



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

Determinación de la proteína amiloide bacteriana curli como factor asociado a
la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer en un modelo de ratón
transgénico

T E S I S

Que presenta

QFB. DIANA FRIDA DE LIMA MAR

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIA
EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

Director de la tesis: Dra. Claudia Pérez Cruz

Dedicado:

A Dios por iluminarme en mi camino.

A mis padres Patricia y José Juan, por su amor incondicional.

A la memoria de mis abuelos paternos, y a mis abuelos maternos que aún siguen conmigo.

A mis hermanos: Dylan, Denisse, Daniela y Juan Carlos, por su amor y por considerarme su ejemplo a seguir.

A mis mejores amigos por todo su cariño y apoyo.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo financiero mediante la beca número 788837 y Proyecto Fronteras de la Ciencia A1-S-42600 (a C.P.C).

A la Dra. Claudia Pérez Cruz por haberme dado la oportunidad de entrar en el Laboratorio 32 del departamento de Farmacología, orientarme en el desarrollo de esta investigación y por sus sugerencias y tiempo invertido a lo largo de este proyecto.

A mis sinodales el Dr. Francisco J. Camacho Arroyo y al Dr. Pablo Muriel de la Torre, por su amable atención y valiosa orientación en el protocolo, los avances y la tesis.

Al Dr. Fernando Navarro García y al Dr. Jaime García Mena por permitirme trabajar en sus respectivos laboratorios para la realización de algunos experimentos y por sus observaciones que son parte de esta tesis.

Al Dr. Vicente Sánchez Valle por su disponibilidad para resolver dudas y por compartir su conocimiento sobre las técnicas moléculas.

Al Dr. Juan de Dios Rodríguez por enseñarme la técnica de inmunofluorescencia y su apoyo a lo largo de la maestría.

A la MC. Lucia Chávez Dueñas por enseñarme lo necesario sobre la metodología en microbiología.

A la MC. Ivonne Sagrario Romero Flores por ser la mejor compañera/amiga del laboratorio, por compartir sus conocimientos, por orientarme en el análisis de datos y por todo su apoyo incondicional tanto emocional como intelectual; y a todos mis amigos y compañeros que tuve en la maestría por su motivación y confianza en mis habilidades para culminar este proyecto.

Por último, a toda mi familia por todo el apoyo emocional que desde muy lejos me han brindado.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	8
Lista de figuras	10
Lista de tablas	12
Resumen	13
Abstract.....	15
1. Introducción	17
1.1. Enfermedad de Alzheimer (EA)	17
1.1.1. Prevalencia de la EA en el mundo y en México.....	18
1.1.2. Progreso de la EA	19
1.1.3. Marcadores histopatológicos	20
1.1.4. Terapias farmacológicas	21
1.1.5. Funciones del péptido A β en intestino y cerebro	23
1.1.6. Papel antimicrobiano de A β	24
1.2. Infecciones e inflamación crónica en pacientes con EA.....	26
1.2.1. Infecciones relacionadas con el desarrollo de demencia	26
1.2.2. Activación de receptores tipo Toll (TLRs).....	27
1.2.3. Factores activadores de TLRs	28
1.3. Microbiota intestinal	28
1.3.1. Participación de la microbiota intestinal en la salud y en las enfermedades ..	31
1.3.2. Alteración de la MI e inflamación crónica de bajo grado	31
1.4. Factores bacterianos con efectos neurotóxicos	33
1.4.1. Lipopolisacáridos (LPS).....	33
1.4.2. Proteínas amiloideas bacterianas	34
1.4.3. Proteína curli y sus subunidades principales	35
1.4.4. Estructura y ensamblaje de la proteína curli por bacterias Gramnegativas	36
1.4.5. Interacción de la proteína curli con proteínas del huésped.....	37
2. Antecedentes	38
2.1. Disbiosis intestinal en pacientes con EA	38
2.2. Disbiosis intestinal en ratones APP/PS1	40
2.3. Bacterias productoras de proteínas amiloideas	41
2.3.1. Escherichia coli como principal productor de proteínas amiloideas	42

2.3.2.	La proteína curli como promotor de agregación proteica.....	44
2.4.	Proteína curli como activador de inflamación	45
3.	Justificación.....	48
4.	Hipótesis.....	48
5.	Objetivos	49
5.1.	Objetivo general.....	49
5.2.	Objetivos particulares	49
6.	Metodología	50
6.1.	Diagrama de trabajo.....	50
6.2.	Sujetos experimentales	51
6.2.1.	Determinación de genotipos	52
6.3.	Evaluación de parámetros cognitivos	53
6.3.1.	Laberinto elevado en forma de cruz	53
6.3.2.	Laberinto en forma de T	54
6.4.	Preparación de tejidos	55
6.5.	Identificación del gen csgA en heces, contenido intestinal y en ciego mediante PCR 56	
6.5.1.	Estandarización de PCR anidada y tiempo real.....	56
6.6.	Identificación de la proteína curli en tejido de ciego.....	63
6.7.	Cuantificación de TLR4 en ciego y cerebro	63
6.8.	Determinación por inmunofluorescencia de A β 1-42 y K99 (proteína del pili de E. coli) en cerebro	64
6.8.1.	Toma de imágenes de la inmunofluorescencia.....	65
6.8.2.	Presencia y cuantificación de A β 1-42 y K99	66
6.9.	Análisis estadístico	66
7.	Resultados	67
7.1.	Los ratones APP/PS1 presentan alteraciones en la conducta y en la memoria de trabajo	67
7.2.	El gen csgA está presente tanto en ratones TG como en WT	68
7.3.	La proteína curli se expresa en mayor cantidad en el ciego de ratones TG.....	71
7.4.	Marcador de inflamación en el intestino de ratones TG y WT	72
7.5.	Los ratones TG muestran un estado proinflamatorio a nivel cerebral	73
7.6.	En cerebros de ratones TG se observa una interacción de proteínas de bacterias productoras de curli con las placas A β	74

8.	Discusión.....	81
8.1.	Los ratones APP/PS1 de 8 meses son adecuados para el estudio de la EA relacionada con la MI.....	81
8.2.	Los ratones APP/PS1 expresan mayor cantidad de curli y activación de TLR4 en cerebro	82
8.3.	Posible función antimicrobiana del péptido AB ante la presencia de curli en cerebro de ratones TG.....	84
9.	Conclusión.....	86
10.	Perspectivas	86
11.	Referencias	87

Abreviaturas

5-THP	5-hidroxitriptofano
5XFAD	Modelo de 5 mutaciones asociadas a la Enfermedad de Alzheimer Familiar
AMP	Péptido antimicrobiano
APOE	Apopoliproteína E
APP	Proteína precursora amiloide
ARIA	Anomalías de imagen relacionada con amiloides
A β	Beta amiloide
BACE-1	Enzima β -secretasa
BHE	Barrera Hematoencefálica
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	Albúmina sérica bovina
CE	Células heterocromatinas
CsgA	Subunidad principal de curli
<i>csgA</i>	gen de CsgA
<i>csgDEFG</i> <i>csgBA</i>	y Operones de curli
C _T	Threshold cycle
DAMP	Patrón molecular derivado de células dañadas
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EA	Enfermedad de Alzheimer
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
EP	Enfermedad de Parkinson
EPM	Elevated plus maze
FDA	Food and Drug Administration
GF	Germen free
IFN-I	Interferón tipo I
IL	Interleucina
LB	Medio Luria-Bertani
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LL-37	Péptido pleiotrópico 37
MAL	MyD88 adapter-like
MBP-1	Proteína básica principal amiloidegénica 1
MCI	Mild cognitive impairment
MI	Microbiota intestinal
MPLA	Lípido monofosforilo asociado a macrófagos

NF-kB	Factor nuclear Kappa B
PAMP	Patrón asociado a patógenos
PBS	Solución salina amortiguadora por fosfatos
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehído
PrPC	Proteína priónica celular
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
PS1/2	Presenilina ½
PVP	Polivinilpirrolidona
qPCR	Quantitative PCR/ PCR tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribosomal
SCFA	Ácidos grasos de cadena corta
SNC	Sistema nervioso central
<i>Spp</i>	Especies
TG	Transgénico
TLRs	Receptores tipo Toll
TM	Temperature Melt
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRIF	Interferón- β
WB	Western Blot
WT	Wild type
α -Syn	α -sinucleína

Lista de figuras

Fig. 1 Tipos de EA según el estadio de la patología.....	19
Fig. 2 Proporción de la abundancia relativa de los principales filos bacterianos por secuenciación masiva del gen rRNA16S.....	29
Fig. 3 Ejemplos de especies del filo <i>Proteobacteria</i>	30
Fig. 4 Esquema de las subunidades de curli para el ensamblaje de la fibra.	37
Fig. 5 UFC/mL del contenido intestinal de ratones TG y WT en agar MacConkey.....	41
Fig. 6 Bacterias Gramnegativas productoras de amiloides en agar YESCA Rojo Congo. ..	42
Fig. 7 Clasificación de bacterias de acuerdo con la tinción en CHROMO-AGAR Orientation®.....	42
Fig. 8 UFC/ μ L de <i>E. coli</i> en colon y ciego de ratones TG y WT.....	43
Fig. 9 Diagrama general de la metodología.....	50
Fig. 10 Caracterización Fenotípica del modelo doble transgénico.....	51
Fig.11 PCR punto final para genotipificar ratones macho TG y WT.....	53
Fig. 12 Laberinto elevado en forma de cruz (EPM).....	54
Fig. 13 Laberinto en forma de T (T-Maze).....	55
Fig. 14. Gel representativo de PCR punto final de controles con ambos primers para <i>csGA</i>	57
Fig.15 Gel representativo de PCR punto final de contenido intestinal del ciego.....	58
Fig. 16 Gel representativo de PCR punto final de contenido intestinal de ciego incubado con EHEC.....	59
Fig. 17 Gel representativo de producto de PCR punto final de contenido intestinal de ciego incubado con diluciones 1:625 y 1:1125 de EHEC.....	59
Fig. 18 Geles representativos de PCR anidada de ciego de ratones inoculados con EHEC.....	60
Fig. 19 Gráfica de amplificación de qPCR.....	62
Fig. 20 Gráfica melt curve de amplificación de qPCR.....	62
Fig. 21 Control de Inmunofluorescencia de K99 y A β 1-42 en cerebro.	65
Fig. 22 Evaluación de la ansiedad mediante el Laberinto Elevado en Forma de Cruz (EPM).	67
Fig.23 Evaluación de la memoria de trabajo mediante el laberinto en forma de T (T-Maze).	68
Fig. 24 Gel representativo del producto de PCR punto final del contenido intestinal del ciego en los grupos experimentales.....	69
Fig. 25 Gel representativo del producto de PCR anidada de raspado del ciego.....	70

Fig. 26 Melt Curve de qPCR de muestras de raspado de ciego.	71
Fig.27 C _T de qPCR de muestras de raspado del ciego.	71
Fig. 28 Niveles de curli en ciego de ratones WT y TG.	72
Fig. 29 Niveles de TLR4 en ciego de ratones WT y TG.	73
Fig. 30 Niveles de TLR4 en muestras de cerebro de ratones WT y TG.	74
Fig. 31 Imagen representativa de la inmunofluorescencia de placas β-amiloideas en corteza de ratones WT y TG.	75
Fig. 32 Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de K99 (proteína del pili de <i>E. coli</i>) en rebanadas de hipocampo de ratones WT y TG.	75
Fig. 33 Inmunofluorescencia de K99 de <i>E. coli</i> y Aβ42 en hipocampo de los ratones WT y TG.	77
Fig. 34 Inmunofluorescencia de K99 de <i>E. coli</i> y Aβ42 en corteza cerebral de los ratones WT y TG.	78
Fig. 35 Porcentaje de colocalización y cercanía de K99 con las placas Aβ.	79
Fig. 36 Correlación entre la cercanía y la colocalización de K99 con el número de placas Aβ42 en hipocampo y en corteza.	79

Lista de tablas

Tabla 1. Medicamentos usados para el tratamiento de la EA.....	22
Tabla 2. Alteraciones en la microbiota en sujetos con MCI y EA.	32
Tabla 3. Alteraciones en la microbiota en ratones TG para la EA.	33
Tabla 4. Ejemplos de proteínas amiloides bacterianas y sus funciones.	35
Tabla 5. Ejemplos de proteínas con las que interacciona curli.....	38
Tabla 6. Protocolo de amplificación del gen <i>csgA</i>	56
Tabla 7. Diluciones de EHEC y su correspondiente cantidad de bacterias.	58
Tabla 8. Protocolo de amplificación de <i>csgA</i> por qPCR.	61

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad crónico-neurodegenerativa que genera demencia, y está asociada con la edad avanzada. Debido al aumento en la esperanza de vida de la población a nivel mundial, se pronostica que el Alzheimer tendrá un fuerte impacto en la calidad de vida de las personas mayores en los próximos años. A la fecha no existe ningún tratamiento o cura para esta enfermedad, por lo tanto, es de crucial importancia el entender mejor su etiología, para el mejor diseño de dianas terapéuticas eficaces para su tratamiento o prevención. Estudios clínicos recientes han reportado una fuerte asociación entre la composición de la microbiota intestinal y el desarrollo del Alzheimer, ya que se puede observar una disbiosis intestinal incluso desde etapas tempranas. Estos cambios a nivel intestinal también pueden desarrollarse en modelos transgénicos (TG) para el Alzheimer. Se ha observado una mayor abundancia de bacterias de perfil proinflamatorio, asociado con el ascenso de metabolitos bacterianos que interactúan con moléculas del cuerpo promoviendo alteraciones en el funcionamiento de diversas proteínas, y neuroinflamación. *Escherichia coli* presenta un tipo de proteínas de membrana denominada “curli”, considerada una proteína amiloidea funcional, que por una parte tiene la capacidad de unirse a diferentes receptores del sistema inmunitario y por otra, de promover la agregación proteica. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue establecer si la disbiosis intestinal presente en ratones TG pudiera relacionarse con una mayor abundancia de curli en intestino y en cerebro. Por medio de pruebas conductuales se evaluó la ansiedad y la pérdida de memoria a corto plazo de ratones TG y se comparó con sus pares control (WT). Se identificó la presencia del gen de la subunidad principal de curli (*csgA*) en el intestino de ambos grupos de ratones experimentales, pero la cantidad de curli fue mayor en ratones TG que en WT. Por otra parte, en el cerebro de ratones TG se observó un aumento en la expresión del receptor TLR4, posiblemente debido al incremento de placas A β , lo cual refleja un estado proinflamatorio. Por medio de inmunofluorescencia se observó la presencia del pili K99 de *E. coli* en corteza e hipocampo de los ratones TG, lo cual confirma la presencia de proteínas bacterianas en el cerebro. Además, en ratones TG la proteína K99 colocalizó con las placas A β , tanto en corteza como en hipocampo, pero la cantidad de K99 fue menor según la cercanía con las placas A β en el hipocampo, lo que se pudiera indicar un efecto antimicrobiano característico de los péptidos A β .

Estos hallazgos confirman la importancia del eje microbiota-intestino-cerebro en el desarrollo de la EA, ya que se propone una vía de diseminación de proteínas de los microorganismos hacia el cerebro. Por lo tanto, el modificar la microbiota intestinal y/o mermar la abundancia de bacterias productoras de curli pudiera ser un blanco terapéutico contra el desarrollo y /o el progreso de la EA.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a chronic neurodegenerative disease that causes dementia and is associated with advanced age. Due to the increase in the life expectancy of the population worldwide, it is that AD will have a strong impact on the quality of life of older people in the coming years. Nowadays, there is no treatment or cure for this disease; therefore, it is crucial to better understand its etiology, for the best design of effective therapeutic targets for its treatment or prevention. Recent clinical studies have reported a strong association between the composition of the intestinal microbiota and the development of AD; intestinal dysbiosis could do even from the initial stages. These intestinal changes may also develop in transgenic (TG) models for AD. A greater abundance with a bacteria of proinflammatory profile has been observed, associated with the rise of bacterial metabolites that interact with molecules of the body, promoting alterations in the functioning of proteins and neuroinflammation. *E. coli* has a membrane protein called "curli", considered a functional amyloid protein, which can bind to different receptors of the immune system and others, to promote protein aggregation. Therefore, the objective of this project was to establish whether intestinal dysbiosis present in TG mice could be related to a greater abundance of curli in the intestine and the brain. Behavioral tests evaluated anxiety and short-term memory loss in TG mice and compared them with their control peers (WT). The presence of the gene of the main curli subunit (*csgA*) was detected in the intestine of both groups of experimental mice, but the amount of curli was greater in TG mice than in WT. On the other hand, the brain of TG mice had an increase in the expression of the TLR4 receptor, due to the increase of A β plaques, which reflects a proinflammatory state. Immunofluorescence showed the presence of *E. coli* pili K99 in the cortex and hippocampus of TG mice, which confirms the presence of bacterial proteins in the brain. In addition, in TG mice the K99 protein was with the A β plaques, both in the cortex and hippocampus, but the amount of K99 was lower according to the proximity with the A β plaques in the hippocampus, which could indicate a characteristic antimicrobial effect of the A β peptides.

These findings confirm the importance of the microbiota-gut-brain axis in the development of AD since a route of dissemination of proteins from microorganisms to the brain is proposed. Therefore, modifying the gut microbiota and/or reducing the abundance of curli could be a therapeutic target against the development and/or progress of AD.

1. Introducción

La población mexicana mayor de 60 años representa el 12% de la población total (INEGI, 2020) y se estima que para el 2050 esta proporción se duplicará (González et al., 2016). Las personas viven más tiempo, pero no necesariamente con buena salud (Parra et al., 2020). La edad es el principal factor de riesgo de diversas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas, la enfermedad de Alzheimer (EA).

Si bien el envejecimiento se ha posicionado cada vez más dentro de la agenda de Salud Pública en las últimas dos décadas (Asociación Mexicana de Alzheimer y Enfermedades Similares, 2010), actualmente no hay políticas o programas gubernamentales específicos para tratarlas. Por lo que es prioritario poder entender y estudiar el origen de las demencias, y ofrecer tratamientos efectivos para poder prevenirlas, con el fin de disminuir el número de casos de demencia en adultos mayores.

1.1. Enfermedad de Alzheimer (EA)

La EA es el tipo de demencia más común en la vejez, la cual inicia con el daño en las neuronas que regulan la memoria, el pensamiento y el lenguaje. Esta enfermedad puede empezar a desarrollarse en el cerebro décadas antes de que los síntomas clínicos puedan ser evidentes (Jack et al., 2011). Los síntomas tempranos de la enfermedad incluyen: dificultad para recordar conversaciones, apatía y depresión. Los síntomas posteriores incluyen problemas de comunicación, desorientación, confusión, pérdida de juicio, cambios de comportamiento e incluso dificultad para hablar, tragar y caminar. La EA es una enfermedad silenciosa y progresiva y actualmente no existen tratamientos efectivos que logren prevenir o curar eficazmente el deterioro cognitivo (Cummings et al., 2020).

