

**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN NEUROCIENCIA**

**EFECTO DEL CONSUMO DE *Lactobacillus rhamnosus* GG SOBRE
TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN HIPOCAMPO DE RATA**

ASTRID MUÑOZ PÉREZ DE ARCE

**Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia**

Director de Tesis:

Prof. Dr. Marco Fuenzalida

Co-director de Tesis:

Prof. Dr. Javier Bravo

2 0 2 0

La realización de este trabajo fue posible gracias a FONDECYT 1171007 del PhD Marco Fuenzalida de la Universidad de Valparaíso, FONDECYT 1190729 del PhD Javier Bravo de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso y PMI 1402 Iniciativas Estudiantiles 2018 de Astrid Muñoz Pérez de Arce de Universidad de Valparaíso.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN -----	iv
ABSTRACT -----	v
ABREVIATURAS -----	vi
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Eje microbiota-intestino-cerebro (MIC), probióticos y psicobióticos-----	8
1.2 Eje MIC y transmisión sináptica-----	11
2. PRESENTACIÓN PROBLEMA -----	15
3. HIPÓTESIS -----	16
4. OBJETIVOS	
4.1 Objetivo general-----	17
4.2 Objetivo específico-----	17
5. DISEÑO EXPERIMENTAL -----	18
6. METODOLOGÍA -----	19
7. RESULTADOS	
7.1 Efecto del tratamiento en el peso de animales y consumo de agua-----	23
7.2 Propiedades eléctricas de la membrana y excitabilidad de neuronas piramidales de CA1 de HPCv-----	23
7.3 Transmisión post-sináptica inhibitoria en neuronas piramidales de CA1 de HPCv de animales tratados con LGG y sucralosa-----	28
7.4 Corrientes evocadas post-sináptica inhibitoria en neuronas piramidales de CA1 de HPCv de animales tratados con LGG y sucralosa-----	30
7.5 Corrientes post-sináptica excitatorias en neuronas piramidales de CA1 de HPCv de animales tratados con LGG y sucralosa-----	31
7.6 Potenciales de campo post-sinápticos excitatorio(fEPSP) de grupo de neuronas de CA1 de HPCv de animales tratados con LGG y sucralosa-----	33
8. DISCUSIÓN -----	35
9. CONCLUSIÓN -----	44
10. BIBLIOGRAFÍA -----	45

RESUMEN

En la última década han surgido evidencias experimentales y clínicas que demuestran que la microbiota intestinal influye en el funcionamiento del cerebro. Varios estudios han revelado que la modificación de la microbiota tiene efectos en el funcionamiento neuronal y comportamiento de animales. Los psicobióticos surgen como concepto tras las diversas evidencias de que determinadas cepas de probióticos entregan beneficios en la salud mental de quien los consume.

Actualmente, existen pocos estudios que apunten a esclarecer que las modificaciones moleculares observadas en distintas regiones del cerebro, producto de un cambio en la composición de la microbiota, conducen a cambios funcionales en la transmisión sináptica del sistema nervioso central. El presente trabajo se enfocó en estudiar el efecto del consumo de una cepa de *Lactobacillus* sobre la transmisión inhibitoria y excitatoria en el hipocampo ventral de ratas Sprague-Dawley. La administración de la bacteria se realizó en conjunto con sucralosa como vehículo para el probiótico. Estudios recientes han evidenciado que el consumo de sucralosa, un edulcorante artificial no-calórico, tiene efectos en el sistema nervioso central. Usando herramientas electrofisiológicas, este trabajo muestra que el consumo de LGG junto con sucralosa reduce la transmisión sináptica inhibitoria, mientras que la sucralosa por si sola modifica el potencial de membrana en reposo de las neuronas piramidales de CA1 de hipocampo ventral. Los resultados obtenidos no permiten esclarecer el efecto del consumo de LGG sobre la transmisión sináptica dado el efecto pantalla de sucralosa, sin embargo, las evidencias expuestas son las primeras en demostrar que la sucralosa modifica los circuitos sinápticos, lo que indica que puede modificar funciones del cerebro.

ABSTRACT

In the last decades experimental and clinical evidence showing that intestinal microbiome affects brain function. Several studies revealed microbiota modification has strong effects on neuronal function and animal behavior. Psychobiotics arise as a functional concept after evidence showing that different strains of probiotics have beneficial effects on mental health. Currently, are a few studies clarify if molecular alterations observed in different parts of the brain by a modification of microbiota, drive to changes in synaptic transmission in the brain. The present work was focused in studying the effects of consumption of Lactobacillus strain on inhibitory and excitatory transmission in ventral hippocampus of Sprague-Dawley rats. Bacterial administration was performed with sucralose as a vehicle. Recently it has been proposed that sucralose, an artificial non caloric- sweetener, modifies the intestinal microbiome. Using electrophysiological tools we showed LGG along with sucralose consumption reduces inhibitory synaptic transmission, while sucralose by itself modifies resting membrane potential of CA1 pyramidal neurons in ventral hippocampus. Results can't show the effects of LGG consumption by itself, but the evidence shows at first time that the consumption of sucralose modify the functioning of synaptic circuits, which indicates the consumption of this non-caloric sweetener can modify brain function.

ABREVIATURAS

5-HT	: Serotonina	MI	: Microbiota intestinal
ACh	: Acetilcolina	MIC	: Eje microbiota-intestino-cerebro
AGCC	: Ácido graso de cadena corta	mISPC	: Corriente mini post-sináptica inhibitoria
DA	: Dopamina	NE	: Norepinefrina
ENC	: Edulcorante artificial no calórico	NTS	: Núcleo del tracto solitario
EPSC	: Corriente post-sináptica excitatoria	OMS	: Organización Mundial de la Salud
eEPSC	: Corriente evocada post-sináptica excitatoria	PA	: Potencial de acción
eIPSC	: Corriente evocada post-sináptica inhibitoria	PND	: Día post-natal
ePSC	: Corriente evocada post-sináptica	PP	: Pulsos pareados
fEPSP	: Potenciales de campo post-sináptico excitatorios	PPD	: Depresión por pulsos pareados
GABA	: Ácido gama aminobutírico	PPR	: Razón pulsos pareados
GI	: Gastrointestinal	Pr	: Probabilidad de liberación
HPA	: Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal	sEPSC	: Corriente espontánea post-sináptica excitatoria
HPC	: Hipocampo	sIPSC	: Corriente espontánea post-sináptica inhibitoria
HPCv	: Hipocampo ventral	SNA	: Sistema nervioso autónomo
IPSC	: Corriente post-sináptica inhibitoria	SNC	: Sistema nervioso central
LCA	: Líquido cerebroespinal artificial	SNE	: Sistema nervioso entérico
LGG	: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	TTX	: Tetrodotoxina
LTP	: Potenciación a largo plazo	UFC	: Unidad formadora de colonias

INTRODUCCIÓN

Los mamíferos establecen una relación simbiótica con una gran diversidad de microorganismos que viven dentro y fuera de ellos. Dichos microorganismos (bacterias, hongos, fagos y arqueas) son conocidos como el microbioma y gracias al Proyecto Microbioma Humano (PMH) se ha establecido que existe 1,3 bacterias por cada célula del cuerpo (Turnbaugh P *et al.*, 2007; Gilbert JA *et al.*, 2018).

Se ha determinado que en el tracto gastrointestinal (GI) habitan 10^{14} microorganismos, existiendo más de 1000 especies entre las cuales se encuentran *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, *Streptococco*, *Eubacteria*, *Clostridia*, *Coliforme*, *Staphilococco*, *Pseudomona*, *Lactobacillus*, etc. (Turnbaugh P *et al.*, 2007; Gilbert JA *et al.*, 2018; Dieterich W, Schink M & Zopf Y, 2018). La microbiota intestinal (MI) es un ecosistema que posee fluctuaciones en su crecimiento y conservación y se ve influenciado por elementos externos e internos del hospedero, tales como: la ubicación geográfica, dieta, estrés (fisiológico, ejercicio, metabólico, patologías), fármacos y etapas de la vida (Cresci GA, 2015; Lynch SV & Pedersen O, 2016; Gilbert JA *et al.*, 2018). La interacción directa de la MI con el hospedero es en el tracto GI a través de la barrera intestinal, la que incluye la capa de mucus, la barrera epitelial del intestino y células inmunosensibles y, a través de dicha interacción, los microorganismos bacterianos se comunican con el sistema nervioso mediante distintas vías (Carabotti M *et al.*, 2015; Dieterich W *et al.*, 2018).

1.1. Eje microbiota-intestino-cerebro, probióticos y psicobióticos

El eje microbiota-intestino-cerebro (MIC) establece una comunicación bidireccional entre MI y el Sistema Nervioso Central (SNC) por medio de múltiples vías, las que incluyen el sistema nervioso autónomo (SNA) a través del nervio vago (Forsythe P, Bienestock J, Kunze WA, 2014; Bonaz B, Bazin T & Pellissier S, 2018), el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) como vía endocrina (Sudo N, 2014; Farzi A, Fröhlich EE & Holzer P, 2018) y, finalmente, mediante la activación de células inmunes que liberan citoquinas y $\text{TNF-}\alpha$, las que son activadas por los compuestos bioactivos producidos por el metabolismo microbiano (figura 1) (Aidy SE, Dinan TG & Cryan FJ, 2014; Cryan FJ, *et al.* 2019; Parker A, Fonseca S & Carding SR, 2020).

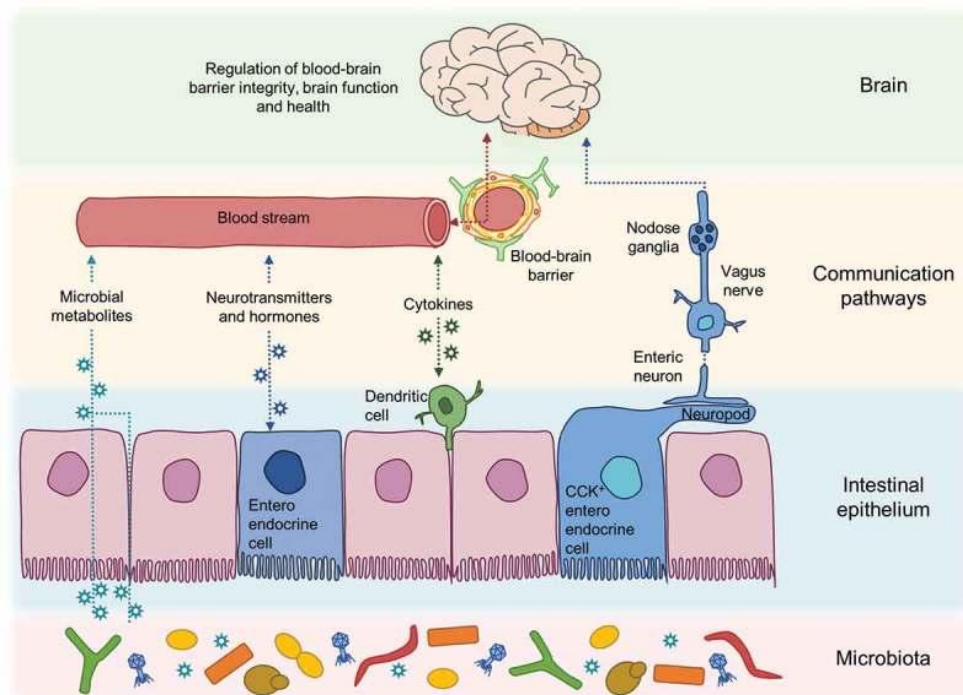


Figura 1. Vías de comunicación entre microbiota-intestino-cerebro. Los metabolitos neuroactivos, ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y componentes del sistema inmune pasan a la circulación sistémica llegando al cerebro, mientras que por otro, a través del nervio vago se establece una comunicación directa con el sistema nervioso entérico (SNE) que puede ser modulada por neurotransmisores y moléculas bioactivas. Finalmente las células enteroendocrinas de la barrera intestinal secretan neuropéptidos que ejercen su acción a través del nervio vago o directamente en cerebro. Tomada Parker A *et al.*, 2020.

Las distintas cepas bacterianas que colonizan el tracto GI, producen compuestos neuroactivos a través de su metabolismo, las que son capaces de activar la vía neuronal y endocrina para establecer comunicación con el SNC (Lyte M, 2013; Strandwitz P, 2018). Por un lado, la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) influencia la liberación de serotonina desde las células que componen la mucosa mientras que, por otro lado, la síntesis de neurotransmisores como serotonina, norepinefrina, dopamina, acetilcolina, histamina y ácido γ -aminobutírico (GABA) son secretados al interior del lumen intestinal y modulan la señalización del sistema nervioso entérico (SNE) o actúan directamente en los axones aferentes primarios (Wall R *et al.*, 2014; Strandwitz P, 2018).

Cerebro e intestino (incluyendo microbiota) se regulan mutuamente, por lo que, no es raro que alteraciones en la composición de la microbiota (disbiosis) esté asociado a enfermedades neurológicas (Cryan JF *et al.*, 2020). En una extensa revisión realizada por Cryan JF y colaboradores describieron, entre otras cosas, el impacto de MIC sobre conductas sociales y cognitivas, miedo, estrés, ingesta de alimentos y algunas enfermedades neuropsiquiátricas (figura 2) (Cryan FJ *et al.*, 2019).

