alexiev, A., Amato, K. R., Metcalf, J. L., Kowalewski, M., Avenant, N. L., Link, A., Di Fiore, A., Seguin-Orlando, A., Feh, C., Orlando, L., Mendelson, J. R., Sanders, J. & Knight, R. (2017). The Effects of Captivity on the Mammalian Gut Microbiome. *Integrative and Comparative Biology*, 57(4), 690–704. doi: 10.1093/icb/icx090.
- 87) McMurdie, P. J., Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 8(4): e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217.
- 88) Melfi, V. A., Dorey, N. R., & Ward, S. J. (Eds.). (2019). *Zoo Animal Learning and Training*. doi: 10.1002/9781118968543.
- 89) Minchew, H. M., Radabaugh, H. L., LaPorte, M. L., Free, K. E., Cheng, J. P., & Bondi, C. O. (2021). A combined therapeutic regimen of citalopram and environmental enrichment ameliorates attentional set-shifting performance after brain trauma. *European journal of pharmacology*, 904, 174174. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174174.
- 90) Monaco, C. M., Gebhardt, K. M., Chlebowski, S. M., Shaw, K. E., Cheng, J. P., Henchir, J. J., Zupa, M. F. & Kline, A. E. (2014). A Combined Therapeutic Regimen of Buspirone and Environmental Enrichment Is More Efficacious than Either Alone in Enhancing Spatial Learning in Brain-Injured Pediatric Rats. *Journal of Neurotrauma*, 31(23), 1934–1941. doi: 10.1089/neu.2014.3541.
- 91) Morais, L. H., Schreiber, H. L. & Mazmanian, S. K. (2020). The gut microbiota-brain axis in behaviour and brain disorders. *Nature Reviews Microbiology*. doi:10.1038/s41579-020-00460-0.
- 92) Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 11(1), 47-60. doi: 10.1016/0165-0270(84)90007-4.

- 93) Moschonas, E. H., Leary, J. B., Memarzadeh, K., Bou-Abboud, C. E., Folweiler, K. A., Monaco, C. M., Cheng, J. P., Kline, A. E. & Bondi, C. O. (2020). Disruption of basal forebrain cholinergic neurons after traumatic brain injury does not compromise environmental enrichment-mediated cognitive benefits. *Brain Research*, 147175. doi: 10.1016/j.brainres.2020.147175.
- 94) Mychasiuk, R., Hehar, H., Farran, A. & Esser, M. J. (2014). Mean girls: Sex differences in the effects of mild traumatic brain injury on the social dynamics of juvenile rat play behaviour. *Behavioural Brain Research*, 259(), 284–291. doi: 10.1016/j.bbr.2013.10.048.
- 95) Nicholson, S. E., Watts, L. T., Burmeister, D. M., Merrill, D., Scroggins, S., Zou, Y., Lai, Z., Grandhi, R., Lewis, A. M., Newton, L. M., Eastridge, B. J. & Schwacha, M. G. (2018). Moderate Traumatic Brain Injury Alters the Gastrointestinal Microbiome in a Time-Dependent Manner. *SHOCK*, 1. doi: 10.1097/shk.0000000000001211.
- 96) Ng, Si Yun; Lee, Alan Yiu Wah. (2019). Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(), 528–. doi:10.3389/fncel.2019.00528.
- 97) Nolfi, Stefano & Floreano, Dario. (1999). *Learning and Evolution*. 7(1), 89–113. doi:10.1023/a:1008973931182.
- 98) Oess, T., Krichmar, J.L., & Röhrbein, F. (2017) A Computational Model for Spatial Navigation Based on Reference Frames in the Hippocampus, Retrosplenial Cortex, and Posterior Parietal Cortex. *Front. Neurobot.*, 11, 4.
- 99) Ouellet, M. C., Beaulieu-Bonneau, S. & Morin, C. M. (2015). Sleep-wake disturbances after traumatic brain injury. *The Lancet. Neurology*, 14(7), 746–757. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00068-X