La gran mayoría de las personas (92-95 % de los casos) desarrollan la EA a partir de los 65 años, la cual es clasificada como EA de forma esporádica y se considera que es de inicio tardío. Existe también la EA tipo familiar, provocada por mutaciones genéticas, pero solo se presenta en un 5-8 % de los casos (Cheignon et al., 2018). Las proteínas mutadas que promueven la EA familiar son: el gen de la proteína precursora amiloide (APP), el gen de la presenilina 1 (PS1) y el gen de presenilina 2 (PS2) (Piaceri & Nacmias, 2013; Korolev, 2014; Tellechea et al., 2018).

La EA como otras enfermedades crónicas, se desarrolla como resultado de múltiples factores (Crous-Bou et al., 2017). Dentro de los factores que aumentan el riesgo de desarrollar la EA espontánea, están los no modificables y los modificables. En los primeros se encuentran: la edad (personas mayores de 65 años), el polimorfismo $\epsilon 4$ en la apolipoproteína E (APOE $\epsilon 4$) (Hebert et al., 2010), y una historia familiar de EA (Green et al., 2002). Los factores modificables abarcan situaciones de la vida diaria, como una poca actividad física (Ogino et al., 2019), alteraciones en la presión arterial (Samieri et al., 2018), el tabaquismo (Anstey et al., 2007), diabetes (Wu et al., 2008), obesidad (Hunt et al., 2007; Rönnemaa et al., 2011), bajo grado escolar (Livingston et al., 2020), poca interacción social (Livingston et al., 2020), y el tipo de dieta (Barberger-Gateau et al., 2007).

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2019) y un informe de la National Academy of Medicine (The National Academies Press, 2015) señalan que el abordar estos factores de riesgo pueden reducir efectivamente la probabilidad de desarrollar demencias. Es así que recomendaciones de la comisión de Lancet en 2020, sugieren que abordar los factores de riesgo modificables podría prevenir o retrasar hasta el 40% de los casos de demencia. Estas cifras aumentan a 56% en Latinoamérica, debido a la alta prevalencia de enfermedades metabólicas en la población (ej. diabetes y obesidad) (Parra et al., 2020).

Por otra parte, se ha señalado una fuerte asociación entre infecciones sistémicas y el desarrollo de demencias y EA (Lefebvre et al., 2016), ya que el número de infecciones a lo largo de la vida puede aumentar la vulnerabilidad de desarrollar demencias en edades avanzadas (Shaw et al., 2013).

1.1.1. Prevalencia de la EA en el mundo y en México

La EA y las demencias similares se han convertido en el tercer problema de salud pública en los países desarrollados, superado únicamente por enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Asociación Mexicana de Alzheimer y Enfermedades Similares, 2018). La EA representa un estimado de 60-80% de los casos de demencias.

Hay más de 10 millones de casos nuevos de demencia cada año en todo el mundo, lo que implica un caso nuevo cada 3.2 segundos (Alzheimer's Disease International). En 2020 se

registró que más de 55 millones de personas en el mundo viven con demencia. Esta cifra se duplicará cada 20 años, llegando a 78 millones en 2030 y 139-152 millones en 2050 (Alzheimer's Disease International, World Alzheimer Report 2018).

En México ha aumentado rápidamente la población envejecida. En 2020, el 12% de la población total tenía 60 años o más (INEGI, 2020), de este grupo 57% tenían entre 60-69 años, 29% tenían 70-79 años y 14% era de 80 años en adelante (ENASEM 2020). El porcentaje de personas con EA aumenta drásticamente con la edad: 5,0% de las personas de 65 a 74 años, el 13,1% de las personas de 75 a 84 años y el 33,2% de las personas de 85 años o más. En México existen más de 800,000 personas afectadas por la EA y anualmente mueren 2,030 pacientes a causa de la EA (INNN, 2017).

1.1.2. Progreso de la EA

Existen cambios cerebrales progresivos que son imperceptibles en los sujetos con la EA. En esta progresión, existen tres fases: EA preclínica (sin síntomas), deterioro cognitivo leve (MCI) debido a la EA, y demencia por la EA (síntomas graves) (Sperling et al., 2011). La demencia por la EA se divide en tres fases: demencia leve, moderada y severa (Fig1).

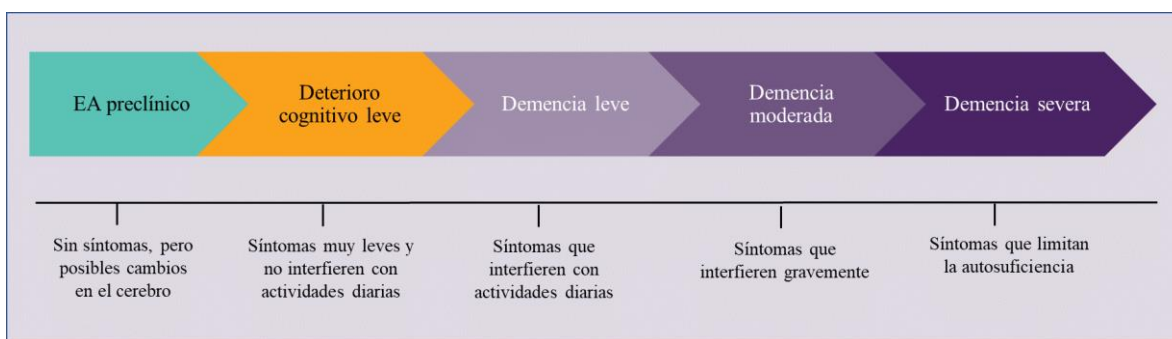


Fig. 1 Tipos de EA según el estadio de la patología.

Modificado de Alzheimer's Association. 2022 Alzheimer's Disease Facts and Figures.

En la etapa preclínica de la EA, aunque los síntomas aún no son evidentes, pueden detectarse niveles anormales de placas del péptido amiloide beta ($A\beta$) por tomografía de emisión de positrones, cambios en la proteína tau (en fluido cerebrospinal y en plasma) y disminución del metabolismo de la glucosa (Hunt et al., 2007; Sperling et al., 2020).

Para el diagnóstico del MCI, se utilizan biomarcadores de la etapa preclínica, más la detección de síntomas neuropsicológicos, como problemas en la memoria, el lenguaje y el pensamiento, que pueden ser solo detectables por personas cercanas. Estos síntomas ocurren porque el daño y muerte de neuronas no puede ser compensado (Ward et al., 2013; Petersen et al., 2018).

En la demencia por EA, el daño en el cerebro y la muerte neuronal genera síntomas más evidentes. Los síntomas van de leves a moderados y varían de persona en persona. La fase leve de la EA, se caracteriza por la aparición de cambios menores en la personalidad, el habla se deteriora ligeramente, la memoria a corto plazo se desvanece, dificultando aprender cosas nuevas, y la respuesta emocional es impredecible y exagerada. En la fase moderada, el paciente necesita supervisión y la toma de decisiones se ve afectada, el deterioro de la memoria es evidente, el ciclo de sueño se interrumpe y suelen surgir problemas de coordinación, ritmo y deambulación. En la fase grave, el paciente necesita ayuda para actividades básicas como comer o bañarse, sufren de confusión aguda, alucinaciones, delirios, paranoia, rigidez física y sólo conserva fracciones de su memoria (Baumgart et al., 2015). Si bien la EA comienza en la etapa preclínica y termina en EA grave, el tiempo de desarrollo está influenciado por la edad, genética y la dieta, entre otros factores (Sperling et al., 2020). Para el diagnóstico clínico y certero de la EA se requiere corroborar la presencia de biomarcadores en el tejido cerebral.

1.1.3. Marcadores histopatológicos

Las características morfológicas más importantes de la EA son: la acumulación de la proteína A β que llega a formar placas extracelulares; la hiperfosforilación y agregación de la proteína tau que forma hebras intracelulares y marañas neurofibrilares; y la neuroinflamación, que provocan pérdida de conexiones sinápticas, muerte neuronal y daño al tejido cerebral (atrofia). Las placas y oligómeros de A β dañan a las neuronas al interferir en la comunicación neuronal. Las marañas neurofibrilares de tau bloquean el transporte de nutrientes y a moléculas importantes para la función normal y la supervivencia de las neuronas.

Los péptidos A β se originan a partir de la Proteína Precursora Amiloide (APP, por sus siglas en inglés). Esta proteína de membrana se encuentra en diferentes tipos celulares, incluidas las neuronas. De manera fisiológica la APP es escindida por las enzimas alfa (α) y gamma

(γ) secretasa formando el fragmento sAPP α , que interviene en la excitabilidad neuronal, la plasticidad sináptica y resistencia al estrés oxidativo (Sochocka et al., 2018). Sin embargo, cuando la APP es metabolizada por la vía amiloidogénica mediante la enzima β -secretasa (BACE-1) y la γ -secretasa, resultan dos fragmentos, el sAPP β y A β 1-40 / 1-42, siendo el péptido A β 1-42 el más neurotóxico. El péptido A β se oligomeriza y se acumula formando las placas seniles cerebrales (Haass et al., 2012; Armstrong et al., 2014).

La neuroinflamación juega un papel central en la EA (Heppner et al., 2016; Sala Frigerio et al., 2019), pues se ha observado que hay un incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias como interleucina (IL)-1 β e IL6 (Sierra et al., 2007); por el contrario, las citocinas antiinflamatorias como la IL10, IL4 y el factor transformador del crecimiento beta (TGF- β) disminuyen (Maher et al., 2005; Yu & Johnson, 2001). La respuesta inflamatoria en el cerebro con EA, es consecuencia del daño a las neuronas por las placas A β y marañas neurofibrilares, principalmente. Los responsables del aumento de las citocinas proinflamatorias son las células gliales como los oligodendrocitos (encargados de formar y mantener la mielina), la microglía (involucrados en la fagocitosis y la reparación celular) y los astrocitos (regulan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), dan soporte a neuronas y favorecen los impulsos nerviosos) (Tortora, 2006). Cuando hay daño cerebral, tanto los astrocitos, como la microglía sufren un proceso de activación para contrarrestar las alteraciones (Onyango 2021).

1.1.4. Terapias farmacológicas

Dentro de los medicamentos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) y la agencia Europea de Medicamentos (EMA) para el tratamiento de la EA (Tabla 1) están: donepezil, rivastigmina, galantamina, memantina y memantina combinados con donepezil.

Tabla 1. Medicamentos usados para el tratamiento de la EA.

TERAPIAS FARMACOLOGICAS			
Mecanismo de acción	Fármaco	Efecto	Efectos adversos
Inhibidor de la acetilcolinesterasa	Donepezil, rivastigmina, galantamina	Mejora la cognición. Eficacia modesta y temporal.	Alteraciones gastrointestinales y cardiovasculares (Tayeb et al., 2012).
Modulador de receptores NMDA	Memantina	Mejorar la capacidad para pensar y recordar.	Trastornos cardiacos, gastrointestinales, respiratorios y agitación (Allegrì, 2011).
Anticuerpos monoclonales	Aducanumab	Reduce los niveles cerebrales de A β .	Hinchazón cerebral (ARIA-E) o hemorragia (ARIA-H) (Salloway et al., 2022).

Los fármacos donepezilo, rivastigmina y galantamina, inhiben a la acetilcolinesterasa, aumentando la disponibilidad de la acetilcolina en el cerebro, La galantamina también funciona como agonista nicotínico presináptico y la rivastigmina inhibe la butirilcolinesterasa (hidroliza la colina). La eficacia es dependiente de la dosis y debe tenerse precaución en el tratamiento de pacientes predispuestos a enfermedades gastrointestinales (Birks, 2006).

La memantina es un modulador de la transmisión glutamatérgica, siendo agonista del receptor N-metil D-aspartato de manera que aumenta las concentraciones de glutamato sináptico mejorando los procesos cognitivos (Allegrì, 2011).

Estos fármacos sólo muestran una eficacia temporal para disminuir las alteraciones conductuales, pero no reparan los daños al cerebro. Estos 5 medicamentos pueden causar efectos secundarios leves como dolor de cabeza y náuseas. Existe otro medicamento aprobado por la FDA en 2021, el aducanumab, que es una anticuerpo monoclonal específico para las fibras y oligómeros solubles de A β , siendo el primer medicamento capaz de modular el curso de la enfermedad al disolver o prevenir la formación de agregados amiloides. El aducanumab se ha estudiado en personas con MCI en las cuales promueve la reducción de las placas A β en el cerebro (Schneider, 2020), pero el efecto a nivel cognitivo es muy limitado

o nulo (Dal-Rè, Lòpez & Ayuso, 2017). No hay datos sobre su eficacia en etapas más severas de la enfermedad (Cummings, 2021). El uso de aducanumab puede generar una condición seria llamada anomalías de imagen relacionada con amiloides (ARIA), que es un indicador de inflamación cerebral (Sperling et al., 2011). Este medicamento fue aprobado por un comité *ad hoc* de la FDA a través de la vía de aprobación acelerada, es decir que, la importancia de la enfermedad permite que los pacientes tengan acceso temprano al medicamento, aún sin pruebas de eficacia, pero sino se mantiene el beneficio clínico puede retirarse la aprobación.

Existen tratamientos no farmacológicos para la EA, que se enfocan en mantener o mejorar la función cognitiva y disminuir los daños neuronales, por medio de estimulaciones cognitivas, terapias basadas en artes y/o tratamiento psicológicos. Este tipo de intervenciones plantean un daño menor que las farmacológicas (Watt et al., 2019). Por otra parte, se ha reportado que la dieta puede tener un fuerte impacto en la función cognitiva (Stadlbauer et al., 2020), ya que la ingesta de dietas con alto contenido de verduras, frutas, granos integrales, pescado, pollo, legumbre y semillas, limitando grasas saturadas, carne roja y el azúcar; como la dieta Mediterránea, DASH o la Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay, que promueven una mejor función cognitiva y una menor tasa de demencia y atrofia cerebral (Martínez-Gonzales et al., 2019; Walker et al., 2021).

1.1.5. Funciones del péptido A β en intestino y cerebro

Los depósitos de A β característicos de la EA fueron inicialmente descritos en tejido cerebral, pero años recientes se ha demostrado su presencia en tejidos periféricos. Se han encontrado depósitos de A β en la piel, algunos músculos, en el corazón, en la retina e incluso en los intestinos (Joachim et al., 1898; Goldstein et al., 2003; Tublin et al., 2019).

La generación excesiva de A β en los tejidos resulta en su agregación y acumulación. Se ha asociado que la generación de A β depende del estado inmune en el que está el paciente, pues cuando se encuentra cursando una infección se activa la liberación sistémica de A β , como protección contra múltiples ataques; sin embargo, a largo plazo la producción excesiva de A β provoca su acumulación y puede convertirse en un causante del daño tisular (Inuyushin et al., 2017; 2019). La respuesta de A β en pacientes con infecciones propone que el péptido

A β tiene un papel importante en el sistema inmune, como péptido antimicrobiano (AMP) de amplio espectro.

Las tres familias principales de AMPs en mamíferos son las defensinas, la histatina y las catelicidinas. Solo un miembro de la familia de las catelicidinas ha sido identificado en humanos, es el péptido LL-37 (Gudmundsson et al., 1996). El péptido pleiotrópico LL-37 es un AMP arquetípico (Zanetti, 2004) ampliamente expresado en células epiteliales del tracto gastrointestinal, genitourinario, en el árbol bronquial, en la piel y en los neutrófilos, pero en este último en forma de propéptido (Gökçınar et al., 2018). El homólogo LL-37 (CRAMP) desempeña un papel central en contra de las infecciones bacterianas en diversos tejidos, incluido el sistema nervioso central (SNC) (Bergman et al., 2006).

Se ha descrito que los péptidos A β tiene una fuerte actividad antibiótica contra bacterias Gramnegativas y Grampositivas, así como contra hongos y virus (Bourgade et al., 2014; White et al., 2014).

En humanos cognitivamente sanos, el A β está presente en el cerebro a lo largo de la vida y los intentos de disminuir A β a menudo traen consecuencias negativas. En ratas se ha demostrado que el tratamiento con inhibidores de secretasa (BACE-1) termina en pérdida de viabilidad celular; mientras que incubar con A β 1-40 ofrece efectos protectores significativos manteniendo a las células viables (Plant et al., 2003). Además, en un estudio de delección de BACE-1 en las neuronas, se demostró que es necesaria la presencia de BACE para la supervivencia glial (Bolkan, Triphan & Kretzschmar, 2012).

1.1.6. Papel antimicrobiano de A β

La agregación de A β para formar placas insolubles en la EA ha dejado a este péptido como un marcador de daño sin función fisiológica benéfica. Sin embargo, los péptidos amiloides cumplen diferentes funciones como: ligandos para diferentes receptores y moléculas (Le et al., 2001; Koldamova, Lefterov, & Lazo, 2001; Maezawa et al., 2004); moduladores de respuesta a factores estresantes; inducción de respuestas proinflamatoria (Paris et al., 1999; Lee et al., 2002); adhesión celular y el movimiento de eritrocitos (Jacob et al., 2016). A pesar

de estas diversas funciones, aún no se conoce con exactitud la función principal del A β a nivel cerebral.

Robinson y cols. fueron los primeros en proponer el A β como parte del sistema inmune debido a su capacidad de agregación, ya que podría utilizarse para rodear y secuestrar agentes infecciosos, limitando su propagación y preparándolos para la fagocitosis (Robinson & Bishop, 2002). *In vivo*, se observó que el A β actúa como agente protector, ya que en ratones quintuples transgénicos para la EA (5XFAD) y sus pares silvestres (WT) (sin ninguna alteración) infectados con *Salmonella typhimurium* en la corteza cerebral, se observó que los ratones 5XFAD sobreviven un mayor tiempo que los WT (Kumar et al., 2016). Dadas las características antes mencionadas se ha considerado que el péptido A β forma parte de los AMP o también llamados péptidos de defensa del huésped, los cuales forman parte de la respuesta inmune innata.

También, existen otros tipos de amiloides humanos que participan en la formación de matrices de proteínas (Carneiro et al., 2016), un ejemplo es la proteína básica principal amiloidegénica 1 (MBP-1) en los glóbulos blancos, que ayuda a combatir patógenos (Soragni et al., 2015).