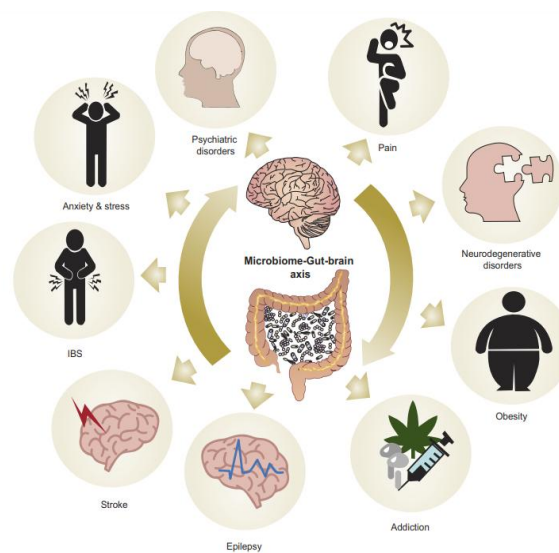


Figura 2. Ilustración de la variedad de enfermedades y procesos patológicos en los que la microbiota intestinal está implicada. Los ejemplos incluyen desordenes neuropsiquiátricos, enfermedades neurodegenerativas, dolor, estrés, síndrome de colon irritable, accidente cerebrovascular, adicción y

La mayoría de estos estudios se han realizado eliminando la MI a través de la generación de modelos axénicos o, modificándola por medio la administración de patógenos y/o antibióticos, además de modelos murinos de estrés y ansiedad (Cryan JF & Dinan TG, 2012). En la misma línea, se ha estudiado el efecto que tiene el consumo de prebióticos y probióticos sobre la patogénesis de enfermedades neuronales (Liu X, Cao S & Zhang X, 2015; Kim N *et al.*, 2018).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió los probióticos como aquellos microorganismos vivos que consumidos en dosis adecuadas genera cambios positivos en el hospedero (Organización Mundial de la Salud, 2001). Estos han sido ampliamente utilizados por su potencial terapéutico, tanto para afecciones intestinales como para normalizar alteraciones en la permeabilidad y homeostasis intestinal (Sanders ME *et al.*, 2019). En los últimos años Dinan y colaboradores acuñaron el término psicobiótico, los cuales tienen una definición similar a la de la OMS, pero los beneficios que obtiene quien los consume es a nivel de la salud mental de pacientes con enfermedades mentales (Dinan TG, Stanton C & Cryan JF, 2013). Entre los psicobióticos más utilizados se encuentran: *Bifidobacterium* (eg, *B. longum*, *B. breve*, y *B. infantis*) y *Lactobacillus* (eg, *L. helveticus*, y *L. rhamnosus*) (Wang H, Lee IS, Braun C, Enck P, 2016; Cheng KH *et al.*, 2019), los cuales en distintos estudios y modelos murinos han mostrado efectos ansiolíticos (Bravo JA *et al.*, 2011; Messaoudi Met *al.*, 2011; Savignac HM *et al.*, 2014; Wang T *et al.*, 2015; Liu YW *et al.*, 2016), antidepresivos (Desbonnet L *et al.*, 2010; Bravo JA *et al.*, 2011; Savignac HM *et al.*, 2014), mejora en la respuesta frente a estrés y en la memoria (Gareau MG *et al.*, 2011; Davari S *et al.*, 2013; Wang T *et al.*, 2015).

1.2. Eje MIC y transmisión sináptica

La transmisión sináptica química, es un proceso de comunicación entre neuronas que involucra la participación de moléculas señalizadoras denominadas neurotransmisores, los que son liberados desde la neurona pre-sináptica cuando un potencial de acción invade el terminal del axón y, posteriormente, activan receptores en las dendritas de las neuronas post-sinápticas, transmitiendo la información (Purves D *et al*, 2011).

Tabla 1. Estudios asociativos del efecto de probióticos sobre conductas y cambios en la concentración de neurotransmisores y expresión de receptores en SNC en modelos animales.

Resultados				
Modelo Animal	Probiótico	Conducta	SNC	Autores
Ratón	<i>L. plantarum</i> PS128	↓ Ansiedad	↑5-HT y ↑ DA (CPF)	Liu YW <i>et al.</i> , 2016
Ratón (axénico)	<i>L. plantarum</i> PS128	↓ Ansiedad	↑5-HT y ↑ DA (CS)	Liu WH <i>et al.</i> , 2016
Rata (ECR)	<i>L. helveticus</i> NS8	↓ Ansiedad; ↓ Depresión; ↑ Memoria no-espacial	↑5-HT (HPC); ↑ NE (HPC)	Liang S <i>et al.</i> , 2015
Rata (tratamiento ampicilina)	<i>L. fermentum</i> N93	↓ Ansiedad; ↑ Memoria espacial	↑ receptor NMDA (cerebro)	Wang T <i>et al.</i> , 2015
Rata (hiperamemia)	<i>L. helveticus</i> NS8	↓ Ansiedad; ↑ Memoria espacial	↓5-HT (HPC, cerebelo)	Luo J <i>et al.</i> , 2014
Ratón	<i>L. rhamnosus</i> JB-1	↓ Ansiedad; ↓ Depresión	↓ receptor GABA _{B1b} (ABL, LC, GD, CA3, CA1); ↓ receptor GABA _{α2} (CG1, PrL, IL, ABL, CeA); ↑ receptor GABA _{α2} (GD)	Bravo JA <i>et al.</i> , 2011
Ratón (modelo autismo)	<i>L. plantarum</i> MTCC9510	↑ Aprendizaje; ↑ Memoria	♂: ↑ receptor GABA _{α2} , GABA _{B1} (HPC); ↑ receptor GABA _{α1} ; GABA _{α2} , GABA _{B1} (CPF) ♀: ↑ receptor GABA _{α1} ; GABA _{α2} , GABA _{B1} (HPC); ↑ receptor GABA _{α1} ; GABA _{α2} (CPF)	Tobouy L <i>et al.</i> , 2018
Rata (disbiosis)	<i>L. rhamnosus</i> + <i>B. longum</i>	↓ Depresión	↑ receptor GABA _γ y receptor GABA _{Aα5} (HPC)	Liang L <i>et al.</i> , 2017
Rata	<i>L. casei</i> 54-2-33	↑ Ansiedad	↓ receptor 5-HT _{1A} (HPC)	Barrera-Bugueño <i>et al.</i> , 2017

ABL: amígdala basolateral; CeA: amígdala central; CPF: corteza prefrontal; CS: cuerpo estriado; GD: giro dentado; ECR: estrés crónico por restricción; HPC: hipocampo; IL: infralímbico; LC: locus coeruleus; PrL: prelímbico.

Algunos estudios han relacionado los cambios conductuales producto de la modificación de la MI, con la concentración de neurotransmisores en el cerebro, principalmente serotonina (5-HT) y dopamina (DA) en hipocampo y corteza prefrontal, entre otras áreas, además de cambios en la expresión de receptores de GABA y NMNDA (tabla 1) (Luo J *et al.*, 2014; Liang S *et al.*, 2015; Liu WH *et al.*, 2016; Liu YW *et al.*, 2016; Barrera-Bugueño *et al.*, 2017).

La transmisión sináptica en el SNC recibe señales tanto excitatorias como inhibitorias y el correcto balance entre ellas es fundamental para la correcta transmisión. Distintos estudios han demostrado que modificaciones en la microbiota intestinal genera cambios en la expresión de receptores de glutamato en las sinapsis excitatorias y receptores de GABA para las sinapsis inhibitorias. Por un lado, Wang T y colaboradores, demostraron que la expresión de receptores de NMDA se reestablece en animales tratados con ampicilina luego de la administración de un probiótico (Wang T *et al.*, 2015). Por otro lado, en el trabajo realizado por Liang L y colaboradores, observaron una disminución de receptores GABA-A α_5 y γ en hipocampo de ratas adultas con disbiosis temprana, los que incrementaron luego de la administración de una mezcla de *L. rhamnosus* y *B. Longum* (Liang L *et al.*, 2017). Adicionalmente, en un modelo genético de autismo al que se le dio *L. reuteri* la expresión de receptores GABA α_2 y GABA B_1 incrementaron en comparación al control (Tobouy L *et al.*, 2018), sin embargo, un estudio previo en animales sanos determinaron que el tratamiento con *L. rhamnosus JB-1* disminuye la expresión del receptor GABA B y GABA $A\alpha_1$ en las distintas regiones de hipocampo dorsal de ratón, las que se coinciden con el efecto antidepresivo y ansiolítico observado las pruebas conductuales (Bravo *et al.*, 2011).

En cuanto a la actividad neuronal, son pocos estudios que la han evaluado tras la administración de probiótico. Takada M y colaboradores observaron un incremento de neuronas positivas para c-Fos en el núcleo del tracto solitario (NTS), marcador de actividad neuronal, luego de 90 minutos tras administrar una única dosis de *L. casei* Shirota (Takada M *et al.*, 2016). Adicionalmente, en otros modelos murinos (ratones inmunodeficiente, ratas infectadas con *C. rodentium*, y ratas modelos de síndrome de intestino irritable) a los que se les administró *L. rhamnosus*, observaron, a través de inmunohistoquímica, un incremento en la expresión proteica de c-Fos en hipocampo (Gareu MJ *et al.*, 2011; Smith CJ *et al.*, 2014; Emge JR *et al.*, 2016), evidenciando que el consumo de probiótico modifica la actividad neuronal en el SNC.

Las sinapsis tienen la capacidad de cambiar la eficacia en la transmisión y con ello la fuerza con que se conectan, lo que sería consecuencia de cambios en la actividad pre o post-sináptica (Purves D *et al.*, 2011). En el 2013, Davarai S y colaboradores estudiaron el efecto del consumo de una mezcla de probióticos en animales diabéticos sobre transmisión sináptica en hipocampo a través de un protocolo de potenciación a largo plazo (LTP). Los resultados de este estudio revelan que la administración de probióticos reestablece el LTP de las ratas diabéticas (Davari S *et al.*, 2013). Otro estudio en el 2014 evaluó de igual forma el efecto de la administración de VLS#3® (una mezcla de probióticos con ocho cepas de bacterias distintas: cuatro de *Lactobacillus*, tres de *Bifidobacterias* y una de *Streptococcus*) en LTP *in vivo* de animales viejos, observando que los valores obtenidos se asemejan a los de las ratas jóvenes (Distrutti E *et al.*, 2014).

Los antecedentes expuestos demuestran que efectivamente la modificación de la microbiota intestinal produce cambios importantes en el SNC, modificando concentración de neurotransmisores, expresión de receptores y es capaz de reestablecer la potenciación a

largo plazo en modelos específicos, sin embargo, a pesar de ello, actualmente no existe evidencia directa de que la administración de *Lactobacillus* en animales sanos pueda modificar la transmisión inhibitoria en el SNC.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La evidencia actual sugiere que cambios en la comunicación bidireccional de los componentes del eje MIC altera el funcionamiento del sistema digestivo, el estado anímico y bienestar general. Los psicobióticos, definidos como probióticos que entregan beneficios en la salud mental de quien los consume, influyen el funcionamiento del eje MIC, generando cambios emocionales, cognitivos y sistémico en el SNC.

Distintas investigaciones han demostrado que el tratamiento con probióticos modifica la concentración de neurotransmisores como serotonina y dopamina y expresión de receptores a GABA y NMDA, los que están involucrados en distintos tipos de conducta, por lo que, no resulta extraño que en distintos modelos murinos se haya observado una disminución de conductas del tipo ansioso y depresivo. El trabajo de Bravo y colaboradores estudiaron el efecto de *Lactobacillus* JB-1 en hipocampo, una estructura que tiene un rol importante en procesos de aprendizaje, adquisición y consolidación de la memoria, evidenciando que este probiótico puede modular el sistema GABAérgico en ratones al disminuir la expresión de receptores a GABA, sin embargo, a pesar de ello, actualmente existen pocas evidencias que dichas modificaciones conduzcan a cambios funcionales en las sinapsis y/o en la transmisión sináptica.

. .Dado que los circuitos excitadores están integrados en una poderosa red inhibitoria, que ejerce un fino control de la excitabilidad, el patrón de disparo y la eficacia sináptica de las neuronas piramidales, el presente trabajo se enfocó en estudiar si la administración de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) tiene efecto en la excitabilidad neuronal y transmisión inhibitoria en hipocampo de ratas machos Sprague-Dawley.

HIPÓTESIS

El consumo de *Lactobacillus rhamnosus GG* disminuye la transmisión sináptica inhibitoria e incrementa la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1 en hipocampo ventral de ratas adultas Sprague-Dawley.

OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos del consumo de *Lactobacillus rhamnosus GG* en la transmisión sináptica de hipocampo ventral de ratas adultas Sprague-Dawley.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si el consumo de LGG modifica las propiedades eléctricas de las neuronas piramidales de CA1 HPCv de ratas adultas Sprague-Dawley.
2. Evaluar las corrientes post-sinápticas inhibitorias y excitatorias espontáneas y evocadas tras el consumo de LGG en HPCv de ratas adultas Sprague-Dawley.

DISEÑO EXPERIMENTAL

El siguiente diseño experimental fue el que se llevó a cabo para el tratamiento de los animales y posteriores registros electrofisiológicos (figura 3) acorde a los objetivos planteados.