- 100) O'Sullivan, O., Cronin, O., Clarke, S. F., Murphy, E. F., Molloy, M. G., Shanahan, F. & Cotter, P. D. (2015) Exercise and the microbiota, *Gut Microbes*, 6:2, 131-136. doi: 10.1080/19490976.2015.1011875.
- 101) Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6048), 1456–1458. doi: 10.1126/science.1202529.
- 102) Penn, P., R.; Rose, F., D., & Johnson, D., A. (2009). Virtual enriched environments in pediatric neuropsychological rehabilitation following traumatic brain injury: Feasibility, benefits and challenges. *Developmental Neurorehabilitation*, 12(1), 32–43. doi: 10.1080/17518420902739365.
- 103) Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PloS one*, 5(3), e9490. doi: org/10.1371/journal.pone.0009490.
- 104) Prieto, R., Gutiérrez-González, R., Pascual, J. M., Roda, J. M., Cerdán, S., Matias-Guiu, J. & Barcia, J. A. (2009). Modelos experimentales de traumatismo craneoencefálico. *Neurocirugía, Sociedad Española de Neurocirugía*; 2009;20:225–44.
- 105) Radabaugh, H. L., Carlson, L. J., O'Neil, D. A., LaPorte, M. J., Monaco, C. M., Cheng, J. P., de la Tremblaye, P. B., Lajud, N., Bondi, C. O. & Kline, Anthony, E. (2016). Abbreviated environmental enrichment confers neurobehavioral, cognitive, and histological benefits in brain-injured female rats. *Experimental Neurology* 286 61–68. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.09.015.
- 106) Redell, John B.; Moore, Anthony N.; Dash, Pramod K. (2003). Expression of the Prodynorphin Gene after Experimental Brain Injury and Its Role in Behavioral Dysfunction. *Experimental Biology and Medicine*, 228(3), 261–269. doi:10.1177/153537020322800304.

- 107) Rice, M. W., Pandya, J. D., & Shear, D. A. (2019). Gut Microbiota as a Therapeutic Target to Ameliorate the Biochemical, Neuroanatomical, and Behavioral Effects of Traumatic Brain Injuries. *Frontiers in Neurology*, 10. doi:10.3389/fneur.2019.00875.
- 108) Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G., Gasbarrini, A., Mele, M. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, 7(1), 14–. doi: 10.3390/microorganisms7010014.
- 109) Roe, W.D., Mayhew, I.G., Jolly, R.D., Marshall, J. & Chilvers, B.L. (2014). Traumatic brain injury, axonal injury and shaking in New Zealand sea lion pups. *The Veterinary Journal*, 200(1), 96–102. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.01.025.
- 110) Ruiz-González, R., Lajud, N., Tejeda-Martínez, A. R., Flores-Soto, M. E., Valdez-Alarcón, J. J., Tellez, L. A., & Roque, A. (2022). Antibiotic-induced microbiota depletion in normally-reared adult rats mimics the neuroendocrine effects of early life stress. *Brain research*, 1793, 148055. doi: 10.1016/j.brainres.2022.148055.
- 111) Saladrigas-García, M., D'Angelo, M., Ko, H.L. et al. Early socialization and environmental enrichment of lactating piglets affects the caecal microbiota and metabolomic response after weaning. *Sci Rep* 11, 6113 (2021). doi: 10.1038/s41598-021-85460-7.
- 112) Salinas-García, A. F., Roque, A., Zamudio-Flores, J. J., Meléndez-Herrera, E., Kline, A. E., & Lajud, N. (2023). Early life stress negatively impacts spatial learning acquisition and increases hippocampal CA1 microglial activation after a mild traumatic brain injury in adult male rats. *Journal of neurotrauma*, 10.1089/neu.2023.0452. Advance online publication. doi: 10.1089/neu.2023.0452.

- 113) Sempere, L., Rodríguez-Rodríguez, A., Boyero, L., & Egea-Guerrero, J. J. (2018). Principales modelos experimentales de traumatismo craneoencefálico: de la preclínica a los modelos in vitro. *Medicina Intensiva*. doi: 10.1016/j.medin.2018.04.012.
- 114) Semple, B. D., Carlson, J., & Noble-Haeusslein, L. J. (2016). Pediatric Rodent Models of Traumatic Brain Injury. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1462, 325–343. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3816-2_18.
- 115) Silvers, J. M., Tokunaga, S., Berry, R. B., White, A. M., Matthews, D. B. (2003). Impairments in spatial learning and memory: ethanol, allopregnanolone, and the hippocampus. *Brain Research Reviews* 43, 275– 284. doi:10.1016/j.brainresrev.2003.09.002.
- 116) Simon, D. W., McGeachy, M. J., Bayir, H., Clark, R. S., Loane, D. J., & Kochanek, P. M. (2017). The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nature reviews. Neurology*, 13(3), 171–191. doi: 10.1038/nrneurol.2017.13.
- 117) Solari, N., & Hangya, B. (2018). Cholinergic modulation of spatial learning, memory and navigation. *European Journal of Neuroscience*. doi:10.1111/ejn.14089.
- 118) Sozda, Christopher, Hoffman, Ann, Olsen, Adam, Cheng, Jeffrey, Zafonte, Ross & Kline, Anthony. (2010). Empirical Comparison of Typical and Atypical Environmental Enrichment Paradigms on Functional and Histological Outcome after Experimental Traumatic Brain Injury. *Journal of neurotrauma*. 27. 1047-57. doi: 10.1089/neu.2010.1313.
- 119) Stilling, R. M., Bordenstein, S. R., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Friends with social benefits: host-microbe interactions as a driver of brain evolution and development? *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 147. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00147>.
- 120) Stilling, R. M., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2013). Microbial genes, brain & behaviour - epigenetic regulation of the gut-brain axis. *Genes, Brain and Behavior*, 13(1), 69–86. doi:10.1111/gbb.12109.