Diferentes AMPs tienen la estructura amiloide característica de láminas β , esta estructura les permite insertarse espontáneamente en las membranas para agregar a proteínas de bacterias (Kumar et al., 2016) o para unirse a las glicoproteínas del virus (Eimer et al., 2018). También pueden formar canales grandes y débilmente selectivos en las membranas ocasionando la muerte del patógeno (Kagan et al., 1990; 2012). Algunos ejemplos de AMP son: longipin producido por el arácnido *Acutisoma longipes* (Sayegh et al., 2016) o microcín E492 por la bacteria *Klebsiella pneumoniae* (De Lorenzo et al., 1984).

Soscia y cols. analizaron directamente la función de A β como AMP, especificando la concentración mínima inhibitoria para detener el crecimiento de diferentes microorganismos incubando con los péptidos A β 1-40, A β 1-42 y con LL37 (un AMP humano) (Soscia et al., 2010). En 2016, se confirmó A β como AMP con la incubación de A β 1-42 en cuatro cepas bacterianas, donde se observó la aglutinación de A β en la superficie microbiana (Spitzer et al., 2016). Es así que el amplio espectro de A β puede funcionar como modelo para el

desarrollo de nuevos antibióticos (Kumar et al., 2016). Sin embargo, la relevancia biológica de las actividades protectoras *in vitro* de A β requieren validación *in vivo*.

1.2. Infecciones e inflamación crónica en pacientes con EA

1.2.1. Infecciones relacionadas con el desarrollo de demencia

Inevitablemente en el envejecimiento se presenta la inmunosenescencia, donde la integridad del sistema inmune se ve comprometido por el deterioro generalizado en el cuerpo, lo que incrementa la susceptibilidad a infecciones y a otras enfermedades (Atienza et al., 2018). Por lo tanto, un sujeto inmunosenescente se encuentra en un ambiente inflamatorio crónico de bajo grado (Shaw et al., 2013). Este estadio, se caracteriza por una mayor producción de citocinas proinflamatorias como IL-1, factor de necrosis tumoral (TNF), especies reactivas de oxígeno y niveles elevados de proteína C reactiva, pero con una disminución de citocinas antiinflamatorias como IL-10 (Franceschi et al., 2000).

El estado inflamatorio crónico en los individuos de edad avanzada suele estar asociado con infecciones microbianas crónicas, que pueden llegar a ser un factor de deterioro cognitivo y de demencia en adultos mayores (Fulop et al., 2018a). Se han propuestos algunos posibles patógenos relacionados con demencia como: el virus del herpes simple tipo 1 y 2 (VHS-1 y VHS-2), el virus del herpes humano (VHH-4), bacterias intestinales (como *Helicobacter pylori*), periodontales (como *Pseudomona gingivalis*), espiroquetas (como *Borrelia burgdorferi*), entre otras bacterias (Fulop et al., 2018b). Estos patógenos pueden invadir el SNC a través del nervio trigémino, el nervio olfativo, el tracto gastrointestinal y por la BHE, y pasar de inflamación periférica a inflamación central por circulación sanguínea hacia el cerebro (Dando et al., 2014).

La EA también es considerada una enfermedad de inflamación crónica, que no está limitada al cerebro, sino que también afecta tejidos periféricos y se considera parte de la respuesta inflamatoria sistémica (Schwartz & Deczkowska, 2016).

Los hallazgos entre la relación de EA e infecciones han dado paso a la búsqueda de DNA microbiano en el cerebro (Robinson & Bishop, 2002) infiriendo que la agregación de A β podría considerarse una respuesta ante la presencia de agentes infecciosos. Wozniak y cols.

detectaron DNA del VHS-1 en placas amiloides de pacientes con EA, fortaleciendo la idea de que la EA puede ser el resultado de la acumulación de A β inducida por una infección y como consecuencia de la reducción del aclaramiento de A β (Wozniak, Mee & Itzhaki, 2009). Por otra parte, el grupo de Miklossy encontró que las placas A β colocalizaban con antígenos para la detección de *Borrelia burgdorferi* en pacientes con EA infectados con las espiroquetas (Mikolssy et al., 2016). En ratones transgénicos para la EA inoculados vía oral con *Porphyromonas gingivalis*, se detectaron niveles significativamente mayores de lipopolisacáridos (LPS) en el cerebro y un aumento en la cantidad de placas A β en el hipocampo, con concentraciones altas de A β 1-40 y A β 1-42 en hipocampo y corteza (Ishida et al., 2017). En resumen, las infecciones bacterianas y virales están relacionadas con mayores tasas de producción y agregación de A β , por la vía amiloidegénica, en respuesta a los patógenos.

1.2.2. Activación de receptores tipo Toll (TLRs)

La respuesta innata del sistema inmunológico es la primera línea de defensa que ofrece protección al cuerpo, por ejemplo, contra infecciones. Esta respuesta comienza mediante la activación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), siendo los más importantes los TLRs, capaces de reconocer patrones asociados a patógenos (PAMPs) así como patrones moleculares derivados de células dañadas (DAMPs). Estos receptores además de expresarse en células de la respuesta innata, células epiteliales y endoteliales, se encuentran en el SNC (Carty & Bowie, 2011). Existen varios tipos de TLR (TLR 1-10), todos poseen una estructura altamente conservada necesaria para la transducción de señales río abajo (Rock et al., 1998). Los TLR forman dímeros y tienen un repertorio de combinaciones para reconocer un amplio espectro de estímulos (Underhill, 2007). Las neuronas, la microglía (macrófago residente del cerebro) y los astrocitos expresan una amplia gama de TLR mientras que los oligodendrocitos solo expresan TLR2 y TLR3 (Lafon et al., 2006). A excepción de TLR3, todos los TLRs promueven la activación del factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), induciendo la activación del factor nuclear Kappa B (NF- κ B) (Takeda & Akira, 2004). La vía TLR3 requiere del interferón- β (TRIF). Otra molécula importante para la señalización dependiente de MyD88 es la proteína adaptadora que contiene el dominio

TIR (TIRAP), también conocida como MyD88 adapter-like (MAL), reclutada para activar TLR2 o TLR4 (Gambuzza et al., 2014). Las respuestas de TLR pueden amplificarse cuando células inmunes y tisulares cooperan para mediar el estado de inflamación (Akira, 2009).

1.2.3. Factores activadores de TLRs

Los TLR2 y TLR4 están implicados en la fagocitosis microglial de péptidos A β y en las respuestas provocadas por los mismos (Landreth & Geaghan, 2009; Richard, Filali & Rivest, 2008). Se ha descrito que A β promueve la activación proinflamatoria en la microglía mediante el heterodímero de TLR4/6, reclutado por CD36 (Sterwart et al., 2010).

Entre los agonistas más comunes para TLR2 están las lipoproteínas bacterianas, tal como SMP-105 de *Mycobacterium bovis* (Simon & O'Donnell, 2008); de igual manera, los metabolitos bacterianos que activan a TLR4 son el MPLA (lípidos monofosforilo asociado a macrófagos) producido por *Salmonella minnesota* (Mata et al., 2007) y las fimbrias o pilis (proteínas que permiten la adherencia) de *Escherichia coli* (Frendèus et al., 2001).

Además de los TLRs, otros PRRs como los NLRs cumplen un papel importante a nivel citosólico, pues reconocen a una variedad de patógenos microbianos y productos biológicos inmunogénicos, algunos ejemplos son NLRP1, NLRP3, NLRC4 y PNIP (Bernier, 2012).

1.3. Microbiota intestinal

En los últimos años el estudio del sistema inmune y su relación a la microbiota ha mostrado gran relevancia en la relación con enfermedades inicialmente no asociadas con microorganismos patógenos (Kolthoff, 2019). El intestino es el sitio que alberga la mayor parte de microorganismos en el cuerpo humano, debido a su gran superficie (250-400 m²). La microbiota intestinal (MI) de manera normal se encuentra en simbiosis con el hospedero. La MI varía a lo largo de la vida y se ve afectada por el estilo de vida, la dieta y por el tratamiento de antibióticos. El perfil microbiológico intestinal de cada persona es diferente, pero la abundancia relativa y la distribución de los filos bacterianos en el intestino son similares en individuos sanos de edades similares.

A pesar de que cada especie tiene diferencias en la MI, los modelos murinos han sido ampliamente utilizados para estudiar el impacto de la MI en enfermedades humanas. Se ha demostrado con el gen rRNA 16S que los filos más representativos de la MI en humanos sanos son: *Firmicutes* 65-75%, *Bacteroidetes* 25-13%, *Proteobacteria* 5%, *Actinobacteria* 3-4%, *Verrucomicrobia* 1% y otros 1% (Falony et al., 2016; Radjabzadeh et al., 2020). Por otro lado, en ratones sanos la abundancia relativa de los filos es: *Firmicutes* 30-70%, *Bacteroidetes* 10-40%, *Proteobacteria* 1-15%, *Actinobacteria*, *Tenericutes* y *Verrucomicrobia* 0.1-0.5% (Benson et al., 2010). Se ha comprobado que la MI de ratones y humanos se puede comparar pues se conservan las proporciones de los filos más abundantes (Fig. 2). En un análisis hecho por Nielsen y su equipo, se demostró que los ratones y los humanos compartían el 89% de los géneros bacterianos y solamente detectaron un género único para los ratones, llamado *Mucispirillum* (Lukasz et al., 2013). En resumen, la MI de ratones y humanos es cuantitativamente diferente en abundancia de filos y especies específicas, pero comparten una gran similitud en las proporciones.

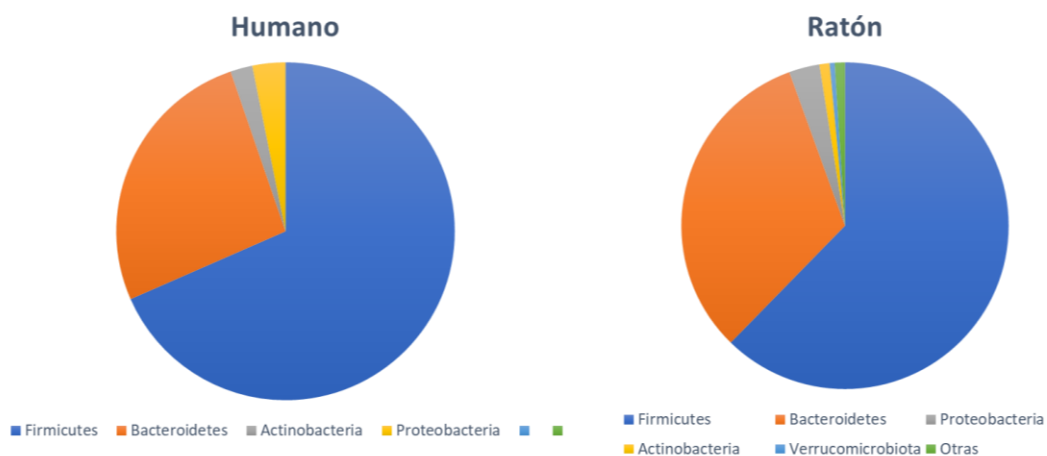


Fig. 2 Proporción de la abundancia relativa de los principales filos bacterianos por secuenciación masiva del gen rRNA16S.

Los filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacterias* son los más abundantes en la MI de humanos y ratones. Modificado de Reynoso et al., 2016.

El filo *Proteobacteria* es de principal interés pues la mayoría de los géneros pertenecientes son tipo proinflamatorias y conforman el cuarto filo predominante en los seres humanos y en los ratones. Este filo se caracteriza por tener bacterias Gramnegativas (Fig. 3) como principales causantes de enfermedades comunes, por ejemplo: *Helicobacter*, *Shigella*,

Salmonella, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Brucella*, etc. La patogenicidad de estas bacterias está dada por una maquinaria que permite la colonización, la multiplicación y producción de toxinas en el cuerpo; en la mayoría de las bacterias la adhesión al intestino está dado por la presencia de celulosa y fimbrias o pilis. Un ejemplo de estructura que facilita el proceso de adhesión es el pili K99, que es un conjunto filamentosos de proteínas que residen en el exterior de la pared celular bacteriana (Isaacson, 1977; Jay et al., 2004).

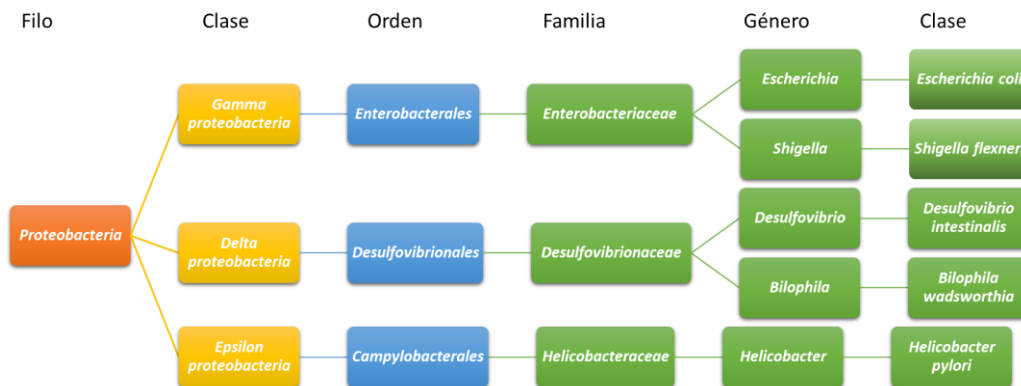


Fig. 3 Ejemplos de especies del filo *Proteobacteria*.

Modificado de Rinninella et al., 2019.

La MI y el huésped se separan por la barrera intestinal, esta es una capa mucosa microporosa compuesta por proteoglicanos, que desempeña la función crítica de mediar la interacción entre bacterias y el huésped, regulando el crecimiento bacteriano y previniendo la agregación bacteriana, además de mediar selectivamente el paso de sustancias y absorber nutrientes (Diao et al., 2019). Si existen defectos en la capa mucosa por desregulación de mucinas, se pueden tener consecuencias graves como comprometer la función de la barrera intestinal y causar inflamación crónica por la invasión bacteriana al epitelio (Duraj-Thatte et al., 2018). Con la edad, la MI también pueden variar debido a la inmunosenescencia y tornarse proinflamatoria (Licastro et al., 2018).

1.3.1. Participación de la microbiota intestinal en la salud y en las enfermedades

En la actualidad, se le ha dado gran importancia a la MI ya que se ha relacionado con la modulación del sistema inmunitario, metabólico y hormonal. Por lo tanto, se ha investigado el papel que juega la MI en diferentes enfermedades, como en la EA, donde parece que la conexión entre el intestino y cerebro influye más de lo reportado anteriormente. Aunque no está claro cómo está dada la interacción entre la MI y la EA, se sabe que el eje microbiota-intestino-cerebro, permite una comunicación bidireccional entre estos dos órganos a través de diferentes vías como: el nervio vago, la vía endocrina (por producción de ácidos cortos de cadena corta, neurotransmisores u hormonas) o la vía inmunitaria (mediante la producción de citocinas). Por cualquiera de estas vías, si el organismo está en disbiosis pueden originarse cambios funcionales en el cerebro (Vogt et al., 2017; Gómez et al., 2019).

En condiciones fisiológicas, la MI regula la secreción de moco y mejora la integridad de la barrera intestinal produciendo ácidos grasos de cadena corta, activando linfocitos Th17, produciendo IL-22 como defensa del huésped y por medio de interleucinas que promueven la expresión de péptidos antimicrobianos por parte de las células epiteliales (Man, Gicheva & Nicoletti, 2014). Pero esta situación suele cambiar en estados patológicos como veremos más adelante.

1.3.2. Alteración de la MI e inflamación crónica de bajo grado

La MI también se ha relacionado con enfermedades metabólicas, autismo, depresión, la Enfermedad de Parkinson (EP) y la EA (Mohajeri et al., 2018). Barret y cols. (2011) obtuvieron resultados que sugieren que la MI puede influir en trastornos cerebrales como ansiedad, autismo y demencias. Es así como la MI puede afectar directamente la salud humana al segregar componentes microbianos como vitaminas, aminoácidos esenciales y lípidos (Diaz et al., 2018). Algunas bacterias gastrointestinales son capaces de metabolizar glutamato para producir ácido gamma aminobutírico (GABA) (Barrett et al., 2012), neurotransmisor que modula procesos de comunicación en el cerebro. Los niveles de GABA y el factor neurotrófico derivado del cerebro se han relacionado con alteraciones en los

perfiles de MI caracterizado en el desarrollo de ansiedad (Murphy et al., 2010; Bravo et al., 2011).

Como sea ha mencionado en los factores modificables para la EA, los factores que inician el proceso neurodegenerativo no están claros, pero recientemente la MI ha sido postulada como posible factor, ya que la hipótesis etiológica de la EA incluye infecciones con bacterias, virus, hongos y parásitos (Harri & Harris, 2015; Maheshwari & Eslick, 2015). En un modelo de ratón transgénico para la EA, se demostró que la diversidad de la MI regula la inmunidad innata del huésped y que podría estar relacionada con la amiloidosis (Minter et al., 2016). Además, se observó que ratones con EA acondicionados a un entorno libre de gérmenes desarrollan menor número de placas A β (Harach et al., 2015).

A continuación, se presenta un tabla comparativa (Tabla 2) de los principales resultados de la investigación de la MI en pacientes con la EA y en ratones transgénicos para la EA.

Tabla 2. Alteraciones en la microbiota en sujetos con MCI y EA.

Modificado de Morales et al, 2023, p. 45.

Cambios en microbiota en pacientes con MCI y AD	Cattaneo et al 2017	Vogt et al 2018	Zhuang et al 2017	Li et al 2019	Liu et al 2019	Saji, Nilda et al 2019	Saji, Murotani et al 2019 (MCI)	Haran et al 2019	Nagpal et al (MCI) 2019	Stadlbauer et al 2020	Wu et al 2021	Ling et al 2021	CONSENSO
Actinobacteria (F)		↓	↑									↑	↑
<i>Bifidobacterium (g)</i>		↓		↑		↑						↑	↑↑
Bacteroidetes (F)		↑	↓		↑MCI ↓AD	↓	↑		↓				↓
<i>Bacteroides (g)</i>		↑		↓		↓	↑	↑			↑MCI		↑↑
Firmicutes (F)		↓	=		↓				↑			↓	↓↓
<i>Clostridiaceae (f)</i>		↓	↓		↓							↓	↓↓
<i>Lachnospiraceae (f)</i>			↓		↓					↓		↓	↓↓
<i>Ruminococcaceae (f)</i>		↓	↑		↓						↓	↓	↓↓
<i>Clostridium (g)</i>		↓						↓				↓	↓↓
<i>Dialister (g)</i>		↓							↓			↓	↓↓
<i>Eubacterium rectale(e)</i>	↓							↓		↓			↓↓
Proteobacteria (F)					↑				↑				
Gammaproteobacteria (c)					↑								
Enterobacteriales (o)					↑								
<i>Enterobacteriaceae (f)</i>					↑				↑				
<i>Sutterella (g)</i>				↓									
<i>Escherichia coli (e)</i>	↑			↑									
<i>Klebsiella pneumoniae (e)</i>								↑					
<i>Pseudomona aeruginosa (e)</i>	↑												

En la parte superior se encuentran los autores de los artículos y del lado izquierdo se presentan los filos (F), el orden (o), la familia (f), el género (g) o la especie (e). La flechas indica si aumenta (↑) o disminuye (↓) en comparación con sujetos sanos.