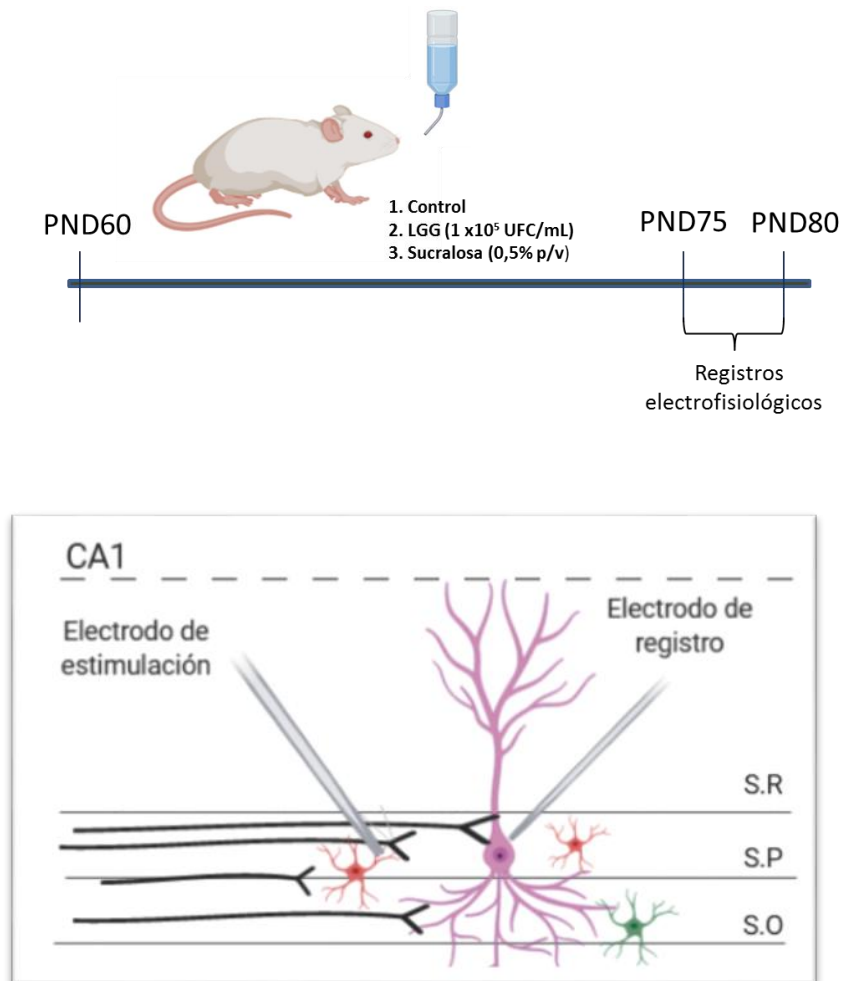


Figura 3. Diseño experimental. Ratas Spargue-Dawley fueron tratadas con LGG (10^5 UFC/mL) y sucralosa (0,5% p/v) como vehículo durante 18 ± 1 día, cambiando el tratamiento cada 2 días (superior). Esquema de la posición electros para registros electrofisiológicos situados en la capa piramidal de CA1 en hipocampo ventral (HPCv). Los registros en modalidad de célula completa se realizaron en el soma de las neuronas piramidales. Se utilizó tetrodoxina (TTX) para registros de mIPSC luego de registrar los sIPSC en LCA. Los electrodos para los registros de campo se posicionaron en la capa piramidal de CA1 (inferior).

METODOLOGÍA

Animales

Machos adultos Sprague-Dawley fueron obtenidos de bioterio de la Universidad de Valparaíso. Estos se mantuvieron en el bioterio del Laboratorio de Plasticidad Neuronal, Universidad de Valparaíso, desde el post-natal 50, hasta el día de los experimentos, a 21°C, con un ciclo de 12 horas luz/oscuridad, con alimento y agua *ad libitum*. Los animales se dividieron en 3 grupos: control, LGG y sucralosa (vehículo). Todos los experimentos se realizaron con la aprobación del Comité de Institucional de Bioética de la Universidad de Valparaíso.

*Cultivo *Lactobacillus rhamnusius* GG (LGG)*

La preparación del probióticos se realizó en el laboratorio de NeuroGastroBioquímica de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. La cepa *Lactobacillus rhamnusius* GG, obtenida anteriormente por donación del Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (2015), se enriqueció en medio Mann-Rgosa-Shape (MRS) aeróbicamente a 37°C, durante 24 horas en constante agitación (250 r.p.m). Para el tratamiento se obtuvo alícuotas de LGG, a partir del cultivo enriquecido luego de 6 horas de crecimiento, bajo las mismas condiciones anteriores, hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 1,2. Estudios previos del laboratorio indican que dicha OD corresponde a 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC). Estas fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización y no por más de 2 meses.

Tratamiento

El tratamiento fue administrado a través del agua de bebida con edulcorante comercial IANSA Cero K ® (maltitol, polidextrosa, dióxido de silicio y sucralosa 0,29%) 0,5% p/v (vehículo) o con LGG (10^5 UFC/mL app) + el edulcorante 0,5% p/v durante 18 ± 1 días, cambiando el agua de bebida día por medio (figura 3). Adicionalmente, al grupo control sólo se le administró agua durante el mismo periodo de tiempo. La ganancia de peso y volumen de agua de bebida consumida fue monitoreada durante el tratamiento. Todos los procedimientos se realizaron entre las 10:00 y 11:00 de la mañana.

Obtención de rebanadas de hipocampo

Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano y rápidamente decapitadas. El cerebro fue disectado en líquido cerebro-espinal (LCA), en mM: 124 sacarosa; 2,69 KCl; 1,25 KH_2PO_4 ; 10,0 MgSO_4 ; 26 NaHCO_3 ; 2,0 CaCl_2 ; 10,0 glucosa; ajustada a pH 7,40 a 4°C. Este se montó en vibratomo (Campden Instruments, model MA752) donde se emparejó el tejido desde posterior hacia anterior hasta encontrar la zona más ventral del hipocampo (bregma 6.3 mm) en medio LCA. Se recolectaron rebanadas coronales de ~ 350 μm las que se fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C) en LCA con flujo constante de carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2).

Registros electrofisiológicos

Las rebanadas fueron transferidas a una cámara de registro adaptada a una lupa (Euromex), con sistema de perfusión (~ 1 mL/minuto). Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo en mediante patch-clamp en la configuración célula completa (whole-cell) en los somas de las neuronas piramidales de CA1 de hipocampo ventral (HPCv), situando el

electro de estimulación entre *stratum pyramidale* (SP) y *stratum radiatum* (SR)(figura 3). Los experimentos de fijación de corriente (current-clamp) fueron realizados con una solución interna de metasulfonato de potasio (en mM: 134 KMeSO₄, 10 KCl, 10 HEPES, 5 NaCl, 2.5 ATP-Mg⁺², 0.3 GTP-Na⁺ a pH =7,3) y se registró potencial de membrana en reposo de la célula y adicionalmente se aplicaron dos protocolos: (i) RAMPA: un pulso de corriente continuo (de -100 pA a 500 pA) que despolariza la célula durante 500 ms para registrar los cambios de potencial de membrana en el tiempo (ii) curva intensidad/voltaje (I/V) en la que se aplicaron 10 pulsos de corriente de 50 pA, desde -100 pA a 350 pA en 250 ms y se registraron los potenciales post-sinápticos luego de cada pulso. Los experimentos de fijación de voltaje (voltage-clamp) se realizaron con una solución de gluconato de cesio (en mM: 100 Cs-Gluconato, 10 HEPES, 10 EGTA, Na₂-ATP₄, 10 TEA-Cl, 1 MgCl₂·6H₂O) para el registro de las corrientes post-sinápticas inhibitorias (IPSC), fijando el voltaje 0 mV y, metasulfonato de potasio para las corrientes post-sinápticas excitatorias (EPSC), fijando el voltaje a -65 mV. Para el estudio de la eficacia sináptica inhibitoria se registraron las IPSC espontáneas (sIPSC) dependiente e independientes de potencial de acción, y las IPSC evocadas (eIPSC). Las sIPSC minis (mIPSC) se realizaron en presencia de tetrodotoxina (TTX; 0,5 μM). El índice de multiplicidad se calculó a través de la ecuación planteada por Hsia A y colaboradores (Hsia A *et al.*, 1998). En el estudio de las eIPSC se aplicó protocolo de pulsos pareados (PP) que consiste en la aplicación de dos estímulos de igual intensidad separados por una ventana temporal determinada (30, 70, 100 y 300 ms). En cuanto a las sinapsis excitatorias, se registraron las EPSC espontaneas (sEPSC) y las EPSC evocadas (eEPSC) en las que se aplicó el mismo protocolo de PP mencionado anteriormente. Las neuronas parchadas que tuvieron un cambio de más del 20% en la resistencia del sello (> 1GΩ) durante el experimento fueron descartadas.

Los registros de potenciales de campo post-sinápticos excitatorios (fEPSP) se registraron una población de neuronas piramidales de CA1 de hipocampo ventral con un electrodo de registro llenado con LCA. Se estimularon las fibras de las colaterales de Schaffer provenientes de CA3. El electrodo de registro se utilizó con LCA y los fEPSP se obtuvieron a través del protocolo de PP realizado a distintos intervalos de tiempo (30, 70, 100 y 300 ms).

El electrodo de registro se encontraba conectado a amplificador EPC-7 (Heka Instruments). Todos los registros fueron filtrados a 3kHz, muestreados entre 4 y 10 kHz a través de un conversor análogo-digital (ITC-16 Intrutech) y almacenados por el software Pulse FIT (Heka Instruments).

Los registros fueron analizados, utilizando el software Clampfit 10.4.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Las diferencias entre grupos se midieron mediante ANOVA de una vía y de dos vías cuando corresponde, con post test de comparaciones múltiples. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad 5.

RESULTADOS

7.1 Efecto del tratamiento en el peso de animales y consumo de agua

Los *Lactobacillus* son un género de bacterias que producen ácido láctico, por lo que, son capaces de acidificar su entorno. Para que los animales se bebieran el agua con el probiótico, se les administró en conjunto con un edulcorante comercial que contiene 0,29% p/p de sucralosa, el cual no tiene aporte calórico. Durante el tratamiento los animales no tuvieron diferencias en la ganancia de peso ($F=0,443$; $p=0,645$ ANOVA-1 vía, post hoc Tukey), el consumo de agua ($F=0,984$; $p=0,384$ ANOVA-1 vía, post hoc Tukey) y, por tanto, en la sucralosa ingerida ($p=0,687$, t-student) (tabla 2).

Tabla 2. *Peso de animales y consumo de agua durante el tratamiento*

Grupo (n*)	Peso ratas al final del tratamiento (gr)	Consumo de agua (ml/día)	Consumo de sucralosa (mg/día)
Control (10)	452,5 ± 19,4	47,4 ± 2,8	-
LGG (12)	435,6 ± 13,6	51,1 ± 2,2	0,741 ± 0,032
Sucralosa (16)	428,5 ± 18,6	52,5 ± 2,5	0,760 ± 0,036

*n = número de camadas experimentales (2 ratas por camada)

7.2 Propiedades eléctricas de la membrana y excitabilidad de neuronas piramidales

CA1 de HPCv

La comunicación entre neuronas depende de su capacidad para responder a pequeños estímulos, produciendo variaciones rápidas en el potencial de membrana. La generación y mantención del potencial de membrana en reposo es importante para las células excitables y cambios en su excitabilidad pueden producir alteraciones en el funcionamiento de la célula. Los experimentos realizados indican que el potencial de

membrana de las neuronas piramidales de CA1 HPCv de aquellos animales que se les administró el edulcorante (sucralosa), presentan un potencial de membrana más despolarizado ($-59,5 \pm 1,3$ mV, $n= 5$) que los otro grupos ($-64,4 \pm 1,2$ mV control y $61,4 \pm 1,0$ mV LGG, $n=6$ c/u), teniendo $p < 0,05$ (ANOVA 1-vía, post hoc Tukey) contra el grupo control, mientras que contra LGG no presenta diferencia estadística ($p>0,05$) (tabla 3).

Las propiedades eléctricas de las neuronas determinan el curso temporal y amplitud de los potenciales sinápticos generados, por lo que, son importantes para la transmisión de las señales eléctricas. La fijación de corriente (current-clamp) permite registrar cambios en los potenciales de membrana (mV) mientras se inyecta un pulso de corriente a la célula a través del electrodo de registro. La relación entre intensidad de corriente inyectada permite calcular las propiedades eléctricas pasivas de las neuronas a partir de una curva intensidad de corriente -voltaje (I-V). En la figura 4A se observa un registro en el que cambia el potencial de membrana tras aplicar pulsos de corriente de distinta intensidad (de -100 pA a 350 pA). A través de la ley de Ohm, establece que la intensidad de corriente (I) que atraviesa un circuito es directamente proporcional al voltaje (V) e inversamente proporcional a la resistencia (R) que presenta, por tanto, a través de la pendiente de la curva I-V se calculó la resistencia de membrana (R_m) de las neuronas piramidales de CA1 HPCv, siendo $359,9 \pm 32,7$ M Ω para control $336,6 \pm 11,9$ M Ω para LGG y $490,8 \pm 97,1$ M Ω para sucralosa ($p=0,139$, ANOVA 1-vía; $n= 6$ control y LGG, $n=5$ sucralosa) (tabla 3). Adicionalmente, las neuronas se comportan como un circuito RC, donde el voltaje cambia exponencialmente en el tiempo, por ende, es posible establecer la constante de tiempo (τ) y la capacitancia de la membrana (C_m) de las neuronas piramidales de CA1 HPCv, los que no presentan diferencias significativas entre grupos ($p> 0,05$) (tabla 3).