- 121) Tengeler, A. C., Dam, S. A., Wiesmann, M., Naaijen, J., van Bodegom, M., Belzer, C., Dederen, P. J., Verweij, V., Franke, B., Kozicz, T., Arias-Vázquez, A. & Kiliaan, A. J. (2020). Gut microbiota from persons with attention-deficit/hyperactivity disorder affects the brain in mice. *Microbiome*, 8(1). doi:10.1186/s40168-020-00816-x.
- 122) Tolman, E.C. (1948) Cognitive maps in rats and men. *Psychol. Rev.*, 55, 189-208.
- 123) Toni, N., & Schinder, A. F. (2015). Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(1), a018903. doi:10.1101/cshperspect.a018903.
- 124) Treangen, T. J., Wagner, J., Burns, M. P., & Villapol, S. (2018). Traumatic Brain Injury in Mice Induces Acute Bacterial Dysbiosis Within the Fecal Microbiome. *Frontiers in Immunology*, 9. doi:10.3389/fimmu.2018.02757.
- 125) Tweedie, D., Rachmany, L., Rubovitch, V., Zhang, Y., Becker, K. G., Perez, E., Hoffer, B. J., Pick, C. G. & Greig, N. H. (2013). Changes in mouse cognition and hippocampal gene expression observed in a mild physical- and blast-traumatic brain injury. *Neurobiol. Dis.* 54, 1–11. doi: 10.1016/j.nbd.2013.02.006.
- 126) Urban, R. J., Pyles, R., Stewart, C., Ajami, N., Randolph, K., Durham, W. J., Danesi, C. P., Dillon, E. L., Summons, J. R., Singh, Charan K; Morrison, Melissa; Kreber, Lisa A; Masel, Brent E.; Miller, Aaron; Wright, Traver J; Sheffield-Moore, Melinda (2019). Altered Fecal Microbiome Years After Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, neu.2019.6688–. doi:10.1089/neu.2019.6688.
- 127) Usui, N., Matsuzaki, H., & Shimada, S. (2021). Characterization of Early Life Stress-Affected Gut Microbiota. *Brain Sciences*, 11(7), 913. doi:10.3390/brainsci11070913.
- 128) Wang, H.-X., & Wang, Y.-P. (2016). Gut Microbiota-brain Axis. *Chinese Medical Journal*, 129(19), 2373. doi:10.4103/0366-6999.190667.

- 129) Wen, C., van Dixhoorn, I., Schokker, D., Woelders, H., Stockhofe-Zurwieden, N., Rebel, J., & Smidt, H. (2021). Environmentally enriched housing conditions affect pig welfare, immune system and gut microbiota in early life. *Animal microbiome*, 3(1), 52. doi: 10.1186/s42523-021-00115-2.
- 130) Willis, E. F., MacDonald, K. P. A., Nguyen, Q. H., Garrido, A. L., Gillespie, E. R., Harley, S. B. R., Bartlett, P. F., Schroder, W. A., Yates, A. G., Anthony, D. C., Rose-John, S., Ruitenber, M. J., & Vukovic, J. (2020). Repopulating Microglia Promote Brain Repair in an IL-6-Dependent Manner. *Cell*, 180(5), 833–846.e16. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.013.
- 131) Wilson, A. S., Koller, K. R., Ramaboli, M. C., Nesengani, L. T., Ocvirk, S., Chen, C., Flanagan, C. A., Sapp, F. R., Merritt, Z. T., Bhatti, F., Thomas, T. K. & O’Keefe, S. J. D. (2020). Diet and the Human Gut Microbiome: An International Review. *Digestive Diseases and Sciences*. doi:10.1007/s10620-020-06112-w.
- 132) Witter, M. P., Wouterlood, F. G., Naber, P. A., & Van Haeften, T. (2006). Anatomical Organization of the Parahippocampal-Hippocampal Network. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 911(1), 1–24. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06716.x.
- 133) Xiong, Y., Mahmood, A., & Chopp, M. (2013). Animal models of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(2), 128–142. doi:10.1038/nrn3407.
- 134) Zamudio, Flores, J. J. (2022). El enriquecimiento ambiental como terapia de rehabilitación después de una lesión cerebral traumática en ratas pediátricas [Tesis de licenciatura no publicada]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- 135) Zhu, C., Grandhi, R., Patterson, T., & Nicholson, S. (2018). A Review of Traumatic Brain Injury and the Gut Microbiome: Insights into Novel Mechanisms of Secondary Brain Injury and Promising Targets for Neuroprotection. *Brain Sciences*, 8(6), 113. doi:10.3390/brainsci8060113.