Tabla 3. Alteraciones en la microbiota en ratones TG para la EA.

Modificado de Morales et al, 2023, p. 45.

Cambios en microbiota en modelos trasngénicos para la EA	Bonifili et al., 2017	Brandscheid et al., 2017	Harach et al., 2017	Shen et al., 2017	Zhang et al., 2017	Bäuerl et al., 2018	Syeda et al., 2018	Sun et al., 2019	Chen et al., 2020	Cuervo-Zanatta et al., 2021	Shukla et al., 2021	CONSENSO
Actinobacteria (F)								↓	↑			
<i>Bifidobacterium</i> (g)					↓			↓	↑		↓	↓
Bacteroidetes (F)		↑	↑			↓	↑	↑			↑	↑
Firmicutes (F)		↓	↓			↑	↑	↓			↓	↓
<i>Erysipelotrichaceae</i> (f)					↓	↓		↓	↑			↓
<i>Lachnospiraceae</i> (f)					↓			↓		↓		↓
<i>Anaeroplasma</i> (g)	↓				↑	↓		↑				↑
<i>Coprobacillus</i> (g)					↑					↑		↑
<i>Ruminococcus</i> (g)	↓			↓	↓			↓		↓		↓
<i>Turicibacter</i> (g)	↑				↓				↑	↑		↑
Proteobacteria (F)		↑	↑		↑	↑	↓					↑
Tenericutes (F)	↓		↑			↓	↓					↓

En la parte superior se encuentran los autores de los artículos y del lado izquierdo se presentan los filos (F), el orden (o), la familia (f), el género (g) o la especie (e). La flechas indica si aumenta (↑) o disminuye (↓) en comparación con sujetos sanos.

1.4. Factores bacterianos con efectos neurotóxicos

1.4.1. Lipopolisacáridos (LPS)

Los LPS forman parte de la membrana externa de bacterias Gramnegativas (Gui et al, 2008). Las alteraciones en la composición de la MI están asociados al aumento de los niveles de LPS (Avila et al., 2016). Los LPS pueden ser liberados en forma de endotoxinas y en condiciones de disbiosis se encuentran en concentraciones bajas en circulación (Syeda et al., 2018; Cuervo-Zanatta et al, 2022) generando inflamación de bajo grado al estimular el sistema inmune (Cuni et al., 2012).

En pacientes con EA, la presencia de LPS no se restringe a sistema circulatorio, sino que incluso se han detectado colocalizando con placas A β en cerebro y también pueden estar presentes en las paredes de los vasos sanguíneos (Zhan et al., 2016), sugiriendo que los componentes microbianos se desplazan hacia el cerebro de estos pacientes, principalmente por medio de la circulación (Van et al., 2016) o por el nervio vago (Jay et al., 2017). También se ha considerado que los depósitos de A β pueden surgir como una respuesta antimicrobiana debido a una infiltración de bacterias o sus productos a nivel cerebral (como DNA, pilis, flagelos, LPS, etc.; véase sección 1.1.5), actuando como factor iniciador de la neuroinflamación (Sochocka et al., 2018).

1.4.2. Proteínas amiloideas bacterianas

La diversidad y abundancia de la MI varía de acuerdo con el estado del paciente, lo que a su vez puede variar la producción de sustancias y productos bacterianos. Estos compuestos bacterianos expulsados son componentes extraños para el cuerpo humano, por lo que existe una respuesta del sistema inmune para controlarlos o inhibir cierto daño en el hospedero. Estos PAMPs también se caracterizan por desempeñar papeles críticos en la integridad estructural y en las funciones celulares de los microorganismos (en la formación de la membrana, en la biocapa, en la invasión o colonización, y supervivencia). Cuando los PAMPs aumentan se genera una inflamación aguda o crónica que se ha asociado con varios trastornos neurológicos (Skaper et al. 2018).

Dentro de los PAMPs se encuentran las proteínas amiloideas funcionales bacterianas, nombradas así por tener las mismas propiedades físicas que las proteínas amiloideas humanas responsables de la amiloidosis y por la estructura característica de fibras formadas de láminas β . Son proteínas funcionales producidas generalmente por bacterias Gramnegativas, que están encargadas principalmente de la adhesión al intestino como parte de la biocapa bacteriana como mecanismo de evasión del sistema inmunitario (Chapman et al. 2002; Romero & Kolter, 2014).

Mientras que los seres humanos codifican alrededor de 30 proteínas amiloidegénicas, la MI también produce diferentes amiloides funcionales. (Sampson et al., 2020). Los amiloides funcionales son proteínas con capacidad de autoagregación, que al acumularse lleva a

disfunciones celulares asociadas a enfermedades neurodegenerativas. Si bien los factores genéticos y ambientales pueden influir en la formación de amiloides, los desencadenantes moleculares no están bien definidos, además se ha observado que las proteínas amiloides pueden acelerar la agregación de otras proteínas de una manera priónica (Sampson et al., 2020). Se han identificado diferentes amiloides bacterianos (Fig. 4), siendo la proteína “curli” el primer amiloide funcional descrito. La proteína curli puede agregarse en un conjunto de fibras proteicas extracelulares de 6-12 nm, siendo este el principal componente de la biocapa de las bacterias Gramnegativas (Evans & Chapman, 2014).

Tabla 4. Ejemplos de proteínas amiloides bacterianas y sus funciones.

Modificado de Schwartz y Boles, 2013.

Organismo	Proteína(s) amiloidea(s)	Función/ características del amiloide
<i>Escherichia coli</i>	Curli (CsgA)	Componente de biopelícula; Adhesión a superficies
<i>Salmonella ssp.</i>	Curli/Tafi (CsgA)	Componente de biopelícula; Adhesión a superficies
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Mtp	Formación pili; unión a laminina
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MccE492	Se propone que la formación amiloide regula la actividad antimicrobiana de MccE492
<i>Pseudomonas Fluorescens</i>	FapC	Componente de biopelícula
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Chaplins (ChpA-H)	Componente de la superficie del biofilm de la espora; su formación amiloide podría regular la PSM
<i>Staphylococcus aureus</i>	Modulinas solubles en fenol	Actividad de dispersión de biofilm
<i>Bacillus subtilis</i>	TasA	Componente del biofilm; proteína de la superficie de la espora
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Harpins (HpaG)	Se propone que la formación amiloide regula la actividad citotóxica de HpaG

1.4.3. Proteína curli y sus subunidades principales

El intestino está colonizado de un microbioma complejo que afecta el desarrollo y la función del sistema inmunológico, metabólico y nervioso (Fung et al., 2017). Se han descrito amiloides funcionales en bacterias, hongos y mamíferos, siendo curli uno de los más estudiados (Chapman & Wang 2008). Curli se expresa en la superficie de bacterias en forma de fibras producidas por varias cepas de la familia *Enterobacteriaceae* (Bokranz et al., 2005). Las *Enterobacteriaceae*, son altamente prevalentes en el intestino de los humanos (Tursi & Tukel, 2018).

Las fibras de curli están formadas por la secreción bacteriana de un péptido amiloide desplegado, llamado CsgA, que rápidamente se agrega en el medio extracelular para formar la biocapa. Consta de otras subunidades que controlan la agregación (CsgE) y la nucleación (CsgB) (Barnhart & Chapman, 2006; Chapman & Wang 2008). Además, tiene la capacidad de mediar la adhesión a las células epiteliales, está involucrada en la defensa del huésped y puede causar plegamiento incorrecto de otras proteínas mediante el proceso de siembra cruzada (Tursi y Tukel, 2018; Vidakovic et al., 2018; Chen et al., 2019).

El interés en la proteína curli radica en su similitud con las proteínas formadoras de amiloides humanos, la amplia gama de interacción con proteínas humanas (Fig. 4) y la inducción de la inflamación en el cuerpo activando receptores como el heterocomplejo TLR2/TLR4/CD4 (Tuckel et al., 2010) induciendo la secreción de citocinas proinflamatorias (Ohkusa et al., 2009).

1.4.4. Estructura y ensamblaje de la proteína curli por bacterias Gramnegativas

El grupo de genes que codifican curli están comúnmente presentes y expresados en muchas cepas de *E. coli* patógenas y no patógenas, se encuentran en un solo *locus* genético, y agrupados en los operones *csgDEFG* y *csgBA* (Hammar et al., 1995). La transcripción del operón *csgBA*, que codifica los componentes estructurales de las fibras curli, depende estrictamente del regulador de transcripción *csgD*. La expresión de curli ocurre óptimamente durante la fase estacionaria de crecimiento a baja temperatura, baja osmolaridad y en crecimiento lento (Chirwa & Herrington, 2003)(Fig. 7). Estas condiciones están mediadas a nivel de expresión génica por los reguladores *OmpR*, *H-NS*, *CpxR* y *Crl*, principalmente (Romling et al., 1998; Prigent-Combaret et al., 2001). Por otro lado, el ensamblaje y polimerización de CsgA es bloqueada por la proteína chaperona CsgE (Andersson et al., 2013).

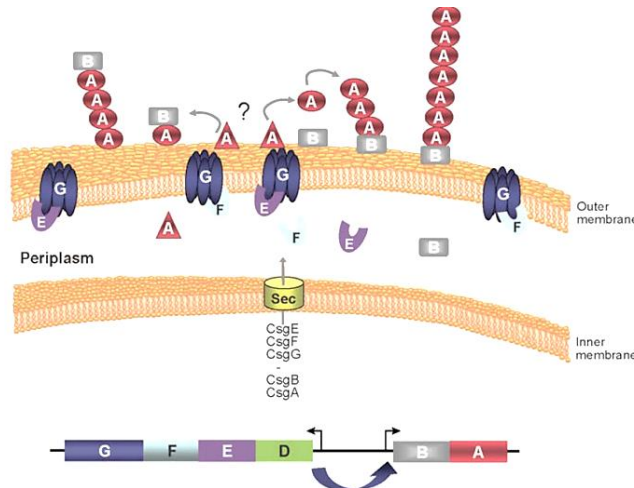


Fig. 4 Esquema de las subunidades de curli para el ensamblaje de la fibra.

Se muestran los operones *csgDEFG* y *csgBA* (abajo). CsgD es un regulador transcripcional positivo del operón *csgBA*. Todas las proteínas codificadas por los operones *csgDEFG* excepto CsgD, contienen secuencias de señales Sec para la translocación al periplasma. CsgG es una proteína de membrana externa necesaria para la secreción de las dos subunidades estructurales de curli CsgA y CsgB. CsgA se secreta fuera de la célula donde CsgB es el nucleador. CsgE y CsgF interactúan con CsgG y son necesarios para el ensamblaje eficiente de curli. Tomado de Barnhart & Chapman, 2006.

La secuencia de aminoácidos de la subunidad principal, CsgA, se puede dividir en tres dominios, una secuencia de señal N-terminal Sec (escindida después de la secreción a través de la membrana interna), un N-terminal de 22 residuos implicados en la secreción a través de la membrana externa y cinco unidades de repetición imperfecta (R1, R2, R3, R4 y R5) que comprende el núcleo amiloide resistente a la proteasa. La capacidad de siembra cruzada y nucleación se le han conferido a la unidad R1 y R5 (Chapman & Wang, 2008).

1.4.5. Interacción de la proteína curli con proteínas del huésped

Las fibrillas de curli producidas por *E. coli* son consideradas como factor de virulencia que influyen en la adherencia de la bacteria y la formación de la biocapa (Sobieszcańska et al., 2019). Además, curli permite que las cepas de *E. coli* se adapten a muchos nichos en el organismo huésped mediante la unión de varias proteínas plasmáticas y de matriz extracelular, por ejemplo, fibronectina, laminina, activador de plasminógeno tisular, plasminógeno y H-kininogeno, y por lo tanto pueden contribuir a procesos patológicos (Tabla 4) (Gophna et al., 2001; Olsén et al., 1998)

Tabla 5. Ejemplos de proteínas con las que interacciona curli.

Modificado de Barnhart & Chapman, 2006.

Proteína	Funciones	Referencias
Fibronectina	Proteína de matriz extracelular	Collinson S. y col., 1993; Olsen A. y Normark S., 1989
Laminina	Proteína de matriz extracelular	Olsen A. y col., 1993
MHC clase 1	Molécula presentadora de antígeno	Olsen A. y col., 1998
TLR2	Activación del sistema inmunitario innato	Tukel C. y col., 2005
Plasminógeno	Proteasa de serina que degrada los tejidos blandos cuando se activa la plasmina	Sjobring U. y col., 1994
t-PA	Convierte el plasminógeno en plasmina	
H-Kininógeno	proteína de fase de contacto	Ben Nasr A. y col., 1996
Fibrinógeno		Herwald H. y col., 1998
Factor XII		Olsen A. y col., 2002

Por otra parte, la presencia de curli producida por *Salmonella entérica serovar* y *Salmonella typhimurium* puede mejorar la integridad de la barrera epitelial intestinal y disminuye la secreción de interleucina-8 (IL-8) por las células epiteliales (Oppong et al., 2013). Incluso, en un modelo de monocapa celular con Caco-2 (células de cáncer colorrectal) estimuladas con citocinas (IL-1 β , TNF- α e INF, para simular una barrera epitelial intestinal inflamada), al ser expuestas a bacterias que expresan curli (*E. coli* K12) se observó una disminución de la internalización de la bacteria debido a un aumento en la adherencia y supervivencia bacteriana (Gualdi et al., 2008). Esto indica que las fibrillas de curli son un factor importante de virulencia que permite que las bacterias colonicen eficazmente el epitelio intestinal en individuos con trastornos intestinales inflamatorios (Sobieszcańska et al., 2019).

2. Antecedentes

2.1. Disbiosis intestinal en pacientes con EA

En la última década, la relación bidireccional del eje intestino-cerebro, se ha visto complementada por la MI. Las alteraciones en el eje microbiota-intestino-cerebro se ha asociado con procesos fisiológicos del cerebro, como la mielinización, la neurogénesis y la

activación microglial, entre otros. Estas funciones son necesarias para prevenir enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, la EP, la EA (Tremlett et al., 2017; Rothhammer et al., 2018), y otras enfermedades relacionadas con la afectación del estado de ánimo y la cognición (Fung et al., 2017).

En 2017 Cattaneo y cols. analizaron taxones específicos en muestras fecales de pacientes con EA y MCI, encontrando una mayor abundancia de *Escherichia* y *Shigella* en sujetos con amiloidosis, lo que se correlacionó positivamente con los niveles plasmáticos de CXCL2 y NLRP3, además de mostrar disminuidas las especies de *B. fragilis* y *E. rectal*, con un aumento en el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y disminución en los niveles plasmáticos de IL-10. Posteriormente, Vogt y cols., también estudiaron la MI de pacientes con EA concluyendo que el filo *Firmicutes* disminuyó mientras que los *Bacteroidetes* aumentaron en sujetos con demencia, y al medir la hiperfosforilación de la proteína tau (p-tau) y p-tau/A β -42 en LCR, encontraron una correlación positiva entre la abundancia de los grupos *Bacteroides* y *Blautia* y la demencia tipo EA, además de asociarse con la activación astrogliar y microglial. Por el contrario, en poblaciones chinas, pacientes con demencia moderada y grave presentaron un aumento de *Actinobacteria* y *Ruminococcaceae* y una disminución en *Bacteroidetes* (Zhuang et al., 2018) y en pacientes diagnosticados con EA se observó disminución del filo *Firmicutes* (Ling et al., 2019) (ver Tabla 2). Wu y cols. (2021) logró analizar metabolitos de la MI en pacientes con EA y MCI, observando desregulación en las vías metabólicas del triptófano, ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y ácidos biliares, la disminución de SCFA y hidroxitriptófano (5-THP) se asoció con un mayor deterioro cognitivo y funcional.

En conjunto, los estudios mencionados indican que la disbiosis intestinal puede ser una característica de los pacientes con EA e incluso desde las primeras etapas como en los pacientes con MCI. De manera relevante, en la EA se observa una inflamación de bajo grado incluso desde etapas prodrómicas (Brestoff & Artis, 2013), lo que pone de manifiesto una posible interacción entre la MI y la neuroinflamación, o la agregación amiloide en cerebro.

2.2. Disbiosis intestinal en ratones APP/PS1

Es relevante mencionar que los cambios observados a nivel de la MI de pacientes con la EA pueden reflejarse en modelos transgénicos para la enfermedad (Morales et al., 2023). Los primeros datos mostraron alteraciones de la diversidad microbiana en ratones viejos transgénicos para la EA al compararlos con sus pares control (Harach et al., 2017). En ratones triple (3xADTG) (Syeda et al., 2018) y dobles transgénicos para la EA (APP/PS1) se reportó un incremento en la abundancia de las familias *Prevotellaceae*, *Helicobacteraceae*, *Desulfovibrionaceae* y *Odoribacter*, al comparar con sus pares WT (Shen et al., 2017; Cuervo-Zanatta, et al., 2022). En este modelo de APP/PS1 ha sido relevante la mayor abundancia de *Proteobacteria* (Bäurel et al., 2018; Cuervo-Zanatta et al., 2022). Sin embargo, Shukla y cols. (2021), en ratones 5xFAD (con 5 mutaciones para la EA en APP: K670N, M671L, I716V; y PS1: M146L, L286V) mostró mayor abundancia de *Bacteroidetes* y menor de *Firmicutes*. Chen y cols. (2020) también analizaron la abundancia de los taxones de la MI del doble transgénico APP/PS1, en ratones jóvenes (1-3 meses, justo antes de la activación microglial y deposición amiloide) y en adultos (6 y 9 meses), sus resultados muestran cambios tempranos en la MI en taxones como *Escherichia*, *Shigella*, *Desulfovibrio*, *Akkermansia* y *Blautia* al comparar con el grupo control, lo que sugiere que la disbiosis intestinal precede el desarrollo de características patológicas de la EA en el cerebro (ver Tabla 3).