Los experimentos I-V también permiten determinar la corriente mínima necesaria para disparar al menos un potencial de acción (reobase). Este parámetro no presenta diferencias entre los grupos, siendo $141,7 \pm 23,9$ pA para el control, $133,3 \pm 10,5$ pA para LGG y $110,0 \pm 18,7$ pA para sucralosa ($p > 0,05$ ANOVA 1-vía, $n= 6$ control y LGG, $n=5$ sucralosa) (tabla 3). Adicionalmente, tras aplicar un pulso de 300 pA es posible evaluar la frecuencia, amplitud y duración media de los potenciales de acción (PA). En cuanto a la frecuencia de disparo de los PA estos no presentan diferencias siendo $16,0 \pm 0,3$ Hz para el control, $13,0 \pm 0,7$ Hz para LGG y $16,8 \pm 1,4$ Hz para sucralosa ($p > 0,05$ ANOVA 1-vía, $n= 6$ control y LGG, $n=5$ sucralosa) (tabla 3). La amplitud de los PA ($78,9 \pm 3,6$ pA control, $74,8 \pm 4,9$ pA LGG y $82,3 \pm 8,3$ pA sucralosa) y la duración media de estos ($2,6 \pm 0,2$ ms control, $3,1 \pm 0,4$ ms LGG y $2,6 \pm 0,3$ ms sucralosa) no son diferentes entre los grupos ($p > 0,05$ ANOVA 1-vía, $n= 6$ control y LGG, $n=5$ sucralosa) (tabla 3).

Tabla 3. *Propiedades eléctricas de neuronas piramidales CA1 HPCv*

	Control (6)	LGG (6)	Sucralosa (5)
Potencial de membrana en reposo (mV)	$-64,4 \pm 1,2$	$-61,4 \pm 1,0$	$-59,6 \pm 1,3^*$
Rm (MΩ)	$359,9 \pm 32,7$	$336,6 \pm 11,9$	$490,8 \pm 97,1$
tau (ms)	$33,8 \pm 2,5$	$43,2 \pm 5,6$	$33,0 \pm 3,2$
Cm (pF)	$9,6 \pm 1,1$	$13,1 \pm 1,9$	$8,2 \pm 2,3$
Reobase (pA)	$141,7 \pm 23,9$	$133,3 \pm 10,5$	$110,0 \pm 18,7$
Umbral de disparo (mV)	$-44,1 \pm 3,9$	$-40,0 \pm 2,4$	$-42,5 \pm 2,5$
Frecuencia disparo PA (Hz)	$16,0 \pm 2,3$	$13,0 \pm 0,7$	$16,8 \pm 1,4$
Amplitud PA (mV)	$78,9 \pm 3,6$	$74,3 \pm 4,9$	$82,3 \pm 8,2$
Half-width PA (ms)	$2,6 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,3$

* $p < 0,05$ contra control. Anova-1 vía post hoc tukey.

Las curvas I-V (figura 4B) también dan cuenta de la excitabilidad de las neuronas dado que mide cambios en el potencial de membrana tras inyectar una corriente determinada. Con un test ANOVA 2-vías se determinó que el tratamiento no tiene efecto sobre dichas curvas ($F=0,29$; $p=0,756$).

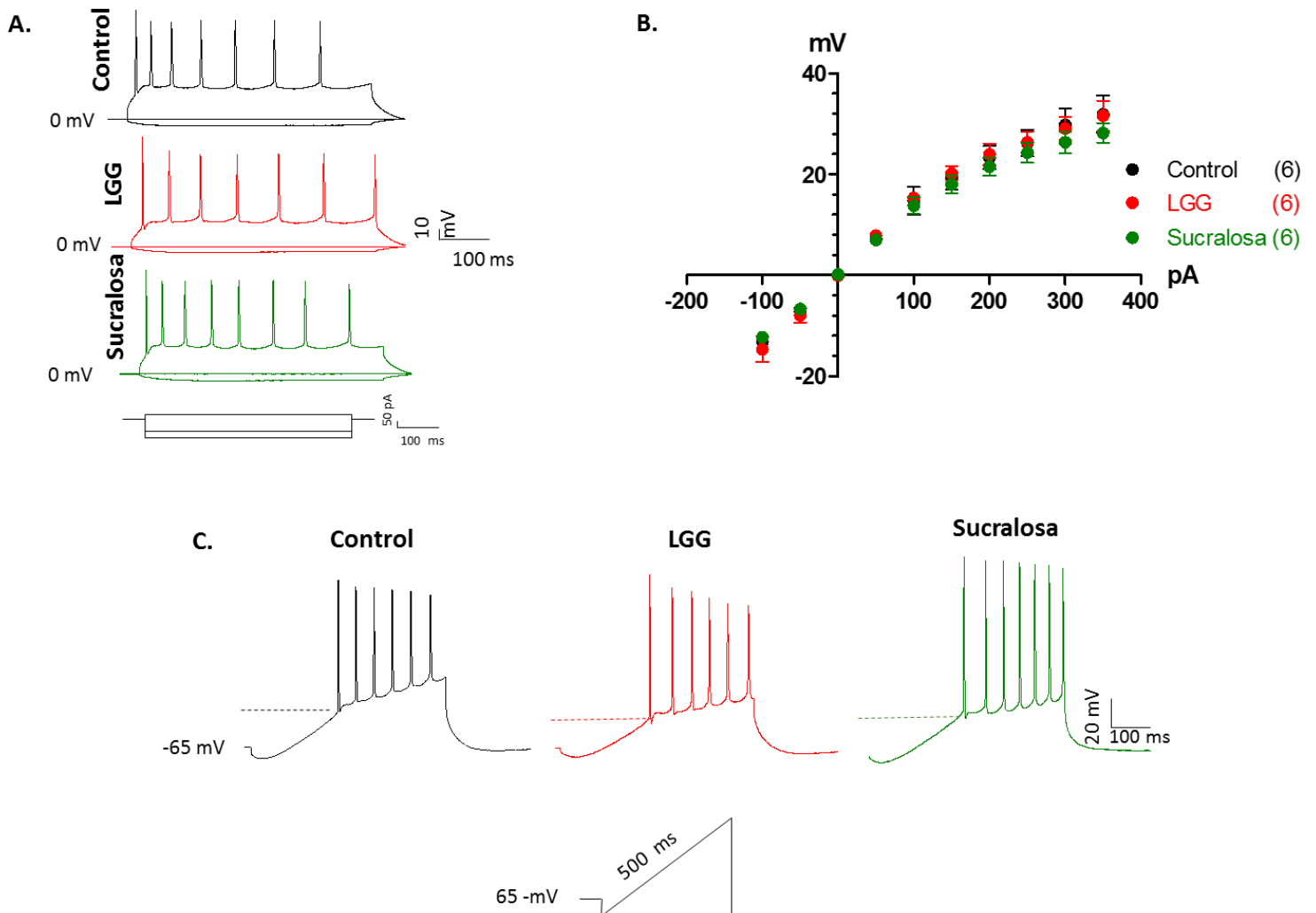


Figura 4. Efecto del consumo de LGG y sucralosa sobre las propiedades eléctricas de neuronas piramidales CA1 HPCv. (A) Trazos representativos de cambios en potencial de membrana (arriba) tras aplicar un pulso de corriente de 50 pA comenzando en -100 pA (abajo) durante 500 ms. (B) Curva IV en current-clamp. Las curvas no presentan diferencia significativa. (C) Trazos representativos de cambios en potencial de membrana (arriba) tras aplicar una corriente continua en incremento (abajo) durante 500 ms.

Adicionalmente, se registró cambios en los potenciales de membrana tras aplicar una corriente continua en aumento, con el objetivo de determinar el umbral de disparo de los PA de las neuronas piramidales de CA1 HPCv (figura 4C). El grupo control dispara el primer PA a -44.1 mV, el grupo LGG a -40 mV y finalmente, el grupo sucralosa a -42.5 mV ($p > 0,05$ ANOVA 1-vía). La tabla 3 resume todas las propiedades eléctricas.

Los resultados anteriores indican que el tratamiento con sucralosa tiene efecto sobre el potencial de membrana en reposo, sin afectar las propiedades eléctricas de las neuronas piramidales de CA1 de HPCv.

7.3 Transmisión post-sináptica inhibitoria en neuronas piramidales CA1 de HPCv de animales tratados con LGG y sucralosa.

Las corrientes post-sinápticas inhibitorias son generadas tras la liberación del neurotransmisor GABA desde la neurona pre-sináptica (neurona GABAérgica) y la posterior activación de receptores GABA en la neurona post-sináptica. Las corrientes espontáneas post-sinápticas (sPSC) son aquellas generadas sin estimulación externa y estas pueden ser dependientes del PA o independiente. La figura 5 muestra los efectos del consumo de LGG y sucralosa sobre las sIPSC y en las mIPSC, las cuales son independientes del potencial de acción. El consumo de LGG y sucralosa disminuye de manera significativa la frecuencia los eventos sIPSC, siendo de $3,75 \pm 0,44$ Hz para el grupo control, $2,28 \pm 0,20$ Hz para LGG y $2,20 \pm 0,34$ Hz para sucralosa, siendo estadísticamente diferente estos últimos respecto al control con $p < 0,05$ (figura 5B, arriba). En cuanto a la amplitud de sIPSC no son diferentes entre los grupos, siendo en promedio $34,16 \pm 4,44$ pA control, $34,71 \pm 4,07$ LGG y $30,65 \pm 5,27$ sucralosa (figura 5C, arriba). En cuanto a las corrientes independientes del potencial de acción, la frecuencia de los mIPSC también presenta diferencias entre grupo LGG ($0,45 \pm 0,05$ Hz) y sucralosa ($0,46 \pm 0,11$ Hz) respecto al control ($0,94 \pm 0,16$ Hz), con $p < 0,05$ (figura 5B, abajo). En cuanto a la amplitud de los mIPSC, LGG ($21,30 \pm 2,62$ pA) y sucralosa ($20,28 \pm 3,56$ pA) tienen una tendencia a ser más elevados que el grupo control ($15,04 \pm 0,48$ pA), sin embargo, no son estadísticamente diferentes (figura 5C, abajo). Cambios en la frecuencia de los sIPSC pueden ser producto de efectos pre-sinápticos relacionados con la liberación del neurotransmisor, sin embargo, al observar dichos cambios también en las mIPSC puede indicar cambios en la conectividad. Para evaluar ello se calculó el índice de multiplicidad,

que valúa los contactos sinápticos relacionando la amplitud y frecuencia de los eventos dependientes e independientes de potencial de acción registrados en la misma célula (Hsia *et al.*, 1998). El tratamiento con LGG ($2,05 \pm 0,49$) y el consumo adicional de sucralosa ($2,46 \pm 0,47$) no presenta diferencias respecto al grupo control ($1,99 \pm 0,29$) (figura 5D), por ende, los cambios en la frecuencia reflejan una disminución en el número de sinapsis y no cambios en la conectividad neuronal.