Estos datos previos se generaron de la toma de muestra de heces de los animales. En resultados recientes de nuestro laboratorio, se evaluó la abundancia de bacterias Gramnegativas directamente del contenido intestinal del intestino grueso (colon y ciego) de ratones TG (APP/PS1) y sus pares WT, para valorar los cambios en la MI dentro del organismo. Se observó que la cantidad total de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) de bacterias Gramnegativas crecidas en agar MacConkey fue del 83.41% en ratones TG y del 16.59% en ratones WT. En las muestra de ratones TG se determinó que a capacidad de producción de proteínas amiloides bacterianas y mucho mayor que en ratones WT (Fig. 5). Estos datos muestran que en ratones TG existe un exacerbada abundancia de Gramnegativas, principalmente *E. coli*, siendo bacterias capaces de generar proteínas amiloides, con un alto potencial para generar inflamación y eventualmente, agregación amiloide en otro órganos, como en el cerebro. Esto demuestra que la disbiosis en el intestino

(muestras de contenido intestinal) (González-Magaña, 2021), es similar a lo observado en muestras fecales (Cuervo-Zanatta et al., 2022). Lo que valida la determinación de la MI en muestras fecales como panorama del complejo ecosistema que interactúa con el hospedero.

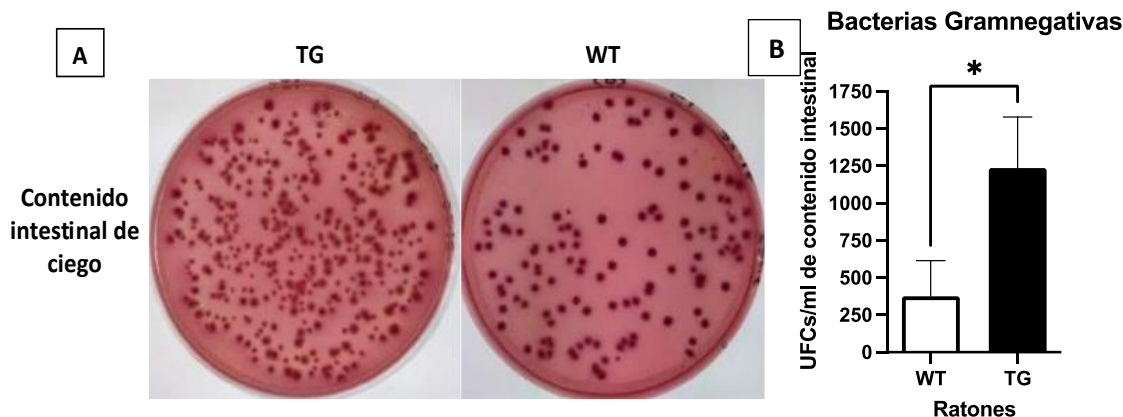


Fig. 5 UFC/mL del contenido intestinal de ratones TG y WT en agar MacConkey.

(A) Fotografía representativa del crecimiento de colonias en agar MacConkey a las 24 h de incubación a 37°C en aerobiosis del contenido intestinal del ciego (75 μ L) en ratones TG a la izquierda y WT a la derecha. (B) UFC/mL de bacterias Gramnegativas de contenido intestinal (de ciego y colon) TG (n=5) y WT (n=4). UFCs/ml = Unidades formadoras de colonias por mL. Para B los datos representan la media \pm S.E.M. de cada grupo, *** $p < 0.001$ (González-Magaña, 2021).

2.3. Bacterias productoras de proteínas amiloideas

De las muestras analizadas por González Magaña (2021) en agar MacConkey se lograron identificar 3 cepas bacterianas por sus características macroscópicas (Fig. 6A), las cuales se sembraron en agar YESCA Rojo Congo (Fig. 6B), para demostrar si las cepas eran capaces de producir proteínas amiloideas. El Rojo Congo, es un compuesto orgánico capaz de intercalarse en las proteínas con conformación de hojas β plegadas siendo la coloración rojiza un resultado positivo a amiloides.

De las tres cepas identificadas (I, II y III), sólo la cepa I y II fueron positivas a la prueba de agar YESCA-Rojo Congo. Además, se observó que la cantidad de UFCs productoras de proteínas amiloideas fue significativamente mayor en los ratones TG en comparación con ratones WT (Fig. 6C). Esta mayor abundancia de bacterias productoras de proteínas amiloides en el ciego y colon de ratones TG podría sugerir una mayor exposición de proteínas amiloideas en el intestino grueso de los ratones TG.

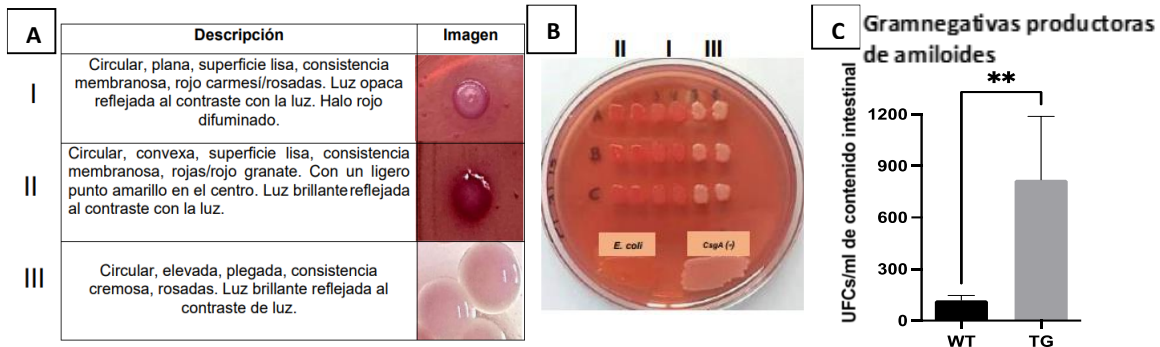


Fig. 6 Bacterias Gramnegativas productoras de amiloides en agar YESCA Rojo Congo.

(A) Características macroscópicas de las tres cepas Gramnegativas encontradas en agar MacConkey del contenido intestinal (B) Crecimiento de las tres cepas (I, II y III) identificadas, el control positivo *E. coli* (parte inferior izquierda) y el control negativo *Enterococcus* (parte inferior derecha) en agar Yesca Rojo Congo, aisladas de ratones TG y WT. El grupo I y II presentan una coloración roja (positiva a proteínas amiloides), con una consistencia rugosa y lisa respectivamente. La cepa III por su parte, presentó una coloración blanca (negativa a la prueba). (C) UFCs/mL de bacterias productoras de proteínas amiloides totales de los grupos de ratones TG y WT. Los datos representan la media +/- S.E.M. de cada grupo, ** $p < 0.01$ (González-Magaña, 2021).

2.3.1. *Escherichia coli* como principal productor de proteínas amiloides

Hasta ahora solo se han identificado algunas especies bacterianas productoras de proteínas amiloides. En el trabajo previo, las tres cepas productoras de proteínas amiloides bacterianas se sembraron en CHROMO-Agar Orientation®, agar para lograr identificar los posibles géneros bacterianos de acuerdo con el color de tinción de la colonia (Fig. 7).

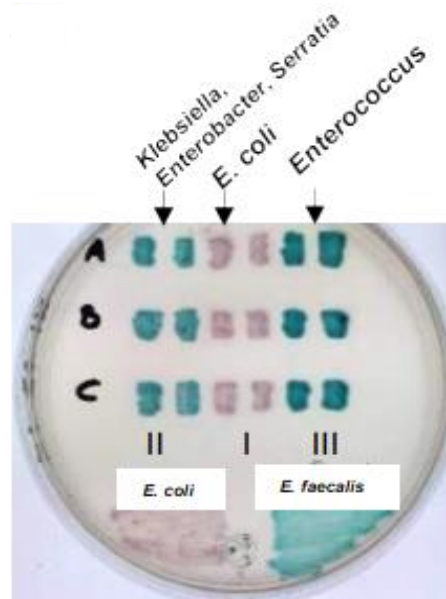


Fig. 7 Clasificación de bacterias de acuerdo con la tinción en CHROMO-AGAR Orientation®.

Siembras de las cepas I, II y III aisladas de los ratones TG y WT en CHROMOAGAR Orientation®. Las tinciones obtenidas son: coloración rosa (que corresponde a *E. coli*), coloración azul metálico (que corresponde a los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*) y azul turquesa (que corresponde al género *Enterococcus*) (González-Magaña, 2021).

Los resultados muestran que la cepa I, pertenece a *E. coli* y se encuentra en mayor cantidad en colon de ratones TG (1116 UFCs/mL en comparación con 57 UFCs/mL de ratones WT), mientras que en ciego se obtuvo un número aún mayor en ratones TG (1750 UFCs/mL en ratones TG en comparación de 106 UFCs/mL en ratones WT). La cepa II, pertenece a cualquiera de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* o *Serratia*. La cepa III que viró a turquesa posiblemente pertenece al género *Enterococcus* (Fig. 7). Al comparar la distribución total de las UFCs de *E. coli* se observó una abundancia relativa del 82.36% en ratones TG, mientras que en los ratones WT es del 18.40%. Por otra parte, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia* mostró una abundancia del 4.77% en ratones TG en comparación con el 80.04% en ratones WT (Fig. 8B). Estos resultados indican que las bacterias productoras de proteínas amiloides funcionales en ratones TG son principalmente *E. coli*.

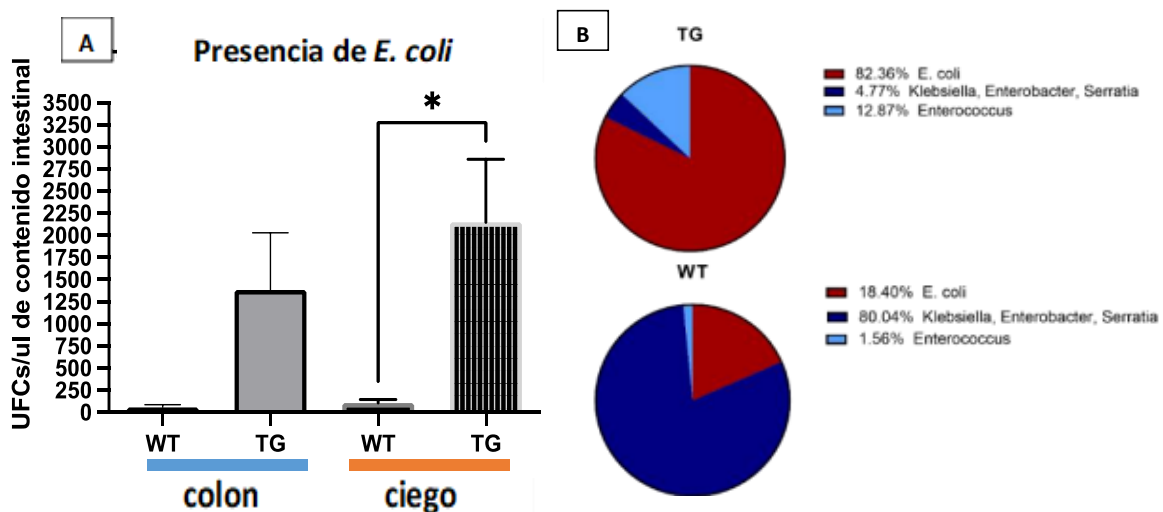


Fig. 8 UFC/ μ L de *E. coli* en colon y ciego de ratones TG y WT.

(A) UFC/ μ L de *E. coli* aisladas del colon y ciego de ratones TG y WT. (B) Abundancia relativa del total de UFCs aisladas del colon y ciego de ratones TG y WT; para ratones TG *E. coli* representa el 82.36%, de las cepas II (*Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*) es el 4.77% y de *Enterococcus* es el 12.87%; mientras que, para ratones WT *E. coli* representa el 18.40%, de las cepas II es el 80.04% y de *Enterococcus* es el 1.56%. Los datos en A representan la media \pm S.E.M. de cada grupo, * $p < 0.05$ (González-Magaña, 2021).

El intestino se denomina una fuente primaria de diseminación y transmisión de patógenos (Fung et al., 2017). Las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* son altamente prevalentes

en el intestino de los humanos, *E. coli* es la especie más representativa de esta familia pero existen otros géneros como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Proteus* (Leclerc et al., 2001) Estos géneros son de la familia más predominante de bacterias Gramnegativas que causan infecciones relacionadas con la biocapa, como infecciones del tracto biliar, prostatitis bacteriana y las infecciones urinarias asociadas al catéter (Bouza et al., 2001). No solo *E. coli* y *Salmonella spp.* pueden producir proteínas amiloides funcionales como “curli” (Tursi & Tukel, 2018), ya que se ha encontrado que algunas especies de *Citrobacter* pueden producir curli a temperatura ambiente (Zogaj et al., 2003).

La colonización y persistencia de las bacterias se da por la unión de comunidades bacterianas encapsuladas e incrustadas dentro de una matriz llena de proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos, llamada biocapa. Las fibras de curli están formadas por la agregación de la subunidad bacteriana CsgA, que se agrega extracelularmente para ser parte de la biocapa y mediar la adhesión a las células epiteliales (Tursi & Tukel, 2018; Vidakovic et al., 2018). La biocapa protege a las bacterias del estrés físico y químico, como el daño oxidativo y la desecación (Branda et al., 2005; Hall & Stoodley, 2009). Cuando existen más bacterias que se quieren adherir, lo hacen por medio de estructuras filamentosas conocidas como pili, que median la unión superficial robusta e incursionan en la matriz (Beloinet al., 2004). Esto es relevante para el estudio de la EA, ya que como se ha mencionado anteriormente, incluso desde etapas tempranas de la enfermedad se observa disbiosis. Si esta disbiosis conlleva a aumentos en la abundancia de *E. coli* y producción de proteínas amiloides, como curli, esto pudiera marcar la presencia de un factor inflamatorio y neurotóxico posiblemente relacionado con la etiología de la enfermedad.

2.3.2. La proteína curli como promotor de agregación proteica

Hasta ahora se ha demostrado que existen dos tipos de amiloides bacterianos: Fap y curli, capaces de promover la agregación de otras proteínas amiloides. Se ha visto que Fap producida por *Pseudomonas*, induce cambios conformacionales en α -Syn, proteína asociada a la EP (Christensen et al., 2019). Además, en ratones transgénicos a Thy1- α -Syn (es decir que sobreexpresan alfa sínucleína), se observó que curli producido por las *Enterobacteriaceae* promueve la agregación α -Syn, evento relacionado con el deterioro

cognitivo (Sampson et al., 2020). Es así como la expresión de curli es requerida para que *E. coli* exacerbe los déficits cognitivos inducidos por α -Syn, incluyendo los impedimentos intestinales y motores. También, en estos ratones transgénicos Thy1- α -Syn) se encontró que el aumento de *E. coli* productora de curli promueve la agregación de α -Syn en el intestino y el cerebro (Sampson et al., 2016). Se ha descrito que las subunidades de curli purificadas aceleran la agregación α -Syn en ensayos bioquímicos, mientras que el tratamiento oral en ratones con un inhibidor amiloide restringido en el intestino previene la aceleración mediada por curli y las anomalías del comportamiento (Sampson et al., 2020).

En cuanto a la EA, en 2017 Harach y su grupo de trabajo demostraron la existencia de una comunicación directa entre las bacterias intestinales y la agregación de A β en un modelo transgénico para la EA (APP/PS1). En ratones APP/PS1 carentes de microbiota (germen free, GF) se observó una disminución de la amiloidosis cerebral en comparación de los ratones TG nativos. Por otro lado, Mintes y cols. (2016), usando ratones APP/PS1 tratados con un coctel de antibióticos para depletar ciertas comunidades bacterianas, observaron una reducción de los depósitos de A β y un aumento del péptido A β soluble en comparación al grupo sin tratamiento. También se ha descrito que las proteínas chaperonas bacterianas de curli son capaces de interactuar transitoriamente con α -Syn, A β , proteína priónica celular (PrPC) y p-tau, acelerando la amiloidogénesis de las proteínas amiloides de mamíferos (Clinto et al., 2010; Brettschneider et al., 2015; Katorcha et al., 2017). Datos recientes de nuestro grupo de investigación demuestran que pacientes con EA muestran mayores niveles de curli en heces, en comparación con sujetos con MCI, adultos mayores sin demencia o jóvenes, evento asociado con el incremento de A β y tau en el suero (Sánchez-Tapia et al., 2023). Estos datos ponen de manifiesto una posible interacción entre la disbiosis intestinal, la producción de curli por bacterias Gramnegativas y el daño cognitivo. Pero aún no se ha demostrado si curli puede interactuar o promover la agregación amiloide en el cerebro.

2.4. Proteína curli como activador de inflamación

La MI juega un papel indispensable en la maduración del sistema inmunológico del huésped y la homeostasis intestinal (Sommer & Bäckhed, 2013). Se ha demostrado que la MI está asociada con la regulación de algunas vías de señalización inmunitaria, como la vía de

señalización inflamatoria, la vía de interferón tipo I (IFN-I) y la vía de factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) (Inoue & Shinohara, 2013; Kaelberer et al., 2018; Zheng et al., 2020). Se ha asociado la activación de IFN con la maduración de células dendríticas, el aumento de células T citotóxicas y la interacción bidireccional entre el huésped y la MI (Giles & Stagg, 2017). La MI puede afectar el desarrollo de estructuras linfoides organizadas y la activación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas (Hooper et al., 2012; Olszak et al., 2012). En el intestino se encuentra una cantidad densa de células inmunes, tales como los linfocitos B y T, macrófagos y células dendríticas. Las interacciones inmunológicas microbiota-huésped en el intestino conducen a la liberación de mediadores proinflamatorios como citocinas y quimiocinas, por ejemplo, IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Young et al., 2014).

La comunicación por el nervio vago del eje microbiota-intestino-cerebro, establece una conexión extrínseca entre el cerebro y el tracto gastrointestinal, enviando información sobre el estado de los órganos internos al cerebro a través de fibras aferentes (Breit et al., 2018). En el intestino, dentro de la capa intestinal se encuentran células altamente especializadas, llamadas células heterocromatinas (CE) que detectan nutrientes y productos microbianos ingeridos en el lumen (Kaelberer et al., 2018).

Las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA, se han asociado con un deterioro en la función intestinal (Honarpisheh et al., 2020), debido a la inflamación sistémica de bajo grado relacionada con el envejecimiento (Chung et al., 2019), por eso mismo el papel desempeñado por el sistema inmune en la patogénesis de la EA es prominente y no se limita al cerebro. La afectación en el intestino en enfermedades neurodegenerativas se ha propuesto como fuente de inflamación (Honarpisheh et al., 2020), llevando a la ruptura de la barrera intestinal, aumentando la citocinas proinflamatorias con la presencia de metabolitos bacterianos, y por consiguiente deterioro de la BHE provocando la neuroinflamación (DeJong, Surette & Bowdish, 2020).

La inflamación intestinal en respuesta a amiloides bacterianos puede alterar la integridad intestinal y permitir la traslocación de antígenos (Erskine et al., 2018; Tursi & Tukul, 2018). Esto puede desencadenar una respuesta inmune no solo en la vía sistémica, sino también vagal contribuyendo a la progresión de la EA (De Chiara et al., 2012). Los TLRs se expresan

en las células epiteliales del intestino, en la mucosa de la lámina, en las células dendríticas, en los linfocitos intraepiteliales y en las células nerviosas vaginales dentro de la submucosa. Por lo general el TLR2 se activa mediante el enriquecimiento de bacterias Grampositivas y el TLR4 debido a bacterias Gramnegativas (Takeuchi et al., 1999). Sin embargo, Liu y cols. (2012) demostraron que hay una activación de TLR2 en aumento a la agregación amiloide, por otro lado, la inhibición de TLR2 atenúa los niveles neuronales de A β en ratones TG (McDonald et al., 2012). Se ha planteado que las proteínas amiloideas pueden causar una cascada de inflamación asociada a TLR, promoviendo la patología central de A β , a través de la interacción del eje intestino-cerebro. Las investigaciones de Das y cols. (2022) presentaron las primeras pruebas sobre la importancia de los cambios inmunitarios dentro de la vía vagal intestinal en respuesta a curli, debido a que encontraron aumentados los niveles de curli y que estos se asociaban con niveles elevados de mRNA de TLR2 y TLR4 en los intestinos de ratones TG para la EA de 6 meses y 15 meses de edad. Una de las interacciones de la proteína curli que se encontró fue la activación del nervio vago en ratones transgénicos por medio del PGP9.5 (marcador neuroendocrino) e *in vivo* se asoció a un aumento de TLR2 al estimularse con fibras de curli purificadas (Das et al., 2022).

3. Justificación

La EA es una enfermedad crónico-neurodegenerativa irreversible que afecta principalmente a adultos mayores de 65 años. Sin embargo, se ha demostrado que décadas antes de la sintomatología clínica, existen alteraciones tanto a nivel periférico como central. Cambios en la MI pueden observarse desde estadios prodromales, con una mayor abundancia de bacterias de perfil proinflamatorio. *E. coli* es capaz de producir proteínas amiloides, como la proteína curli, que se genera como mecanismo de defensa ante las condiciones ambientales. La proteína curli induce inflamación en el hospedero y posiblemente agregación de otras proteínas mediante el mecanismo de siembra cruzada. Es así como este proyecto pretende determinar el papel de la proteína curli en la patogénesis de la EA, y determinar su papel como factor asociado a la inflamación, tanto a nivel intestinal como cerebral, así como su efecto sobre la producción de péptidos amiloides en el cerebro del hospedero.

4. Hipótesis

La presencia de la proteína curli estará relacionada con una mayor inflamación, agregación amiloide y daño cognitivo en un modelo de ratón transgénico (APP/PS1) para la EA en comparación con los WT.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Establecer la relación entre la presencia de la proteína curli, la inflamación y agregación amiloide en un modelo de ratón transgénicos (APP/PS1) de la EA.

5.2. Objetivo s particulares

- Confirmar la presencia de daño cognitivo en ratones dobles transgénicos (APP/PS1) en comparación con sus pares silvestres.
- Detectar la presencia del gen *csgA* en el intestino grueso de ratones APP/PS1 y WT.
- Determinar la presencia de proteína curli en intestino en ambos grupos experimentales.
- Cuantificar los niveles de TLR4 en el intestino y el cerebro de los grupos experimentales.
- Demostrar la colocalización de K99 (proteína de bacterias productoras de curli) con placas A β en el hipocampo y cerebro de ratones APP/PS1.

6. Metodología

6.1. Diagrama de trabajo

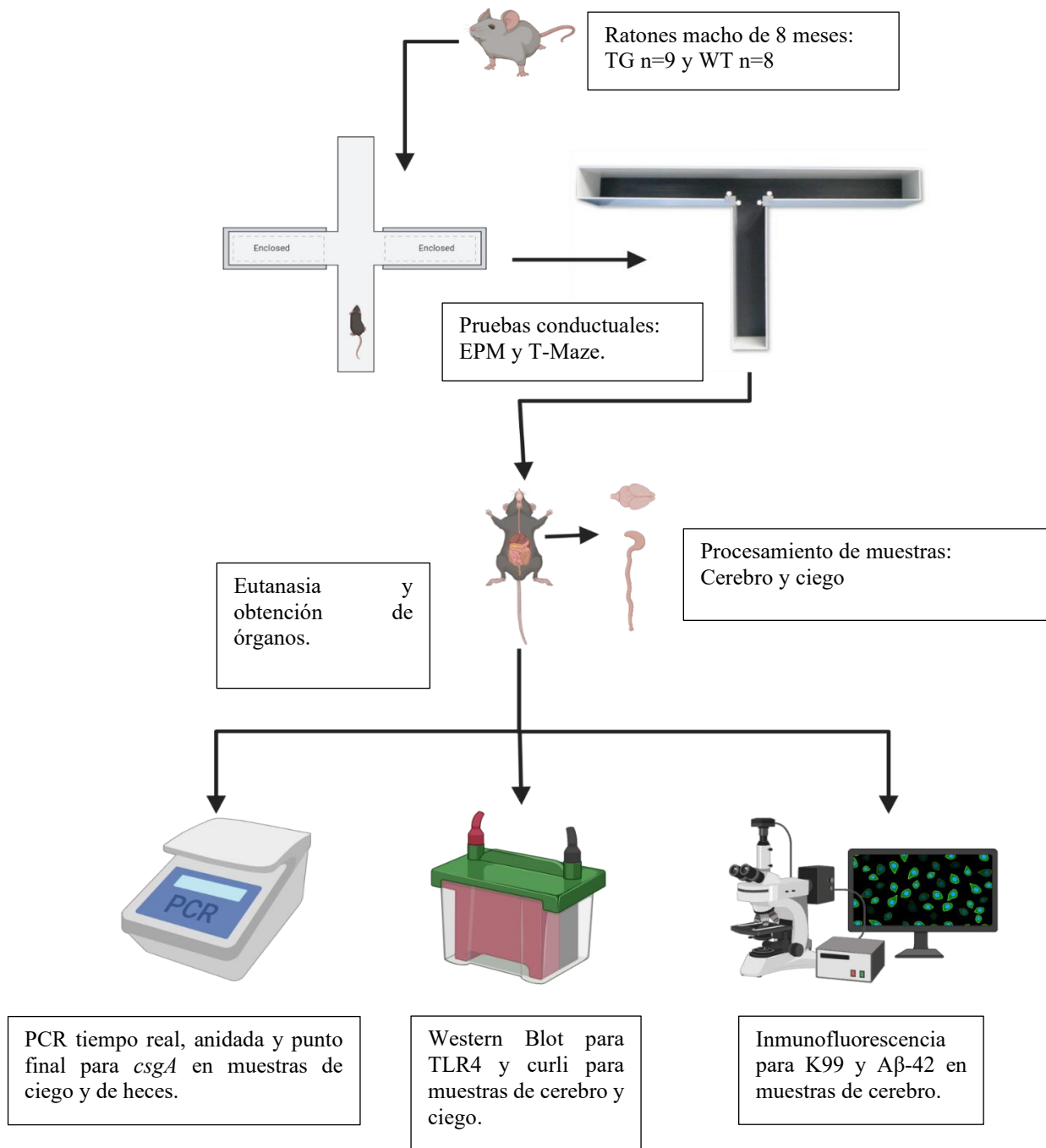


Fig. 9 Diagrama general de la metodología.

Se ocuparon 17 ratones macho de 8 meses dividido en dos grupo: transgénico (TG) y silvestre (WT), se realizaron dos pruebas conductuales Elevated Plus Maze (EPM) y T-Maze, seguido del procesamiento del tejido para realizar las técnicas de estudio (PCR, Western Blot e Inmunofluorescencia).

6.2. Sujetos experimentales

Se utilizaron ratones macho doble transgénicos (APP/PS1, TG) (Jacksson, Laboratories, USA) que expresan la proteína precursora amiloide (APP) quimérica (humano/ratón) (Mo/HuAPP695-mutación sueca) y la presenilina-1 (PS1) humana mutante (dE9-mutación L166P). Como sujetos control se utilizaron ratones hermanos sin las mutaciones (silvestres, WT).

Los ratones TG muestran una sobreexpresión del transgén humano APP aproximadamente 3 veces más alto que el APP murino endógeno, evento acompañado de la mutación L166P que resulta en la escisión de la PS1 por la ruta amiloidegénica, resultando en la generación de péptidos A β más largos y propensos a la agregación (como es el caso de más A β 42 y menos A β 38), promoviendo la acumulación de A β cerebral. En la figura 10, se muestra un cronograma de las alteraciones que desarrolla este modelo de ratón doble transgénico, las cuales son similares a las observadas en los cerebros de pacientes con la EA (Trinchese et al., 2004).

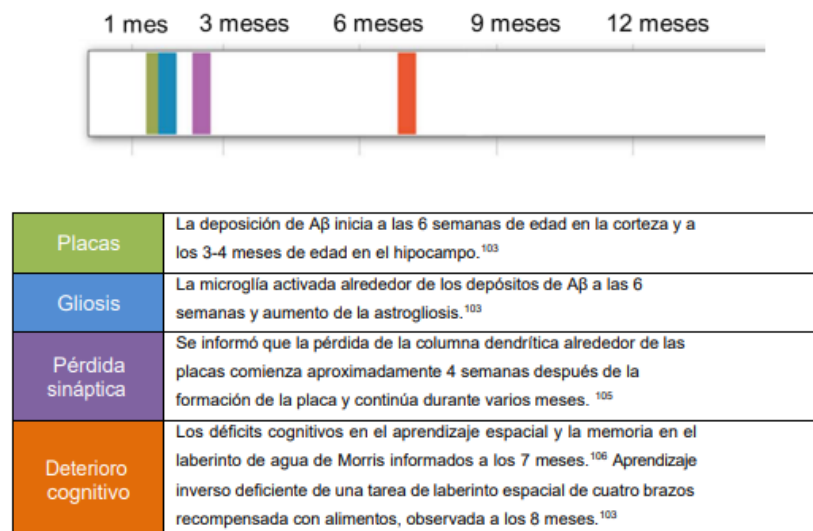


Fig. 10 Caracterización Fenotípica del modelo doble transgénico.

Modificado de ALZFORUM 2020.

En estos ratones APP/PS1, la formación de placas amiloides inicia en la corteza cerebral aproximadamente a las seis semanas de edad junto con procesos de neuroinflamación, siendo este último el tercer marcador histopatológico más relevante detectado en cerebros de pacientes con la EA. Después, entre el tercer y el cuarto mes de edad las placas amiloides aparecen en el hipocampo y posteriormente aparecen en el tronco encefálico, el tálamo y el cuerpo estriado a los cinco meses de edad (Radde et al., 2006), provocando la destrucción de neuronas y la activación de cascadas proinflamatorias. Finalmente, se observa un deterioro cognitivo característico de los seres humanos diagnosticados con la EA, como son pérdida de memoria, problemas de lenguaje y alteración en la capacidad de juicio. En estos ratones suele evaluarse el deterioro cognitivo a través de pruebas conductuales a partir de los seis y siete meses de edad. Más aún, se ha demostrado disbiosis intestinal en esta cepa desde los 3 a los 6 meses (Cuervo-Zanatta et al., 2020, 2022). En resumen, los ratones doble transgénicos APP/PS1 entre la edad de los siete y ocho meses, muestran todas las alteraciones esperadas de la EA (Radde et al., 2006; Serneels et al., 2009).

Los ratones se mantuvieron de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 y con las recomendaciones del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del CINVESTAV, bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas con acceso *ad libitum* de agua y alimento.

6.2.1. Determinación de genotipos

Todos los ratones experimentales fueron genotipificados por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final con 50 ng de DNA aislado de la cola del ratón mediante el kit DNAzol®. Se utilizaron primers para APP, PS1 y como control interleucina-2 (IL-2). Sólo los animales que presentaron ambas mutaciones (APP y PS1) fueron incluidos dentro del grupo de TG, mientras que los ratones que no presentaron ninguno de los transgenes fueron utilizados como grupo WT.

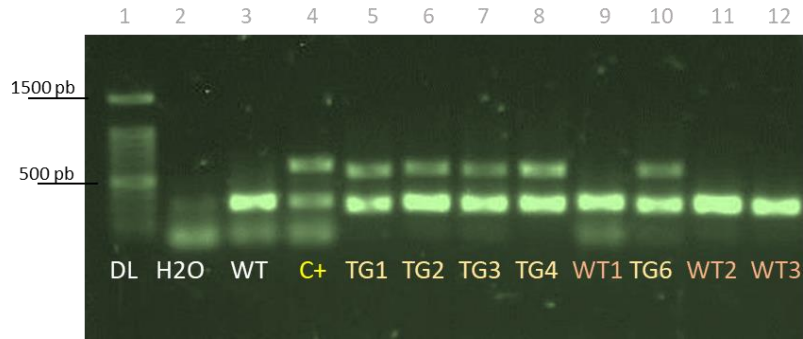


Fig.11 PCR punto final para genotipificar ratones macho TG y WT.

Imagen representativa de gel de agarosa al 1.5%. Los carriles 5-12 son muestras de los sujetos. Las muestras que presentan dos bandas nos indican la presencia de PS1 e IL2, son consideradas de ratones transgénicos. Los controles utilizados fueron: en el carril 2 agua (H₂O), en el 3 la proteína IL2 de los ratones WT, en el 4 se presenta el control positivo para los ratones con los transgenes humano APP/PS1. En el carril 1 se encuentra el DNA Ladder. DNA templado 50 ng de cola de ratón.

6.3. Evaluación de parámetros cognitivos

Al cumplir los 8 meses de edad los ratones fueron trasladados del bioterio al cuarto de conducta donde permanecieron 15 días para habituarse al entorno antes de las pruebas conductuales. La habituación consistió en manipularlos con ambas manos en intervalos de tiempo de 5 minutos al día. Las pruebas conductuales se llevan a cabo con luz de tonalidad roja durante el ciclo de luz. Todos los laberintos fueron limpiados ávidamente con alcohol 10% para eliminar rastros olfativos después de realizar las pruebas en cada sujeto.

6.3.1. Laberinto elevado en forma de cruz

El laberinto presenta una altura de 50 cm conformado por 4 brazos de 50 cm de largo por 10 cm de ancho, solo 2 de los brazos tienen paredes de 40 cm en 3 lados (Fig. 12). Cada sujeto se coloca en el centro del laberinto (zona de indecisión) y es videograbado y monitoreado durante 5 minutos. Posteriormente se evalúa el tiempo que pasó explorando los brazos cerrados (a mayor tiempo mayor ansiedad), los brazos abiertos (a mayor tiempo menor ansiedad) y el tiempo en la zona de indecisión (Walf & Frye, 2007).

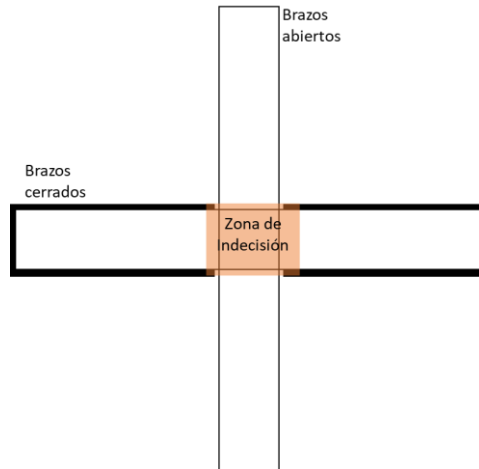


Fig. 12 Laberinto elevado en forma de cruz (EPM).

Los brazos cerrados cuentan con tres paredes de 40 cm de alto; los brazos abiertos no cuentan con ninguna pared. El laberinto se encuentra a 50 cm a nivel del suelo. Con este laberinto se evalúa de la conducta de ansiedad.

6.3.2. Laberinto en forma de T

El laberinto en forma de T está hecho de acrílico transparente con 3 brazos que forman una T; cada brazo mide 30 cm de largo por 10 cm de ancho y cuenta con paredes de 20 cm de altura. Los brazos laterales están separados por una pared central removible que mide 17 cm de largo y 20 cm de alto (Fig. 13). Se prepara el laberinto con un poco de aserrín sobre la base. La prueba consta de dos fases: la primera se conoce como “fase de entrenamiento”, en la cual el ratón se introduce en el inicio del brazo central y explora hasta entrar a uno de los brazos laterales, una vez que la cola del animal ha entrado completamente en el brazo se coloca otra pared removible en la entrada del brazo de 10 cm de ancho por 20 cm de altura, de modo que la permanencia del ratón sea de 30 segundos, para posteriormente guiarlo hacia la posición de inicio, retirarlo del laberinto y regresarlo a su caja de origen. Después de 2 minutos comienza la segunda parte del experimento conocida como “fase de prueba”, en esta se coloca de nuevo al ratón en el brazo central, y se registra el brazo al que entra el sujeto. El ratón debe poder recordar en cual brazo estuvo en la fase de entrenamiento y escoger el brazo opuesto, a esta acción se le conoce como alternancia espontánea. Este protocolo se realiza 3 veces al día (con un intervalo de reposo de dos horas entre cada prueba) durante dos días. El laberinto en forma de T, evalúa la memoria de trabajo o a corto plazo (Deacon & Rawlins, 2006).

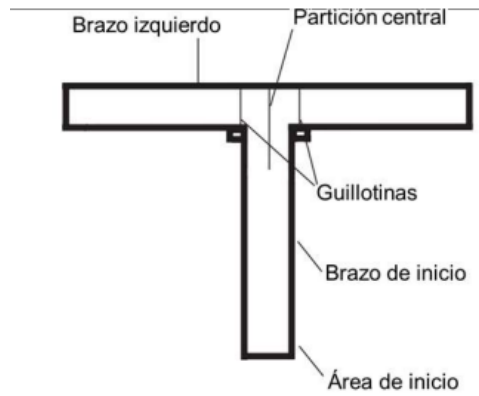


Fig. 13 Laberinto en forma de T (T-Maze).

El brazo de inicio tiene una partición central de una pared removible, similar a las paredes removibles del brazo izquierdo y derecho que funcionan como guillotinas, al ser removibles facilitan la limpieza para eliminar rastros olfativos.

6.4. Preparación de tejidos

Al finalizar las pruebas conductuales, se administró una sobredosis de pentobarbital (150 mg/kg i.p.) a los sujetos experimentales para posterior a la eutanasia, obtener los órganos (cerebro, colon y ciego) y analizarlos.