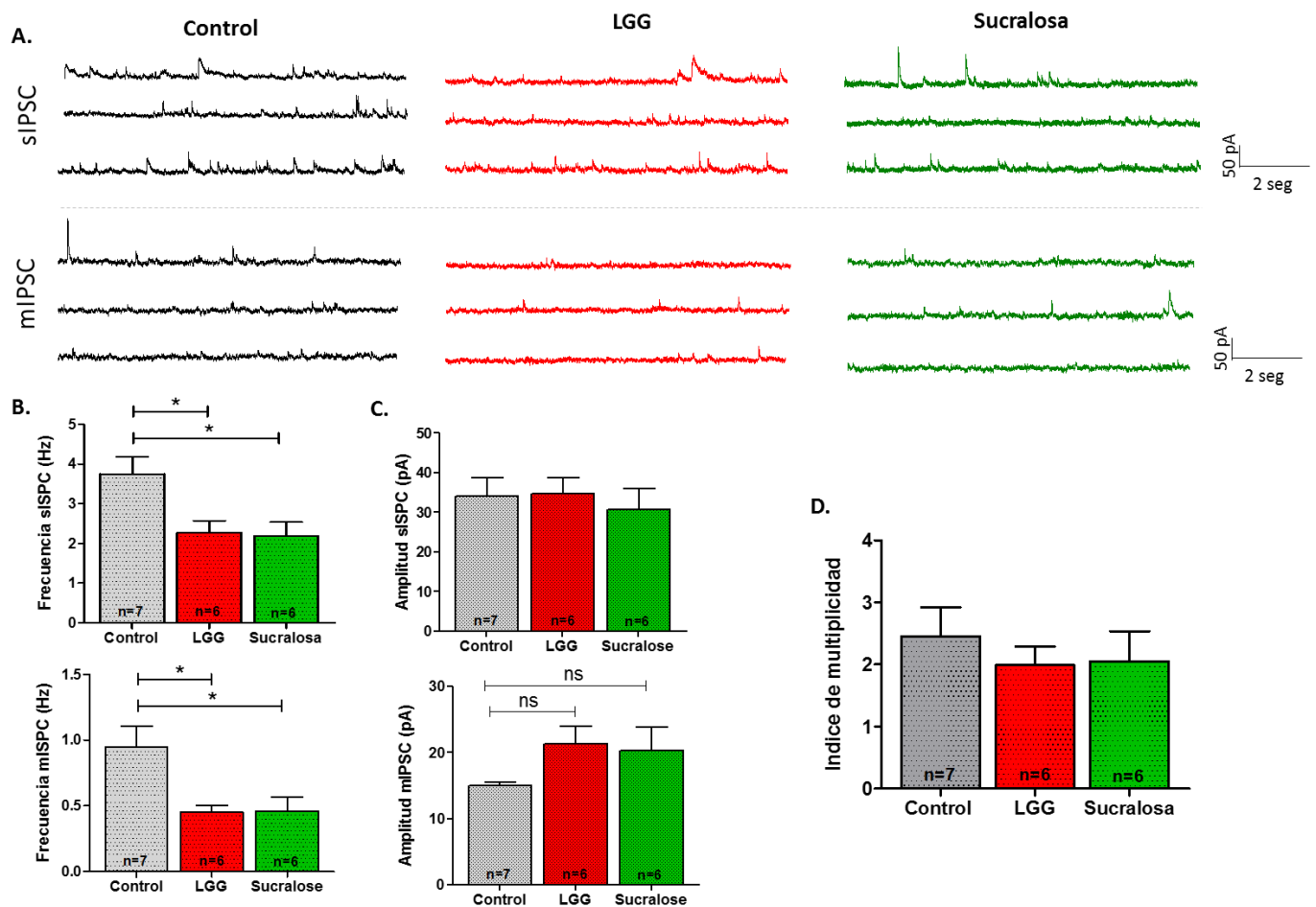


Figura 5. Efecto del consumo de LGG y sucralosa sobre la transmisión inhibitoria en HPCv. (A) Trazos representativos de sIPSC (arriba) y mIPSC (abajo). (B) Análisis cuantitativo de la frecuencia (Hz) de sIPSC y mIPSC y (C) amplitud (pA) de los eventos de sIPSC y mIPSC. * $p < 0,05$ ANOVA 1-vía, ns: no significativo (D) Contactos sinápticos fueron evaluados a través de índice de multiplicidad.

7.4 Corrientes evocadas post-sinápticas inhibitorias en neuronas piramidales CA1 de HPCv de animales tratados con LGG y sucralosa.

La llegada del PA a los terminales sinápticos a la neurona pre-sináptica incrementa la probabilidad de liberación (P_r) de neurotransmisor. Con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento sobre la P_r de las neuronas GABAérgicas sobre las neuronas piramidales de CA1 HPCv es que se evaluaron IPSC evocadas (eIPSC) a través un protocolo de pulsos pareados (descrito en metodología) en el que se calcula la razón entre la amplitud de la corriente del segundo pulso respecto al primero (PPR). La figura 6A superior muestra los trazos representativos de los registros obtenidos y en ellos se observa que el segundo pulso es menor que el primero (depresión por pulsos pareados, PPD) en todos los casos. En la parte inferior de la figura se observa que la PPR a distintos intervalos de tiempo de los distintos grupos. El análisis estadístico ANOVA de dos vías para la PPR indica que no hay diferencia entre las curvas de las distintas condiciones experimentales, por tanto, el tratamiento no tiene efecto sobre la razón de pulsos pareados en los distintos intervalos de estimulación, es decir sobre la P_r .

Con el objetivo de evaluar la excitabilidad de la neurona pre-sináptica, se registraron las corrientes inhibitorias post-sinápticas luego de aplicar estímulos de distintas intensidad (pA) para construir una curva entrada-salida. La figura 6B superior muestra los trazos representativos de las corrientes inhibitorias evocadas a los distintos estímulos aplicados, la figura 6B inferior muestra la gráfica obtenida a partir del análisis de dichos registros. El análisis estadístico ANOVA de dos vías indica que las que el consumo de LGG y sucralosa no tiene cambios en la amplitud de los IPSC a las distintas intensidades de estimulación ($F=1.14$, $p = 0.32$).

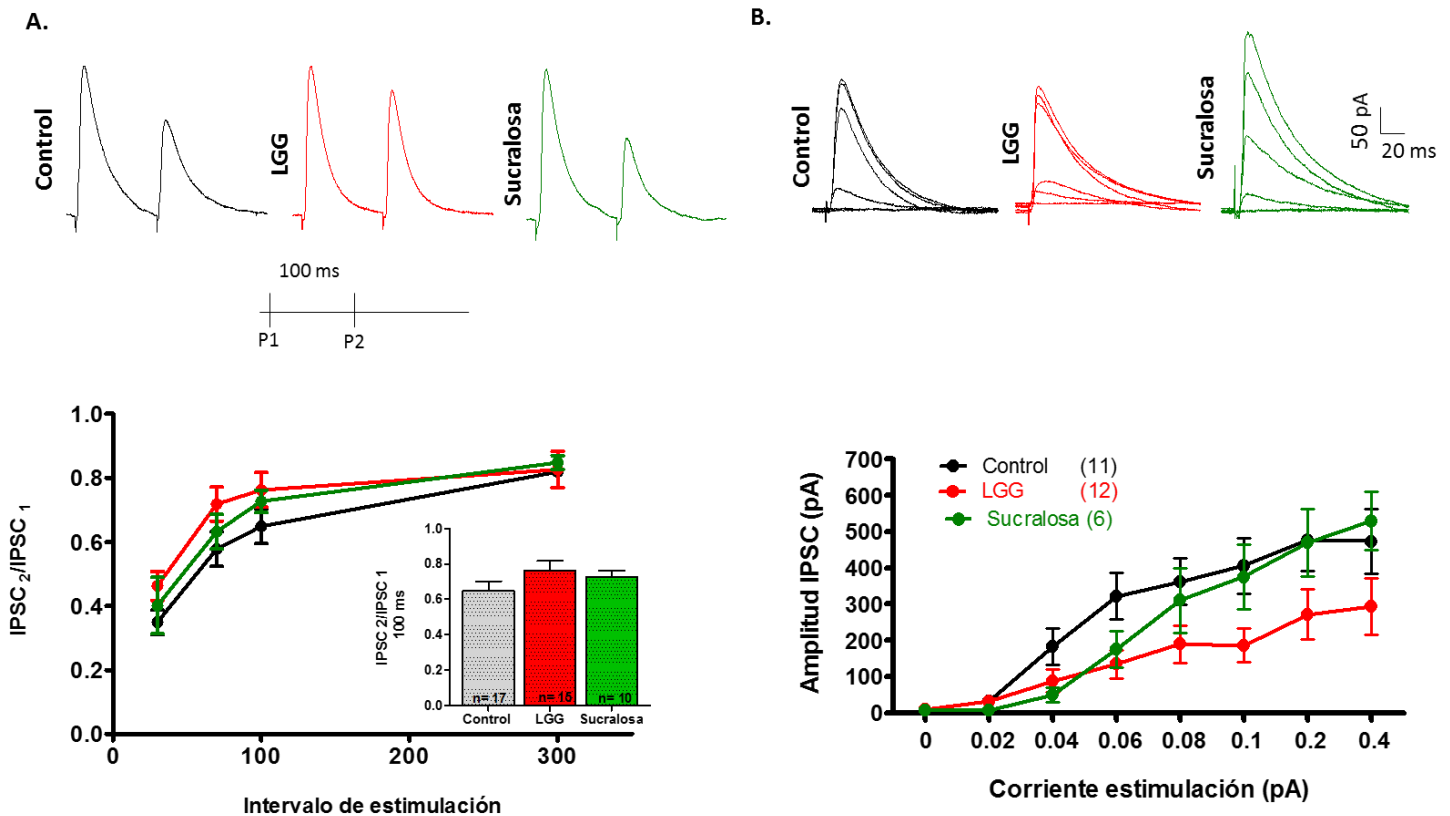


Figura 6. Efecto del consumo de LGG y sucralosa sobre corrientes inhibitorias post-sinápticas evocadas (eIPSC) (A) Trazos representativo de pulsos pareados (PP) en un intervalo de 100 ms en fijación de voltaje a 0 mV (arriba) y razón $IPSC_2/IPSC_1$ a 30, 70, 100 y 300 ms (gráfico de líneas) y, razón $IPSC_2/IPSC_1$ a 100 ms, siendo $0,65 \pm 0,05$ para el control, $0,76 \pm 0,05$ para LGG y $0,73 \pm 0,04$ para sucralosa (gráfico barra). (B) Trazos representativos de registros de entrada-salida en fijación de voltaje a 0 mV (arriba) y gráfico amplitud IPSC vs intensidad de corriente (abajo).

7.5 Corrientes post-sinápticas excitatorias en neuronas piramidales CA1 de HPCv de animales tratados con LGG y sucralosa.

El número de sinapsis excitatorias e inhibitorias en una neurona está altamente regulado y a nivel global es crucial para el correcto funcionamiento de un circuito neuronal. Los resultados presentados al momento indican que hay una disminución en el número de sinapsis inhibitorias, por ende, es importante evaluar qué efecto tiene sobre

sinapsis excitatorias en las mismas neuronas piramidales de CA1 HPCv, para ellos se registró a -65 mV las sEPSC (figura 7A) y eEPSC (figura 7C y 7D).

La cuantificación de la frecuencia de los eventos de sEPSC del grupo sucralosa presenta una tendencia al alza ($0,92 \pm 0,26$ Hz) respecto al control ($0,53 \pm 0,09$ Hz) y LGG ($0,50 \pm 0,11$ Hz), sin embargo, los datos carecen de fuerza estadística para ser diferentes ($p=0,168$ ANOVA 1-vía) producto del bajo número de experimentos. En cuanto a la cuantificación de la amplitud de los eventos de sEPSC estos no presentan diferencias, siendo $-15,3 \pm 2,4$ pA control, $12,9 \pm 0,7$ pA LGG y $-15,2 \pm 0,2$ para sucralosa ($p=0,447$, ANOVA 1-vía). Si bien no son resultados concluyentes, debido al bajo número de experimentos, no es de extrañar que incremente la frecuencia de las corrientes post-sinápticas excitatorias, debido a una alteración en la sinapsis GABAérgicas.

Para evaluar la probabilidad de liberación de las sinapsis excitatorias, se aplicó protocolo de PP. En la figura 7C (izquierda) se observa que la respuesta al primer pulso tiene una magnitud similar a la del segundo, obteniendo una PPR cercana a 1. En análisis estadístico de las curvas de PPR, en los distintos intervalos de tiempo, arroja que el tratamiento no tiene efecto sobre esta ($F= 0,87$; $p=0,53$ ANOVA 2-vías).

Adicionalmente, con el objetivo de evaluar la excitabilidad de la neurona pre-sináptica, se registró una curva entrada-salida para las eEPSC (figura 7D, derecha), en las que el consumo de LGG y sucralosa no tiene efecto sobre la amplitud de la EPSC a distintas intensidades de corriente de estimulación ($F=0,12$; $p = 0,99$, ANOVA 2 vías).

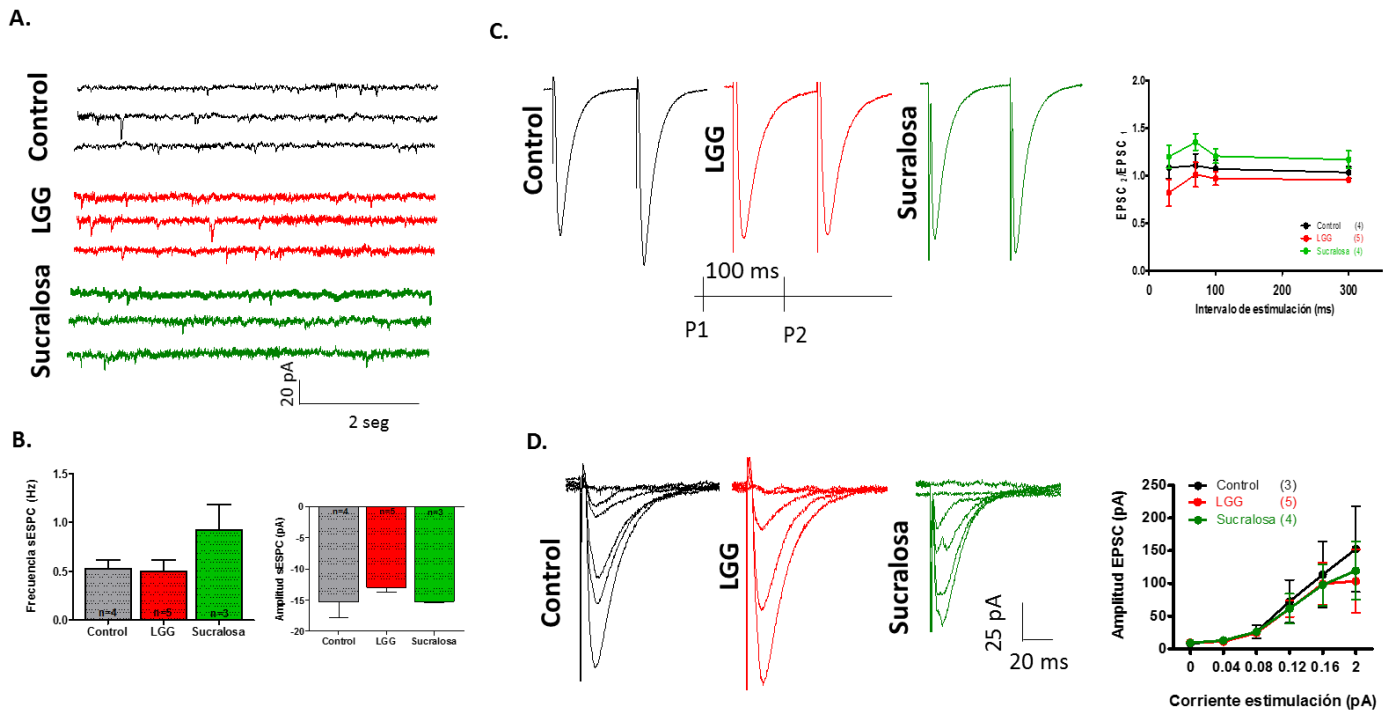


Figura 7. Efecto del consumo de LGG y sucralosa sobre la transmisión excitatoria en HPCv. (A) Trazos representativos de sIPSC (arriba) a -65 mV (B) Análisis cuantitativo de la frecuencia (Hz) de sIPSC y (izquierda) y amplitud (pA) de los eventos de sIPSC (derecha). © Trazos representativo de pulsos pareados (PP) en un intervalo de 100 ms en fijación de voltaje a -65 mV (izquierda) y razón $IPSC_2/IPSC_1$ a 30, 70, 100 y 300 ms (derecha) (D) Trazos representativos de registros de entrada-salida en fijación de voltaje a -65 mV (izquierda) y curvas entrada-salida con amplitud EPSC (derecha).

7.6 Potenciales de campo post-sinápticas excitatorios (fEPSP) de grupo de neuronas piramidales CA1 de HPCv de animales tratados con LGG y sucralosa.

Los potenciales de campo excitatorios post-sinápticos (fEPSP) corresponde a un cambio en los potenciales de membrana de una población de neuronas tras estimular un grupo fibras. La figura 8A muestra los trazos representativos de los potenciales de campo excitatorios post-sinápticos (fEPSP) tras aplicar protocolo de PP. En ellas se puede observar que la amplitud del segundo pulso del grupo control es mayor respecto al primer pulso (facilitación), mientras que, tanto para LGG y sucralosa, la amplitud del segundo pulso es menor respecto al primero (depresión). Las curvas obtenidas a partir de dichos registros (figura 8B) presentan diferencias cuando el intervalo de estimulación

es de 30 ms, siendo $1,19 \pm 0,15$ para control, $0,74 \pm 0,13$ para LGG y $0,74 \pm 0,09$ para sucralosa, con $p < 0,05$ del grupo LGG contra el control y $p < 0,01$ del grupo sucralosa contra el control, tras aplicar ANOVA 2 vías, post hoc Bonferroni. Si bien, los resultados en célula única arrojan que no existen cambios en la probabilidad de liberación, al evaluar un grupo de neuronas el tratamiento con LGG y sucralosa incrementa la P_r de las sinapsis excitatorias.

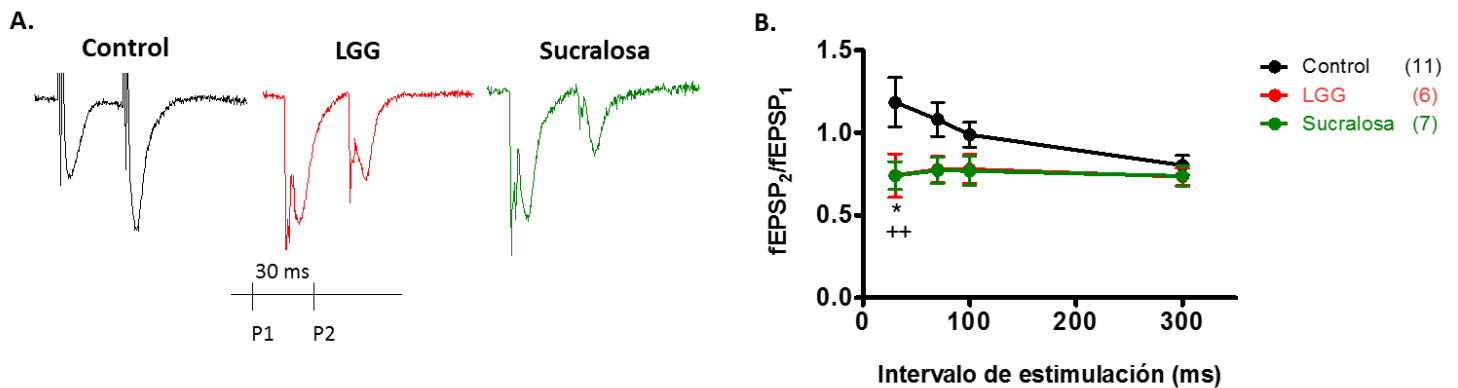


Figura 8. Efecto del consumo de LGG y sucralosa sobre potenciales excitatorios post-sinápticos de campo (fEPSP) (A) Trazos representativo de pulsos pareados (PP) en un intervalo de 30 ms. (B) Razón $IPSC_2/IPSC_1$ a 30, 70, 100 y 300 ms (derecha). * $p < 0,05$ LGG contra Control y ++ $p < 0,01$ Sucralosa contra Control, ANOVA 2 vías, post hoc Bonferroni.

DISCUSIÓN

La microbiota intestinal es un importante componente del sistema gastrointestinal donde tiene una relación simbiótica con el hospedero. Su presencia está estrechamente relacionada a la salud digestiva y función nerviosa central en mamíferos. En las últimas décadas se ha estudiado que cambios en su composición puede estar involucrada en la fisiopatología de enfermedades tanto metabólicas como neuropsiquiátricas. Los probióticos han sido extensamente estudiados por su impacto en la microbiota intestinal y funcionamiento en el tracto digestivo, sin embargo, actualmente también son estudiados por sus efectos en el sistema nervioso. A pesar de las numerosas evidencias de la administración de que estos tienen un impacto en componentes del sistema nervioso central, hasta la fecha no se había evaluado su impacto en fisiología neuronal. El objetivo de esta investigación apuntaba a evaluar los posibles cambios en la transmisión sináptica luego de dos semanas de tratamiento con una cepa de *Lactobacillus*, sin embargo, dado que se administró en conjunto con sucralosa no fue posible evaluar sus efectos dado que se observó que la sucralosa por si sola es capaz de modificar la transmisión. Los resultados obtenidos en esta investigación indican que la sucralosa disminuye la transmisión sináptica inhibitoria en hipocampo de ratas, y, probablemente, sea producto de que esta es capaz de modificar la composición de la microbiota intestinal, lo que sugiere que, efectivamente, la microbiota tiene un rol importante en el correcto funcionamiento del sistema nervioso central.

El consumo de probióticos en la actualidad ha ido en aumento producto de la sensación de bienestar general que produce y por las evidencias experimentales y clínicas

de sus efectos en el SNC, por lo que están siendo evaluados como posible terapia para varios trastornos neuropsiquiátricos (Butler MI *et al.*, 2019). Las bacterias del género *Lactobacillus* son ampliamente utilizadas como probióticos ya que preserva y mantiene la microbiota del hospedero (Yan F & Polk DB, 2012; Arshad FA *et al.*, 2018). El *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) es uno de los probióticos más estudiado en pruebas clínicas. Se ha reportado que LGG ejerce efectos en el tratamiento y prevención de varios desordenes, tales como: colitis ulcerosa, diarrea, dermatitis atópica, síndrome de colon irritable, obesidad en niños, entre otros (Doron S, Sydman DR & Gorbach SL, 2005; Yan F & Polk DB, 2012). Estas bacterias producen ácido láctico, por lo que, acidifican su entorno y, es por ello, que distintos trabajos que administran alguna cepa de *Lactobacillus* a modelos murinos a través del agua de bebida lo hacen utilizando un vehículo que permita que el animal beba su contenido sin que produzca un efecto secundario (Anukam KC, Osazuwa EO & Reid G, 2005; Murphy L, 2009; Hu X *et al.*, 2013; Hijová E *et al.*, 2018). Estudios previos en el laboratorio han utilizado sucralosa como vehículo en la administración de distintos probióticos en el agua de bebida de los animales (Barrera-Bugueño C *et al.*, 2017).

El principal objetivo de esta investigación era evaluar el efecto del consumo de LGG sobre transmisión sináptica en hipocampo y los resultados no revelan cambios en los parámetros evaluados, sin embargo, se evidenció que la sucralosa, administrada como vehículo, estaría interfiriendo en las observaciones, ya que no existen diferencias entre el grupo LGG y el vehículo (sucralosa). Los resultados obtenidos en esta tesis, revelan que la sucralosa administrada como vehículo para el probiótico tiene efecto sobre la transmisión inhibitoria y, por ende, probablemente en el balance excitatorio/inhibitorio de las neuronas piramidales de CA1 HPCv.

La sucralosa es un edulcorante artificial no calórico (ENC) que imita el sabor del azúcar sin tener un aporte calórico siendo ampliamente utilizado en alimentos para reducir el consumo de este y la ingesta calórica ya que no es metabolizado por nuestro organismo (Cavagnari BM, 2019). Por un lado, diversos estudios demuestran que este ENC no es metabolizado, no se absorbe y es eliminado por las heces y orina (Chattopadyay S, Raychaudhuri U & ChakrabortyR, 2014). A pesar de ello, recientes estudios en modelos murinos y humanos han concluido que el paso de sucralosa por el tracto gastrointestinal es capaz de modificar la microbiota (Suez *Jet al.*, 2015; Ruiz-Ojeda FJ *et al.*, 2019). Abou-Donia y colaboradores fueron los primeros en observar que la administración de sucralosa de forma prolongada disminuye el número de bacterias anaeróbicas y aeróbicas, *bifidobacterias*, *lactobacillus* y *bacteroides* en las fecas de los animales de manera dosis dependiente (Abou-Donia MB *et al.*, 2008). Otro estudio en el 2017 los investigadores observaron cambios en los patrones de abundancia de distintas cepas a los 3 y 6 meses de consumo de sucralosa por roedores (Biang X *et al.*, 2017). Finalmente, Uebanso T y colaboradores determinaron una disminución de *Clostridium cluster XIVa* en los animales que ingirieron sucralosa (Uebanso T *et al.*, 2017). De igual forma el maltitol, componente del edulcorante utilizado, modifica la población de *Bifidobacterium* en humanos (Beards E, Tuohy K & Gibson G, 2010).

Por otro lado, Nestmann y colaboradores realizaron una extensa revisión de los estudios toxicológicos que incluyen parámetros farmacocinéticos, metabólicos y genéticos en distintas especies, incluido el humano, concluyendo,, finalmente, que el consumo de sucralosa es seguro como ENC en distintos alimentos y bebestibles (Magnuson B, Roberts A & Nestmann ER, 2017). Sin embargo, actualmente una serie de estudios han demostrado el consumo de sucralosa, y otros edulcorantes, producen desregulaciones en el balance

energético y, por ende, en mecanismos que regulan la ingesta de alimento, sugiriendo que el consumo prolongado puede tener efectos a nivel SNC (Pepino MY & Bourne C, 2011; Mitsutomi K *et al.*, 2014; Wang QP *et al.*, 2016). Recientemente, un estudio demostró que ratones a los que se les administró sucralosa y otros ENC en el agua de bebida presentaron un incremento en las concentraciones de dopamina, serotonina, norepinefrina y epinefrina en muestras de cerebro completo (Yin JK *et al.*, 2019), sin embargo, un trabajo del 2017 revela una disminución de dopamina en cuerpo estriado y cerebelo en animales que se les administró ENC (Calderón D *et al.*, 2017), por lo que, los efectos de sucralosa pueden ser diferentes en distintas áreas cerebrales.

El hipocampo es una de las estructuras más estudiadas del SNC ya que tiene un rol importante en procesos de aprendizaje y en la adquisición y consolidación de memoria (Jarrard LE, 1993; Bird CM & Burgess N, 2008). Por un lado, esta estructura recibe proyecciones provenientes de la corteza entorrinal y en menor proporción de otras estructuras subcorticales, mientras que, por otro lado, las neuronas piramidales de CA1 son las proyecciones de salida hacia subiculum y corteza entorrinal (Knierim JJ, 2015). La integración sináptica es crucial para el correcto traspaso de la información y para comprender la eficacia de la transmisión es importante conocer las propiedades eléctricas intrínsecas de la neurona. Los resultados muestran que los animales que consumieron sucralosa tienen un potencial de membrana en reposo más despolarizado en comparación al grupo control. El potencial de membrana en reposo expresa la diferencia del potencial eléctrico entre el interior y exterior de la célula y este depende de las concentraciones iónicas y la permeabilidad a estos, a través de la membrana (Purves D *et al.*, 2011). La mantención de las concentraciones de K^+ extracelular es crucial para reestablecer y conservar el potencial de membrana en reposo en neuronas para el adecuado

funcionamiento y, los astrocitos también cumplen un rol importante en dicha homeostasis (Somjen GG, 1979). Erbas y colaboradores evaluaron el efecto sucralosa en hipocampo y uno de sus hallazgos más importantes es la disminución de astrocitos en CA1 (Erbas O *et al.*, 2018) lo que puede conllevar un incremento en las concentraciones extracelulares de K^+ y, por ende, un incremento en el potencial de membrana de reposo de las neuronas piramidales, sin embargo, esto debe ser comprobado experimentalmente.