El cerebro se dividió en hemisferio izquierdo y hemisferio derecho. El hemisferio izquierdo, se separó en corteza cerebral e hipocampo y se almacenó a -70°C . El hemisferio derecho se designó para la técnica de inmunofluorescencia, este se fijó con paraformaldehído (PFA) al 4% a 4°C durante 78 horas mínimo para después transferirse a una solución de almacenamiento de PBS+N₃Na 2%. Para hacer cortes histológicos los cerebros se colocaron en una solución de sacarosa al 30 % a 4°C durante 24 h. Los cortes coronales se realizaron con un micrótopo de deslizamiento (Leica RM2235) de 40 μm de espesor de la región hipocampal dorsal (Bregma -1.70 a -2.30 mm), las rebanadas se almacenaron en una solución crioprotectora (300 g sacarosa; 10 g polivinilpirrolidona 40 (PVP-40); 500 mL de 0.1M PBS y 300 mL etilenglicol, para 1L) a -20°C .

Del intestino grueso se extrajo desde la porción del ano hasta el ciego, y también se colectó el contenido intestinal de cada tejido por separado. Al ciego se le retira el exceso de contenido intestinal con PBS estéril. Mientras que el colon se dividió en dos: la sección del colon más proximal al ciego y este mismo son almacenados a -70°C , el resto del colon se resguardó.

6.5. Identificación del gen *csgA* en heces, contenido intestinal y en ciego mediante PCR

6.5.1. Estandarización de PCR anidada y tiempo real

Se utilizó un protocolo estandarizado y previamente validado por nuestro grupo de trabajo, con las secuencias de primers para el gen *csgA*.

CSGA1 (nombre del primer que amplifica a *csgA*) obtiene un amplicón de 210 pares de bases

Forward: 5' TCTGGCAGGTGTTGTTTCCTC 3'

Reverse: 3' GGTCGGGCTCAGATGACAG 5'

CSGA3 (nombre del primer que amplifica a *csgB*, *csgA*, *csgC*) obtiene un amplicón de 1438 pares de bases

Forward: 5' AAGCTTGATAACAGCGTATTTACGTGGG 3'

Reverse: 3' GGATCCCAACTTCGTCAAAGCAATGGG 5'

Se realizaron pruebas de validación y amplificación, observando que la secuencia con mejores resultados para amplificar el gen *csgA*, fue la de CSGA1. Ambos primers se amplifican con el siguiente protocolo de temperaturas:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	3 min	1
95°C	30 s	30
63°C	30 s	
72°C	50 s	
72°C	10 min	1
12°C	∞	

Tabla 6. Protocolo de amplificación del gen *csgA*.

Previo a la extracción de DNA se verificó el protocolo con muestras control (Fig. 14). Los controles que se utilizaron fueron: *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) como control positivo, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) como control negativo, ya que no presenta el gen *csgA*, y agua como control de la reacción (las bacterias fueron cultivadas en el laboratorio

del Dr. Fernando Navarro del Depto. de Biología Celular, CINVESTAV). La extracción de DNA de los controles se realiza a partir de una colonia aislada en medio Luria-Bertani (LB), en 50 μ L de agua milliQ en un tubo Eppendorf que es colocado en agua en ebullición durante 10 min. Posteriormente, se centrifuga a 14000 RPM por 5 min. Se toman 3 μ L del sobrenadante como templado de DNA para la PCR (dependiendo de la cantidad de DNA requerido).

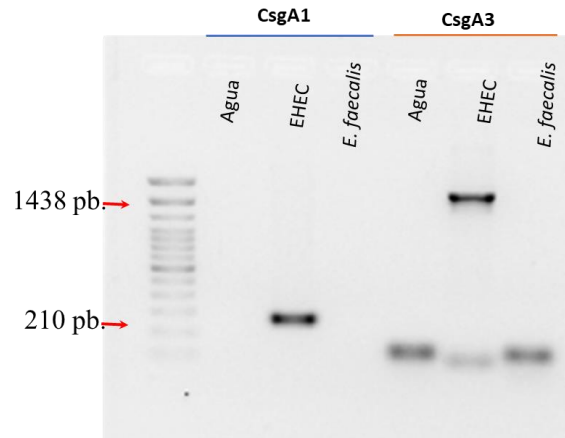


Fig. 14. Gel representativo de PCR punto final de controles con ambos primers para *csgA*.

En el carril 1 se encuentra en DNA Ladder, en el 2 y 5 el agua, el 3 y 6 el control positivo EHEC y en el 4 y 7 el control negativo *E. faecalis*; en los carriles 2-4 se amplificó para con el primer CSGA1 y del 5-7 con el primer CSGA3. Peso molecular del amplificado con CSGA1 es de 210 pb y de CSGA3 de 1438 pb.

Después de completar las muestras de los sujetos experimentales, se realizó la extracción de DNA del ciego por medio de Mini Kit Stool QIAgen para heces y Mini Kit DNA QIAamp para el ciego.

Para PCR de punto final se empleó solo el primer CSGA1. Para PCR anidada se utilizó CSGA3 como primera amplificación, y del primer producto amplificado se tomaron 3 μ L para realizar la siguiente amplificación con el primer CSGA1. Para ambos tipos de PCR se ocuparon los protocolos mencionados anteriormente.

Después de la PCR se realizó la electroforesis en un gel de agarosa (Invitrogen®) al 2% a 100 Volts por 60 min. Se tomaron 10 μ L del amplificado y se mezclaron con 2 μ L de MIDORI Green Advance® para ser colocados en los pozos de agarosa. En el primer pozo siempre se colocan 4 μ L el marcador de peso molecular más 3 μ L H₂O y 1 μ L de MIDORI Green.

Dentro de las estandarizaciones de PCR, se consideró descartar la posibilidad de interferencias en la extracción de DNA por la naturaleza de las muestras de heces. Así que parte de la pruebas fue inocular con EHEC el contenido intestinal del ciego que fue negativo en la amplificación del *csgA* (Fig. 15).

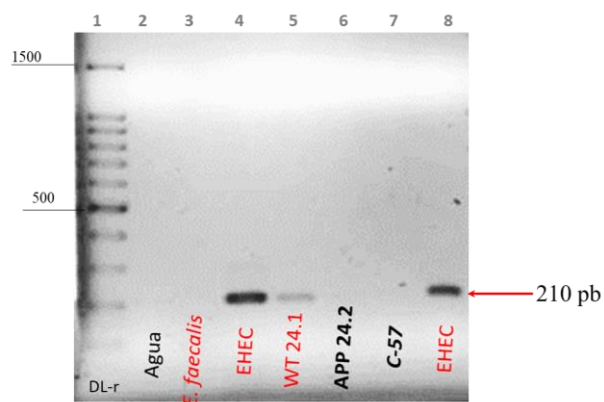


Fig.15 Gel representativo de PCR punto final de contenido intestinal del ciego.

Los controles negativos están en los carriles 2 y 3 se observan limpios. El control positivo en los carriles 4 y 8 se encuentran bien definidos, En los carriles del 5-7, son de sujetos de 4-5 meses. El carril 6 y 7 no presentan banda de amplificación, por los que serán utilizados en la incubación con EHEC. Sujeto silvestre (WT 24.1), Sujeto TG (APP 24.2) y sujeto silvestre de 3 meses (c-57). DNA templado 250 ng. Imagen de gel de agarosa 2 % tomado en el ChemiDoc BioRad.

Se ocuparon seis diluciones seriadas a partir de la dilución inicial de una colonia de EHEC en 100 μ L de PBS estéril, a cada dilución se le midió la densidad óptica a 600 (OD600) para después multiplicarlo por el número de bacterias (8×10^8) que se encuentra en una OD600 y conocer la cantidad de bacterias en los 3 μ L tomados para la PCR (Tabla 7).

#	Dilución	Densidad óptica	Bacterias en 100uL	Bacterias en 3 uL
1	1:1	+++++	-	-
2	1:5	1.2079	12 079 000	362 370
3	1:25	0.2340	2 340 000	70 200
4	1:125	0.0429	429 000	12 870
5	1:625	0.0050	50 000	15 000
6	1:3125	0.0010	10 000	3 000

Tabla 7. Diluciones de EHEC y su correspondiente cantidad de bacterias.

Se realizaron diluciones de EHEC de 1 hasta 3125 y se midieron las densidades ópticas de cada dilución para saber la cantidad de bacterias en 100 μ L. Estos datos permitieron calcular la cantidad necesaria para obtener una banda de amplificación *csgA*.

El volumen que se agregó de la dilución de EHEC fue de 80 mL por cada 25 mg de muestra de heces, después se incubó a 4°C por 24 h, para posteriormente proseguir con el protocolo de extracción de DNA en heces y realizar la PCR punto final para *csgA* (Fig. 16).

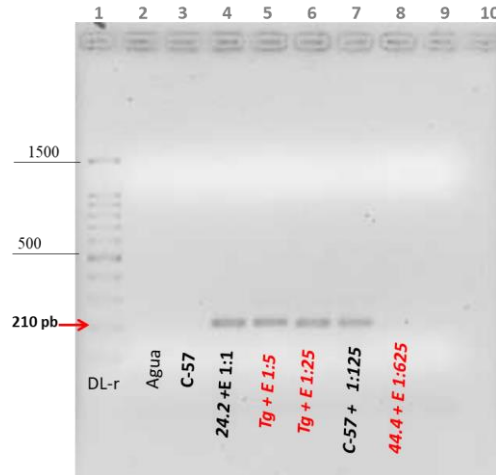


Fig. 16 Gel representativo de PCR punto final de contenido intestinal de ciego incubado con EHEC. Muestras de sujetos de 4-5 meses. Controles negativos en carriles 2 y 3 se observan limpios. El carril 4 (24.2 + E1:1) es muestra del ratón TG más la dilución inicial de EHEC, es decir, la más concentrada presenta una banda bien definida. El carril 5 (Tg + E1:5), el 6 (Tg + E1:25) y el 7 (C-57 + E1:125) son de muestras incubadas con las siguientes diluciones seriadas y aún logra observarse una banda arriba de 200 pb, pero en la última dilución de 1:625 con un ratón TG (44.4 + E1:625) ya no se logra detectar algún amplificado. DNA templado 250 ng. Imagen de gel de agarosa tomado en el ChemiDoc BioRad.

De igual manera se variaron las concentraciones de DNA templado en la PCR, para elegir la mejor cantidad de DNA necesario para la detectar la banda de amplificación de *csgA* (Fig. 17).

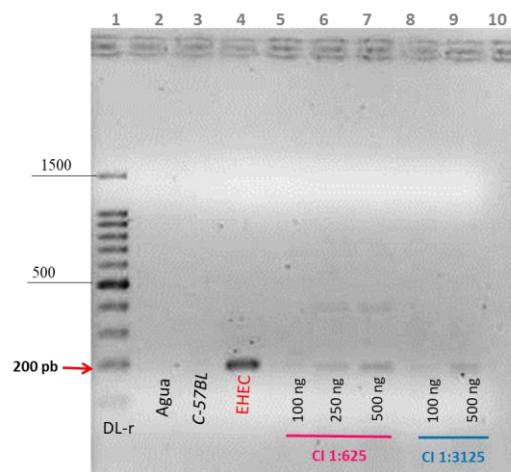


Fig. 17 Gel representativo de producto de PCR punto final de contenido intestinal de ciego incubado con diluciones 1:625 y 1:1125 de EHEC.

Muestras de sujetos de 4 meses. Controles negativos en carriles 2 y 3 se observan limpios, control positivo en el carril 4 se encuentran bien definidos. En los siguientes tres carriles se utilizó la dilución de 1:625 con diferentes concentraciones de DNA disponible (100, 250 y 500 ng), en estas concentraciones se observa la banda de *csgA*. En los dos carriles siguientes se encuentra la dilución 1:1125 se observa una banda tenue en el carril 9 donde se agregaron 500 ng de DNA. Imagen de gel de agarosa 2% tomado en el ChemiDoc BioRad.

Para validar el peso molecular de la proteína curli, se realizó un experimento con ratones C56BL6 de 4 meses inoculados con EHEC (5×10^8 bacterias) para fomentar la carga proteica en las muestras a analizar: los ratones 2 y 4 recibieron tratamiento con Neomicina vía intraperitoneal (antibiótico de amplio espectro) previo a la inoculación, y los ratones 1 y 9 fueron tratados con el vehículo (agua vía intraperitoneal); solo el ratón 10, se inoculó con agua vía oral y no tuvo ningún tratamiento. A los 4 días del tratamiento se llevaron a eutanasia para obtener el contenido intestinal del ciego; este se dividió en dos: en 25 mg de tejido de ciego (T) y en el raspado de las paredes internas de 25 mg del ciego (R) por medio de una espátula de arriba hacia abajo por 10 veces en cada sitio del tejido. El DNA extraído de estos sujetos fue amplificado por PCR anidada para aumentar la probabilidad de ver la presencia del gen *csgA* (Fig. 18).

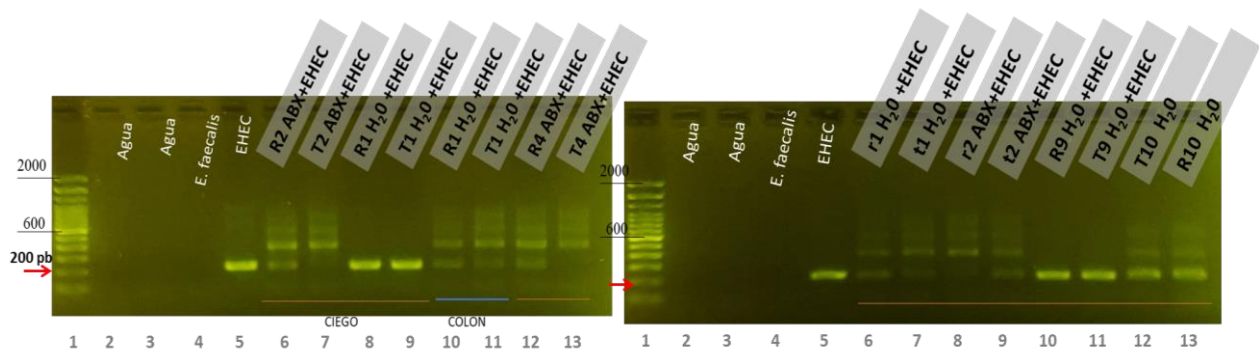


Fig. 18 Geles representativos de PCR anidada de ciego de ratones inoculados con EHEC.

Controles negativos: en carriles 2, 3 y 4 no se observan bandas. Control positivo en el carril 5, EHEC con banda positiva a *csgA*. Las muestras (sujetos machos de 4-5 meses) se encuentran remarcadas con gris, los números indican el sujeto administrado, T indica que es tejido y R que es raspado. Todos los sujetos fueron administrados con EHEC excepto el T10 Y R10 (carril 12 y 13 del gel derecho). Los sujetos R1, T1, R9 y T9 fueron tratados con vehículo (H₂O) y T2, R2, T4 y R4 tratados con antibiótico (ABX). DNA templado 250 ng y se tomaron 3 μ L del amplificado inicial. Imagen del gel de agarosa tomada en un fotodocumentador de luz azul.

En las validaciones de la extracción de DNA y detección del gen *csgA*, también se realizó PCR en tiempo real (qPCR). Esta variación de PCR nos ofrece mayor sensibilidad, reproducibilidad y menor riesgo de contaminación, ya que la generación del amplicón se

puede observar conforme a la amplificación, sin necesidad de visualizar el producto en un gel de agarosa.

Se realizaron pruebas con el primer CSGA1 en el equipo Step One Real-Time PCR System, Applied Biosystems (en el laboratorio del Dr. Jaime García Mena del Depto. de Genética y Biología molecular, CINVESTAV), usando la enzima de NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x), ROX plus, Nyztech MB22202, 50 ng de DNA templado y con el siguiente protocolo (Tabla 8):

Protocolo termociclador	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	10 minutos (1 ciclo)
Desnaturalización	95 °C	15 segundos
Alineación	63 °C	30 segundos
Elongación	72 °C	30 segundos
		(40 ciclos)

Tabla 8. Protocolo de amplificación de *csgA* por qPCR.

Los valores obtenidos en una qPCR están representados en la gráfica de la cinética de amplificación (Fig. 19), también llamada Amplification plot. Para efectuar los ensayos de cuantificación dentro de la fase donde la etapa de eficiencia de amplificación es muy cercana al 100 %, es necesario definir el punto de intensidad de fluorescencia (umbral), en el cual las muestras pueden ser comparadas entre sí. Este umbral de detección se establece de acuerdo con el background de fluorescencia y equivale a 10 veces la desviación estándar de la media de emisión de la línea base. Al ciclo en el cual cada muestra consigue llegar a este umbral de detección, se le conoce como C_T (Treshold cycle). De esta forma el C_T es un numero fraccional que indica cuantos ciclos le tomó a cada muestra generar una cantidad suficiente de fluorescencia para llegar al umbral de detección.

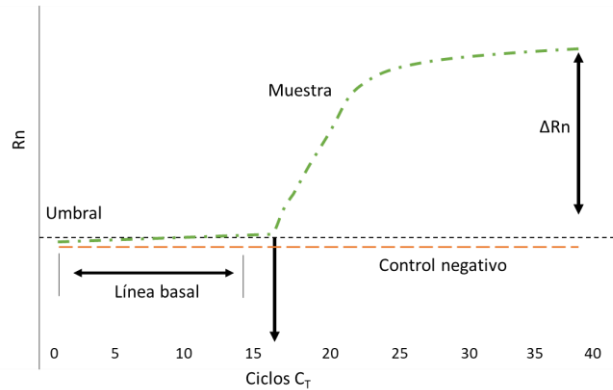


Fig. 19 Gráfica de amplificación de qPCR.

En el eje x se observan los ciclos, mientras en el eje y se observan los valores de fluorescencia. En verde se observa la fluorescencia obtenida por una muestra positiva. En rojo se denota la señal del control negativo (NTC). La línea base típicamente abarca de los ciclos 5 al 15. El umbral se fija con los valores de la línea base (línea punteada en negro). R_n , magnitud de la señal y ΔR_n , intensidad de la emisión de la fluorescencia.

El valor de C_T es directamente proporcional a la cantidad inicial de templado y es el fundamento para calcular la cantidad de DNA. Mientras mayor cantidad de DNA se encuentre en una muestra, menor es el número de ciclos requeridos para alcanzar el umbral de detección.

Las gráficas melt curve (Fig. 20) generadas por el equipo, proporcionan información sobre el producto generado, ya que dependiendo de la temperatura y el tiempo, indirectamente proporciona el tamaño del amplificado, cuando el producto tiene una T_M (temperatura necesaria para separar las doble cadenas formadas de la amplificación) baja, indica que el producto es pequeño y probablemente es resultado de acumulación de primers, en cambio cuando es una T_M mayor indica que se formó el amplificado de esperado.