La membrana plasmática de las neuronas, además de tener un potencial eléctrico, tiene tres propiedades eléctricas pasivas que permitirán la propagación espacial y temporal de las señales eléctricas subumbrales: resistencia de la membrana, capacitancia y resistencia axial intracelular, las que varían con el tamaño celular (Purves D *et al.*, 2011). En este trabajo se evaluó las primeras dos propiedades pasivas en las neuronas piramidales de CA1 HPCv y, los distintos grupos no tienen diferencia significativa, por lo que, el consumo de sucralosa no tendría efecto sobre el tamaño de estas neuronas.

La inyección de una corriente de carga negativa a la célula aumenta la separación de cargas a través de la membrana, lo que hace que se hiperpolarice, mientras que la inyección de una carga positiva produce la despolarización de la membrana y si alcanza el potencial mínimo para activar conductancias catiónicas (umbral) se genera un potencial de acción, cuya amplitud no depende de la intensidad del estímulo. La relación entre corriente y voltaje permite estimar la excitabilidad de la célula al igual que el umbral de disparo (Stewart M & Wong RK, 1993; Staff N *et al.*, 2000). La figura 4D indica que dichos parámetros no presentan diferencia entre los grupos experimentales, por lo que si bien, el tratamiento con sucralosa modifica el potencial de membrana en reposo, no afecta la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1 HPCv.

Una neurona piramidal recibe miles de contactos sinápticos excitatorios e inhibitorios. El correcto funcionamiento del circuito depende de una actividad global estable, donde las conductancias inhibitorias cumplen un rol fundamental en la regulación de la actividad del circuito (Sohal VS & Rubenstein JL, 2019). En el hipocampo las interneuronas corresponden entre un 10- 15% de la población neuronal, las que proporcionan entradas sinápticas GABAérgicas, es decir, hiperpolarizan la membrana celular, a través de flujo de Cl^- o K^+ tras la activación de receptores GABA en la neurona post-sináptica (Pelkey KA *et al.*, 2017). La administración de sucralosa produce una disminución en la frecuencia de las corrientes sIPSC y mISPC sin afectar la amplitud de estos (figura 5), lo que en primera instancia sugiere que puede existir una alteración pre-sináptica relacionada con la liberación de las vesículas que contienen el neurotransmisor. A través de la PPR es posible evaluar la probabilidad de liberación del neurotransmisor y establecer si fenómenos pre-sinápticos están involucrados a los resultados anteriores. La relación de la ePSC del segundo pulso respecto al primero, permite establecer si hay una depresión o facilitación por pulsos pareados. En el caso de las sinapsis inhibitorias, se observa un fenómeno de depresión, lo que está asociado a una alta Pr ya que, con el primer pulso de corriente aplicado, se liberan la mayoría de las vesículas que contienen el neurotransmisor, generando una eIPSC mayor que la obtenida tras aplicar el segundo pulso, por lo que, las propiedades de las vesículas y la presencia de Ca^{+2} , necesario para la exocitosis de estas, son factores pre-sinápticos relevantes para la depresión por PP (Jiang L *et al.*, 2000; Blitz D, Foster KA & Regehr W, 2004; Regehr W, 2017). Los resultados presentados en la figura 6A señalan que no hay diferencias en la PRR de las eIPSC entre los distintos grupos, por lo que, la disminución de la frecuencia en los eventos espontáneos no responde a mecanismos pre-sinápticos.

El número de sitios de liberación que conectan dos neuronas es transcendental para incrementar la probabilidad de que la neurona post-sináptica genere un potencial de acción y, a través la relación entre amplitud y frecuencia de los sIPSC y mIPSC, es posible estimarla (Hsia AY *et al.*, 1997). Riebe I. & Hanse E. estimaron el número de contactos (sinapsis funcionales) entre interneuronas y neuronas piramidales de hipocampo a través del índice de multiplicidad, el cual es en promedio de 2 (Riebe I & Hanse E, 2012), resultado semejante obtenido en los distintos grupos experimentales. Dado que no existen cambios en la probabilidad de liberación ni en las sinapsis funcionales, pero si en la frecuencia de las corrientes espontáneas dependientes e independientes del PA, es probable que el número de neuronas GABAérgicas se encuentre disminuida (figura 9). En la actualidad, sólo dos estudios han evaluado el daño neuronal en hipocampo tras el consumo de sucralosa, en los que cuantifican el número de neuronas, no obstante estos resultados no diferencia entre neuronas piramidales y GABAérgicas, por lo que, podría la posible disminución de neuronas GABAérgicas podría estar enmascarado (Alabastro-Villareal LM *et al.*, 2016, Erbas O *et al.*, 2018).

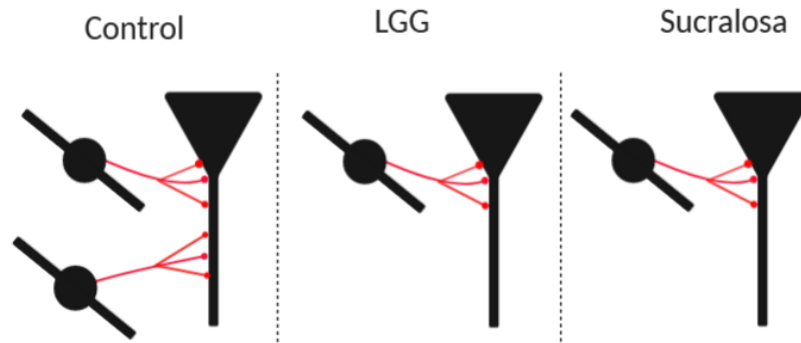


Figura 9. Esquema simplificado de los efectos de sucralosa. El esquema ilustra el posible efecto del consumo de sucralosa sobre la conectividad y transmisión inhibitoria sobre las neuronas piramidales en CA1 de HPCv. El número de contactos sinápticos (rojo) no se ve modificado por el consumo, sin embargo si el número de interneuronas.

Howard MA y colaboradores hipotetizan que al existir una disminución en la eficacia en las sinapsis inhibitorias en hipocampo conlleva a un circuito excitatorio compensando, por lo que, el circuito puede ser susceptible a la hiperexcitabilidad frente a un estímulo fuerte (Howard MA, Rubenstein JL & Baraban SC, 2014). En el estudio de de-la-Cruz y colaboradores, evaluaron el efecto del consumo de Splenda® (sucralosa comercial) en la actividad neuronal a través de la expresión de c-Fos, la cual incrementa en hipocampo (de-la-Cruz *et al.*,2018). El análisis de la actividad espontánea exitatoria en las neuronas piramidales de CA1 HPCv de los animales que consumieron sucralosa revela un incremento en la frecuencia de los eventos espontáneos, sin embargo, no es estadísticamente diferente (figura 7B), lo que puede ser producto de tamaño muestra reducido. De igual forma al aplicar un protocolo de PP en neuronas individuales no se observan diferencia en la PPR (n=4), no obstante, cuando se aplica el mismo protocolo y se registran los potenciales post-sinápticos en un grupo neuronal se observa un fenómeno de depresión por pulsos pareados, lo que indica que incrementa la probabilidad de liberación del neurotransmisor (figura 7C). La diferencia de lo observado en una neurona individual y el grupo neuronal se puede deber que al suponer una disminución en el número de sinapsis GABAérgicas y no en el número de contactos sinápticos es probable que las neuronas individuales registradas no se observe el fenómeno, mientras que al registrar los potenciales de un grupo de neuronas se observa el efecto global que tiene esta disminución en el número de sinapsis.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha sugerido la reducción en la ingesta de azúcar, lo que ha conllevado a que el consumo de ENC incremente (World Health Organization, 2015). En Chile la dosis máxima permitida por el Reglamento Sanitario de

Salud (RSA) es de 15 mg/Kg y estudios realizados entre el 2011 y 2015 la población no supera dicha ingesta (Martyn D *et al.*, 2018), sin embargo, en el 2016 se publicó la nueva Ley de Etiquetado de Alimentos y Publicidad (Ley N° 20.606), lo que ha llevado a la industria alimentaria a incrementar el uso este aditivo. En este sentido, y a raíz de los resultados obtenidos, se hace necesario cuestionar el real impacto del consumo de sucralosa en la salud de sus consumidores que van desde niños hasta adultos mayores.

CONCLUSIÓN

Los resultados de esta investigación no permiten evaluar el efecto del consumo de LGG sobre la transmisión inhibitoria en CA1 de HPCv de ratas Sprague-Dawley producto de la presencia de sucralosa (vehículo) en la administración del probiótico. Sin embargo, este trabajo entrega las primeras evidencias electrofisiológicas de los efectos del consumo de sucralosa en ratas adultas, donde se observó que el potencial de membrana de las neuronas piramidales de CA1 en HPCv está más despolarizado en comparación al grupo control, pero no se observaron cambios en otras propiedades eléctricas de dichas neuronas. Por otro lado, la ingesta de sucralosa también tiene efectos sobre la frecuencia de los eventos de sIPSC y mIPSC, lo que sugiere fuertemente que la ingesta de este edulcorante artificial tiene un impacto en la transmisión inhibitoria de hipocampo ventral. Adicionalmente, en las fEPSP se observa una disminución en la razón de PP (depresión) lo que se condice con lo anterior.

Estos nuevos antecedentes son importantes para seguir realizando estudios en el área dado que el consumo de sucralosa, al no tener aporte calórico, ha incrementado en la población chilena tras la aprobación de la actual ley de etiquetados.

BIBLIOGRAFÍA

Abou-Donia MB, El-Masry, Abdel-Rahman AA, McLendon RE, Schiffman SS (2008). Splenda alters gut microflora and increases intestinal p-glycoprotein and cytochrome p-450 in male rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 71:1415-1429

Aidy SE, Dinan TG & Cryan JF (2014). Immune modulation of the brain-gut-microbe axis. *Frontiers in Microbiology* 5:146

Alabastro-Villareal LM, Montes-Cruz RA, Bagui-Ples M, Santos-Vitor II RJ (2016). Neurotropic effects of aspartame, stevia and sucralose on memory retention and on the histology of the hippocampus of the ICR mice (*Mus musculus*). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6(2):114-118.

Anukam KC, Osazuwa EO, Reid G (2005). Improved appetite of pregnant rats and increased birth weight of newborns following feeding with probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus fermentum* RC-14. *The Journal of Applied Research* 5(1):46-52

Arshad FA, Mehmood R, Khan S, Rubina, Hussain S, Khan A, Farrooq O (2018). *Lactobacilli* as probiotics and their isolation from different sources. *British Journal of Research* 5(3)43: 1-11

Barrea-Bugueño C, Realini O, Escobar-Luna J, Sotomayor-Zárata R, Gotteland M, Julio-Pieper M, Bravo JA (2017). Anxiogenic effect of a lactobacillus, inulin and the synbiotic on healthy juvenile rats. *Neuroscience* 359:18-29

Beards E, Tuohy K & Gibson G (2010). A human volunteer study to assess the impact of confectionery sweeteners on the gut microbiota composition. *British Journal of Nutrition* 104(5):701-708.

Bian X, Chi L, Gao B, Tu P, Ru H, Lu K (2017). Gut microbiome response to sucralose and its potential role in inducing liver inflammation in mice. *Frontiers in Physiology* 8:487

Bird CM & Burgess N (2008). The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nature Reviews Neuroscience* 9:182-194

Blitz D, Foster KA, Regehr W (2004). Short-term plasticity: a comparison of two synapses. *Nature reviews neuroscience* 5(8): 630-640

Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, Bienestock J, Cryan JF (2011). Ingestion of lactobacillus train regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *PNAS* 108:16050-16055

Bonaz B, Bazin T & Pellissier S (2018). The vagus nerve at the interface of the microbiota-gut-brain axis. *Frontiers in Neuroscience* 12:49

Butler MI, Mörkl S, Sandhu KI, Cryan JF, Dinan TG (2019). The gut microbiome and mental health: what should we tell our patients? *The Canadian Journal of Psychiatry* 1-14.

Calderon D, Ortiz M, Valenzuela A, Osnaya N, Hernández E, Juárez H, Barragán G, Santamaría D, Rojas A (2017). Biochemical and histological changes produced by sweeteners and cytarabine in the brain of young rats. *Nutrición Hospitalaria* 35: 194-200

Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C (2015). The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of Gastroenterology* 29:203-209

Cavagnari BM (2019). Non-caloric sweeteners: specific characteristics and safety assessment. *Archivos Argentinos de Pediatría* 117(1):e1-e7

Chattopadhyay S, Raychaudhuri U & Chakraborty R (2014). Artificial sweeteners- a review. *Journal of Food Science and Technology* 51(4):611-621

Cheng LH, Liu YW, Wu CC, Wang S, Tsai YC (2019). Psychobiotics in mental health, neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. *Journal of Food and Drug Analysis* 27(3):632-648

C्रेसи GA (2015). The gut microbiome: what we do and don't know. *Nutrition in Clinical Practice* 30(6):734-746.

Cryan JF & Dinan TG (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behavior. *Nature Reviews Neuroscience* 13:701-712.

Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaansen TFS, Boehme M, Cadognone MG, Cusotto S, Fulling C, Golubeva AV, Guzzetta KE, Jaggar M, Long-Smith CM, Lyte JM, Martin JA, Molinero-Perez A, Moloney G, Morelli E, Morillas E, O'Connor R, Cruz-Pereira JS, Peterson VL, Rea K, Ritz NL, Sherwin E, Spichak S, Teichman EM, van de Wouw M, Ventura-Silva AP, Wallace-Fitzsimons SE, Hyland N, Clarke G & Dinan TG (2019). The microbiota-gut-brain axis. *Physiology Review* 99: 1877-2013.

Cryan JF, O' Riordan KJ, Sandhu KV, Peterson VL, Dinan TG (2020). The gut microbiome in neurological disorders. *Lancet Neurology* 19(2): 179-194.

Davari S, Talaei SA, Alaei H, Salami M (2013). Probiotics treatment improves diabetes-induced impairment of synaptic activity and cognitive function: behavioral and electrophysiological proof for microbiome-gut-brain axis. *Neuroscience* 240:287-296

de-la-Cruz M, Millán-Aldaco D, Soriano-Nava DM, Drucker-Colín R, Murillo-Rodríguez E (2018). The artificial sweeteners Splenda intake promotes changes in expression of c-Fos and NeuN in hypothalamus and hippocampus of rats. *Brain Research* 1800:181-189

Desbonnet L, Garret L, Clarke G, Kiely B, Cryan JF, Dinan TG (2010). Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in maternal separation model of depression. *Neuroscience* 170:1179-1188

Dieterich W, Schink M & Zopf Y (2018). Microbiota in the gastrointestinal tract. *Medical Science* 6(4):116

Dinan TG, Stanton C & Cryan JF (2013). Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biological Psychiatry* 74(10):720-726

Distrutti O, O'Reilly JA, McDonalds C, Cipriani S, Renga B, Lynch MA, Fiorucci S (2014). Modulation of intestinal microbiota by the probiotic VSL#3 resets brain gene expression and ameliorate the age-related deficit in LTP. *PLoS One* 9:e106503

Doron S, Snyman DR, Gorbach SL (2005). Lactobacillus GG: bacteriology and clinical applications. *Gastroenterology Clinics of North America* 34:483-498

Emge JR, Huynh K, Miller EN, Kaur M, Reardon C, Barret KE, Gareau MG (2016). Modulation of the microbiota-gut-brain axis by probiotics in a murine model of inflammatory bowel disease. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 310(11):G989-G998

Erbas O, Erdogan MA, Khilnezhad A, Solmaz V, Gürkhan FT, Yigittürk G, Eroglu HA, Taskiran D (2018). Evaluation of long-term effects of artificial sweeteners on rat brain: a biochemical, behavioral and histological study. *Journal Biochemical Molecular Toxicology* e22953.

Farzi A, Fröhlich EE, Holzer P (2018). Gut microbiota and the neuroendocrine system. *Neurotherapeutics* 15(1):5-22

Fitzsimons SE, Hyland N, Clarke G, Dinan TG (2019). The microbiota-gut-brain-axis. *Physiological Reviews* 99:1877-2013.

Forsythe P, Bienenstock J, Kunze WA (2014). Vagal pathways for microbiome-gut-brain axis communication. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 817:115-133

Gareau MG, Wine E, Rodriguez DM, Cho JH, Whary MT, Philpott DJ, Macqueen G, Sherman PM (2011). Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut* 60:307-317

Gilbert JA, Blaser MJ, Caporaso JG, Jansson JK, Lynch SV & Knight R (2018). Current understanding on the human microbiome. *Nature Medicine* 24(2):392-400.

Hijová E, Bertková I, Stofilová J, Strojny L, Chmelárova A, Bomba A (2018). Anti-inflammatory potential of *Lactobacillus plantarum* LS/07 in acute colitis in rats. *Acta Veterinaria Beograd* 68(1):55-64

Howard MA, Rubenstein JL, Baraban SC (2014). Bidirectional homeostatic plasticity induced by interneurons cell death and transplantation in vivo. *PNAS* 111(1):492-497.

Hsia AY, Malenka RC, Nicoll RA (1997). Development of excitatory circuitry in the hippocampus. *Journal of Neurophysiology* 79(4): 2013-2024

Hu X, Wang T, Li W, Jin F, Wang L (2013). Effects of NS *lactobacillus* strains in lipid metabolism of rat fed a high-cholesterol diet. *Lipids in Health and Disease* 12:67

Jarrard LE (1993). Review: On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behavioral and Neural Biology* 60(1):9-26.

Jiang L, Sun S, Nedergaard M & Kang J (2000). Paired-pulse modulation at individual GABAergic synapses in rat hippocampus. *Journal of physiology* 523(2): 425-439.

Kim N, Yun M, Oh YJ, Choi HJ (2018). Mind-altering with the gut: modulation of the gut-brain axis with probiotics. *Journal of Microbiology* 56(3):172-182

Knierim JJ (2015). The hippocampus. *Current Biology* 25(23):R1116-R1121

Liang L, Zhou H, Zhang S, Yuan J, Wu H (2017). Effects of gut microbiota disturbance induced in early life on the expression of extrasynaptic GABA-A receptor $\alpha 5$ γ subunits in the hippocampus of adult rats. *Brain Research Bulletin* 135:113-119

Liang S, Wang T, Hu X, Luo K, Li W, Wu X, Duan Y, Jin F (2015). Administration of *lactobacillus helveticus* NS8 improves behavioral, cognitive and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. *Neuroscience* 310:561-577

Liu WH, Chuang HL, Huang YT, Wu CC, Chou GT, Wang S, Tsai YC (2016). Alteration of behavior and monoamine levels attributable to *Lactobacillus plantarum* PS128 in germ-free mice. *Behavioural Brain Research* 298 B:202-209

Liu X, Cao S & Zhang X (2015). Modulation of gut microbiota-brain axis by probiotics, prebiotics and diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(36):7885-7895

Liu YW, Liu HM, Wu CC, Juan YC, Wu YC, Tsai HP, Wang S, Tsai YC (2016). Psychotropic effect of *Lactobacillus plantarum* PS128 in early life-stressed and naïve adult mice. *Brain Research* 1631:1-12

Luo J, Wang T, Liang S, Hu x, Li W, Jin F (2014). Ingestion of Lactobacillus strain reduces anxiety and improves cognitive function in the hyperammonemia rat. *Science China Life Sciences* 57(3):327-335

Lynch S. & Pedersen O. (2016). The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *New England Journal of Medicine*, 375(24): 2369-2379.

Lyte M (2013). Microbial endocrinology in the microbiome-gut-brain axis: how bacterial production and utilization of neurochemicals influence behavior. *PLOS Pathogens* 9(11): 1-3

Magnuson B, Roberts A & Nestmann ER (2017). Critical review of the current literature on the safety of sucralose. *Food and Chemical Toxicology* 106:324-355

Martyn D, Darch M, Roberts A, Lee H, Tian T, Kaburagi N, Belmar P (2018). Low-/Non-calorie sweeteners: a review of global intake. *Nutrients* 10(3):357

Messaoudi M, Lalonde R, Violle N, Javelot H, Desor D, Nejd A, Bisson JF, Rougeot C, Pichelin M, Cazaubiel M, Cazabuiel JM (2011). Assessment of ppsychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidocaberium longum* R01759 in rats and humans subjects. *British Journal of Nutrition* 105:755-764

Mitsutomi K, Masaki T, Shimasaki T, Gotoh K, Chiba S, Kakuma T, Shibata H (2014). Effects of a nonnutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity. *Metabolism* 63(1):69-78

Murphy L (2009). *In vivo* assessment of potential probiotic *Lactobacillus salivarius* strains: evaluation of their establishment, persistence and localization in the murine gastrointestinal tract. *Microbial Ecology in Health and Disease* 11(3):149-157

Pelkey KA, Chittajallu R, Craig MT, Tricoire L, Wester JC, McBain C (2017). Hippocampal GABAergic inhibitory interneurons. *Physiological Reviews* 97:1619-1747

Pepino MY & Bourne C (2011). Nonnutritive sweeteners, energy balance and glucose homeostasis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 14(4):391-395.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D et al. editors (2001). *Neuroscience*. Chapter 5: Synaptic transmission. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

Regehr W (2017). Short-term presynaptic plasticity. *Cold spring Harbor perspectives in biology* 4:a005702

Riebe I & Hanse E (2012). Development of synaptic connectivity onto interneurons in stratum radiatum in the CA1 region of the rat hippocampus. *Neuroscience* 13:14

Ruiz-Ojeda FJ, Plaza-Díaz J, Sáez-Lara MJ, Gil A (2019). Effects of sweeteners on the gut microbiota: a review of experimental studies and clinical trial. *Advances in nutrition* 10(suppl_1):S31-S48

Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 16:605-616

Savignac HM, Kiely B, Dinan TG, Cryan JF (2014). Bifidobacteria exert strain-specific on stress-related behavior and physiology in BALB/c mice. *Neurogastronenterology & Motility* 26:1615-1627

Smith CJ, Emge JR, Berzins K, Lung L, Khamishon R, Shah P, Rodrigues DM, Sousa AJ, Reardon C, Sherman PM, Barret KE, Gareu MG (2014). Probiotics normalize the gut-brain-microbiota axis in immunodeficient mice. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 307(8):G793-G802

Sohal VS & Rubenstein JL (2019). Excitation-inhibition balance as a framework for investigating mechanisms in neuropsychiatric disorders. *Molecular Psychiatry* 24:1248-1257

Somjen GG (1979). Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Physiology* 41:159-177

Sudo N (2014). Microbiome, HPA axis and production of endocrine hormones in the gut. In Lyte M, Cryan J (eds) *Microbial Endocrinology: The microbiota-gut-brain axis and disease*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 817. Springer, New York.

Staff N, Jung HY, Thiagarajan T, Yao M, Spruston N (2000). Resting and active properties of pyramidal neurons in subiculum and CA1 of rat hippocampus. *Journal in neurophysiology* 84(5):2398-2408.

Stewart M & Wong RK (1993). Intrinsic properties and evoked response of guinea pig subicular neurons in vitro. *Journal in neurophysiology* 70: 232-245

Strandwitz P (2018). Neurotransmitter modulation by the gut microbiome. *Brain Research* 1693(B): 128-133.

Suez J, Korem T, Ziberan-Schapira G, Segal E, Elinav E (2015). Non-caloric artificial sweeteners and the microbiome: findings and challenges. *Gut Microbes* (6)2:149-155

Tabouy L, Getselter D, Ziv O, Karpuz M, Tabouy T, Lukic I, Maayouf R, Werbner N, Ben-Amram H, Nuriel-Ohayon M, Koren O, Elliott E (2018). Dysbiosis in microbiome and probiotic treatment in a genetic model of autism spectrum disorders. *Brain, Behavior and Immunity* 73:310-319

Takada M, Nishida K, Kataoka-Kato A, Gondo Y, Ishikawa H, Suda K, Kawai M, Hoshi M, Watanabe O, Igarashi T, Kuwano Y, Miyasaki K, Rokutan K (2016). Probiotic *lactobacillus casei* strain Shirota relieves stress-associated symptoms by modulating the gut-brain interaction in human and animal models. *Neurogastroenterology & Motility* 28:1027-1036.

Turnbaugh P, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R & Gordon JI (2007). The Human Microbiome Project. *Nature* 449:804-810.

Uebanso T, Ohnishi A, Kitayama R, Yoshimoto A, Nakahashi M, Shimohata T, Mawatari K, Takahashi A (2017). Effects of low-dose non-caloric sweetener consumption on gut microbiota in mice. *Nutrients* 9(6):560

Wall R, Cryan JF, Ross RP, Fitzgerald GF, Dinan TG, Stanton C (2014). Bacterial neuroactive compounds produced by psychobiotics. . In Lyte M, Cryan J (eds) *Microbial Endocrinology: The microbiota-gut-brain axis and disease*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 817. Springer, New York.

Wang H, Lee IS, Braun C, Enck P (2016). Effect of probiotics on central nervous system function in animals and humans: a systematic review. *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 22(4):589-605

Wang QP, Lin YQ, Zhang L, Wilson YA, Oyston LJ, Cotterell J, Qi Y, Khuong TM, Bakhshi N, Planchenault Y, Browman DT, Lau MT, Cole TA, Wong ACN, Simpson SJ, Cole AR, Penninger JM, Herzog H, Neely GG (2016). Sucralose promotes food intake through NPY and neuronal fasting response. *Cell Metabolism* 24(1):75-90

Wang T, Hu X, Liang S, Li W, Wu X, Wang L, Jin F (2015). *Lactobacillus fermentum* NS9 restores the antibiotic induced physiological and psychological abnormalities in rats. *Beneficial Microbes* 6(5): 707-717

World Health Organization (2015). Sugar intake for adults and childrens: Guideline. World Health Organization, Geneva.

Yan F & Polk DB (2012). *Lactobacillus rhamnosus* GG: an update strategy to use microbial products to promote health. *Journal of Functional Food Review* 4(2):77-84

Yin KJ, Xie DY, Zhao L, Fan G, Ren JN, Zhang LL, Pan SY (2019). Effects of differents sweeteners on behavior and neurotransmitter release in mice. *Journal of Food Science and Technology* 57(1):113-121