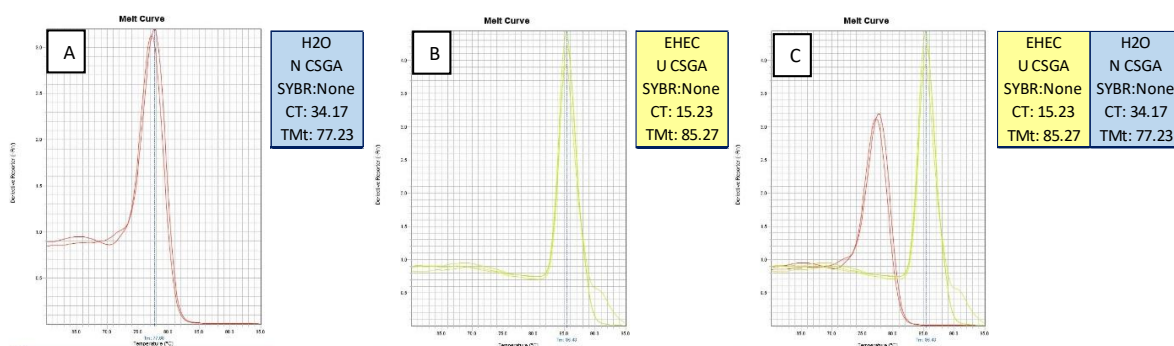


Fig. 20 Gráfica melt curve de amplificación de qPCR.

En el eje de x se observa la temperatura, mientras en el eje y se observan los valores de fluorescencia. **(A)** Melt curve de control negativo para *csGA*, tiene una C_T alta (34.17) y una T_M baja (77.23). **(B)** Melt curve de control positivo para

csgA, tiene una C_T baja (15.23) y una T_M alta (85.27). (C) Melt curve de los controles para *csgA* sobrepuesta, se observan diferencia en la curvas que indican que los productos formados no son los mismo.

6.6. Identificación de la proteína curli en tejido de ciego

Para la extracción de proteínas, se utilizó 25 mg de ciego, se homogeneizó con amortiguador de lisis: RIPA + Inhibidor (1% de Igepal CA-630, 0.5% desoxicolato de sodio, dodecil sulfato de sodio al 0.1%, fluoruro de sodio 1 mM, ortovanadato de sodio 2 mM y coctel inhibidor de proteasa). Los homogenados se centrifugaron a 12000 RPM por 10 minutos a 4°C. La proteína total se cuantificó en el sobrenadante con base en una curva de albúmina sérica bovina (BSA) (0-50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) que se lee a 562 nm. El sobrenadante cuantificado se almacenó a -20°C.

Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida (12%) y mediante electroforesis SDS-PAGE por 90 min a 100 V se separaron las proteínas. Posteriormente, se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (2.5 A, 22 V por 35 min). La membrana se bloqueó durante dos horas con solución de bloqueo (Biorad® Blotting-Grade Blocker 170-6404) al 5% a temperatura ambiente y se incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario curli (1:2000, CUSABIO Z1676) con 1% de sol. de bloqueo (peso molecular 57 kDa).

Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo (1:20000, Invitrogen 65-6120) con 1% de sol. de bloqueo. Después de una segundo bloqueo de una hora, se incubó con β -actina (1:500, Santa Cruz SC4778) con 1 % de sol. de bloqueo, como control de carga. Las membranas fueron tratadas con una solución reveladora (amortiguador ECL - Femtomolar) para obtener las imágenes en el ChemiDoc™ XRS (Depto. de Biomedicina Molecular, CINVESTAV). El análisis de imágenes se realizó con el software ImageLab. Los ensayos se realizaron por triplicado utilizando transferencias independientes.

6.7. Cuantificación de TLR4 en ciego y cerebro

Se tomaron muestras de cerebro y ciego (20 mg y 25 mg, respectivamente), los cuales se homogeneizaron con amortiguador de lisis: RIPA + Inhibidor de proteasa. Los homogenados se centrifugaron a 12000 RPM por 10 min a 4°C. La proteína total se cuantificó en el

sobrenadante con base en una curva de BSA (0-50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) que se lee a 562 nm. El sobrenadante cuantificado se almacena a -20°C .

Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12% y se llevó a cabo el mismo protocolo de electroforesis y transferencia para Curli (ver sección 5.5.3). Las membranas se dividieron en el peso de 50 kDa, y se bloquearon una sola vez por una hora para poder incubar por separado dos anticuerpos durante toda la noche a 4°C . La parte superior de la membrana se incubó con el anticuerpo TLR4 (1:500, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY-293072, 95-120 kDa) y la parte inferior con β -actina (1:500, Santa Cruz SC4778, 43 kDa) con 1% de sol. de bloqueo, como control de carga.

Las membranas completas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón (1:20000, Jackson 115-035-145) con 1% de sol. de bloqueo. Se reveló en el equipo ChemiDoc™ XRS (Depto. de Biomedicina Molecular, CINVESTAV). El análisis de imágenes se realizó con el software ImageLab. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada tejido, utilizando transferencias independientes.

6.8. Determinación por inmunofluorescencia de A β 1-42 y K99 (proteína del pili de E. coli) en cerebro

Los cortes de cerebro almacenados en solución crioprotectora se lavaron en PBS-1X y se dejan reposar toda la noche a 4°C . Se trataron las rebanadas con ácido fórmico (J. T. Baker, 0128) por 15 min y posteriormente con buffer de citratos (Sigma, S6639-1L) a 94°C por 10 min, con el fin de desenmascarar los epítomos. Para retirar el PFA se lavó con NaBH_4 1%. Después, se permeabilizó el tejido con PBS-tritón (PBS-t) 0.2 % (tritón X-100, Affy metrix, 9002-93-1) por 20 min. Tras realizar varios lavados con PBS-t 0.2 %, se bloqueó la unión inespecífica de anticuerpos con BSA 3% (Sigma, A9085-256) por 30 min. Debido a que el anticuerpo K99 es anti-ratón, se utilizó un anticuerpo contra las IgG de ratón (Goat F (AB) Anti-mouse, 1:500, ABCAM AB6668) por 1 h para impedir la unión del anticuerpo secundario anti-ratón a los anticuerpos IgG endógenos. Posteriormente, se lavó el tejido con PBS-t y se incubó con los anticuerpos primarios K99 (1:300, LifeSpan Biosciences LS-C83195) y A β -42 (1:300, Invitrogen 44-344) diluidos en PBS-t al 0.2 % durante toda la noche a 4°C .

Posteriormente las rebanadas se lavaron con PBS-1X para después agregar el anticuerpo secundario Alexa Flour 488 anti-ratón (1:500, Jackson ImmunoResearch 715545150) y Cy3 anti-conejo (1:500, Jackson ImmunoResearch 711165152) diluidos en PBS-t al 0.2 % y 5 % de suero de burro (Vector Laboratories, S-2000) por 2 h a temperatura ambiente.

Después de incubar el anticuerpo secundario los lavados siguientes se hicieron con PBS-1X. Los cortes se incubaron en 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, marcador del núcleo celular) 1:1000 diluido en PBS-t al 0.2 %, por 30 min. Se incubaron los tejidos en Negro Sudán 0.1 % (elimina la autofluorescencia) en alcohol absoluto por 15 min para finalmente montar con VectaShield (Vector Laboratories, H-1000). Las imágenes de los dobles marcajes fueron tomadas con el microscopio confocal Leica TCS-SP8 utilizando el programa Leica LAS X.

6.8.1. Toma de imágenes de la inmunofluorescencia

Las imágenes de los dobles marcajes por inmunofluorescencia de A β 1-42 y K99 fueron tomadas en un microscopio confocal Leica TCS-SP8, equipado con los laser diodo (405 nm), OPSL (488 nm), OPSL (552 nm) y diodo (638 nm). Los laser siempre se utilizaron con el diámetro pinhole optimizado. Para la captura de imágenes se usó el objetivos 40x, mediante el programa Leica LASX. Todas las imágenes se obtuvieron como secciones en el eje z (z-secciones) de un plano óptico. Las secciones obtenidas se sobrepusieron en una imagen (proyección máxima) utilizando el software LASX (Fig. 21). La imágenes obtenidas se separaron en zona de la corteza y zona del hipocampo; solo se tomaron planos donde estuviera presente las placas A β 42 en estas regiones. Se usaron tres rebanadas por cada sujeto.

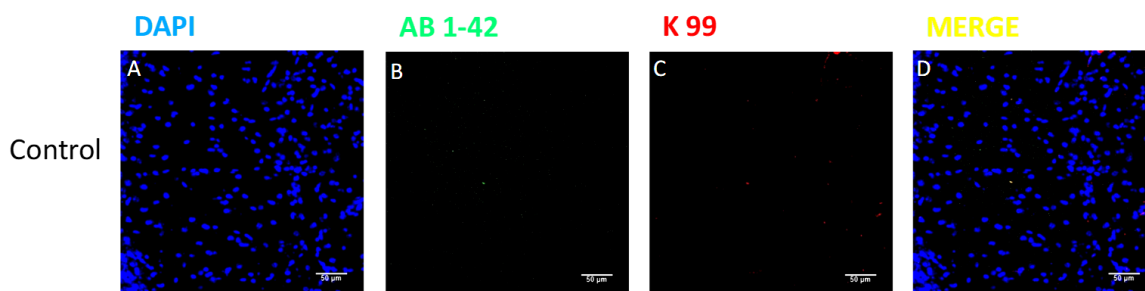


Fig. 21 Control de Inmunofluorescencia de K99 y A β 1-42 en cerebro.

No se observó inmunoreactividad contra placas β -amiloideas (**B**) ni contra K99 (**C**), en ausencia del anticuerpo primario. DAPI en A y el merge del doble marcaje en D. Escala de barra 50 μ m. Las imágenes fueron capturadas a 40x Oil con zoom 0.75.

6.8.2. Presencia y cuantificación de A β 1-42 y K99

Los sujetos que presentaron placas A β 1-42 fueron solo los TG, n=9, en quienes se evaluaron imágenes de la corteza y del hipocampo dorsal, por triplicado (ver sección 6.5.1), dando un total de rebanadas analizadas de 27. La cuantificación de placas amiloideas se obtuvo por la siguiente ecuación:

$$\text{placas } A\beta/\text{mm}^2 = \frac{\# \text{ placas por zona}}{A_T}$$

Donde # placas por zona, es la cantidad total de placas A β encontradas en la zona (de la corteza o del hipocampo); dividido entre A_T, que es el área total de la zona, el cual se calculó con imágenes tomadas a 20x del cerebro de cada rebanada, que fueron analizadas mediante el software ImageJ, por medio de un ajuste de escala (Analyze-set Scale) al introducir una medida conocida al programa (ej. el ancho de la imagen dada por LASX) ajustada a μm^2 .

6.9. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de t-student no pareada para comparar los datos entre grupos experimentales para las pruebas conductuales, la densidad de TLR4 y el número de placas A β y se utilizó regresión lineal y la correlación de Pearson para las placas A β con K99. Se utilizó el software Prism (GraphPad v.9). Los resultados fueron considerados significativos cuando $p < 0.05$.

7. Resultados

7.1. Los ratones APP/PS1 presentan alteraciones en la conducta y en la memoria de trabajo

La EA se caracteriza por alteraciones en la memoria, acompañadas de altos niveles de ansiedad (Pentkowski et al. 2018). Para conocer el estado de ansiedad que presentaban los ratones TG, se realizó la prueba del EPM. Se observó que los ratones TG permanecen mayor tiempo en la zona de indecisión (TG 50% y WT 29%) y menor tiempo explorando los cuatro brazos del laberinto en comparación con los ratones WT (Fig. 22).

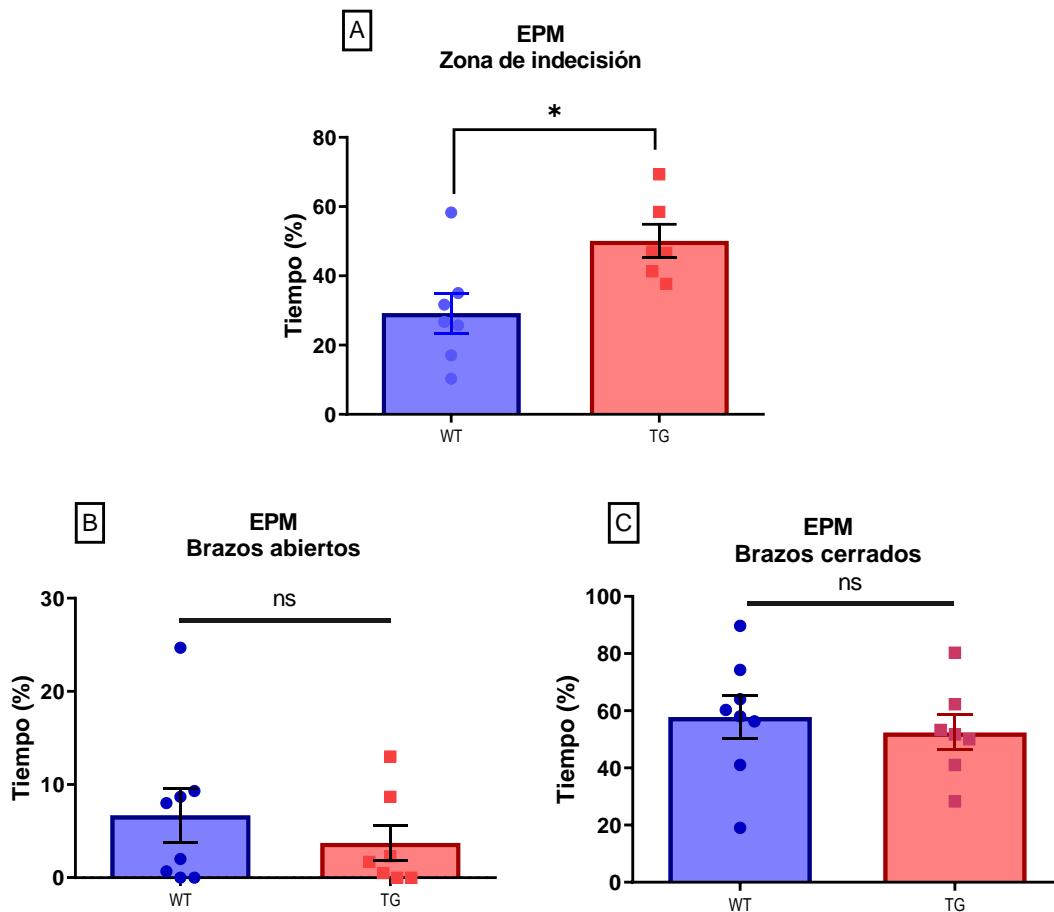


Fig. 22 Evaluación de la ansiedad mediante el Laberinto Elevado en Forma de Cruz (EPM).

(A) Porcentaje de tiempo que los ratones pasan en la zona de indecisión. Se observa que los ratones TG tienen mayor tiempo de permanencia en la zona de indecisión que sus pares WT. (B y C) Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (B) y cerrados (C). Se observa una tendencia de los ratones TG de pasar menos tiempo en los brazos cerrados y en los abiertos en comparación de los ratones WT. Los datos representan la media \pm S.E.M. de cada grupo. Las significancias se consideran cuando $p < 0.05$. Se utilizó una t-student no pareada ($*p < 0.05$).

También se evaluó la memoria de trabajo mediante el laberinto en forma de T. Esta prueba nos permite determinar el daño en la memoria de trabajo dependiente del hipocampo y la corteza prefrontal. Los resultados muestran una disminución significativa en la alternancia en el grupo TG en comparación del grupo WT ($p < 0.05$) (Fig. 23). Esto indica que existe daño en la memoria de trabajo en los ratones TG de 8 meses de edad, similar al daño presentado en pacientes con la EA.

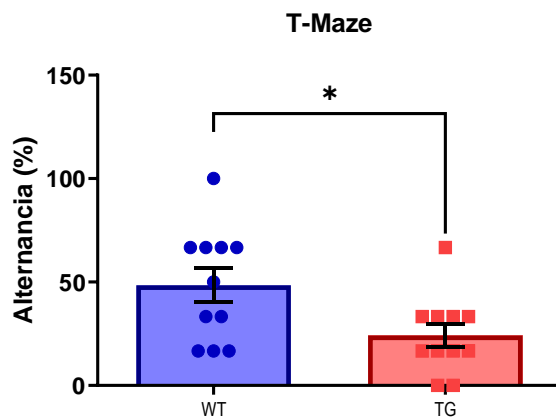


Fig.23 Evaluación de la memoria de trabajo mediante el laberinto en forma de T (T-Maze).

El porcentaje de alternancia de los grupos experimentales muestra una diferencia significativa en los sujetos TG (24%) al comparar con el grupo WT (48%). Los datos representan la media \pm S.E.M. de cada grupo. Las significancias se consideraron cuando $p < 0.05$. Se utilizó una t-student no pareada (* $p < 0.05$).

7.2. El gen *csgA* está presente tanto en ratones TG como en WT

La cantidad de DNA que se obtuvo de las muestras de heces de ratones no fue suficiente, debido a la enorme variedad de especies microbianas, lo cual dificultó la detección del gen *csgA* por PCR de punto final (Fig. 24).

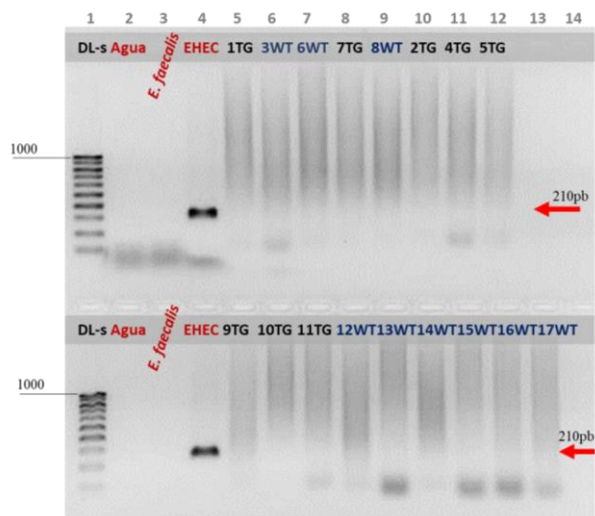


Fig. 24 Gel representativo del producto de PCR punto final del contenido intestinal del ciego en los grupos experimentales.

En color azul están los ratones WT (n=8: 3WT, 6WT, 8WT, 12-17WT) y en color negro los TG (n=9: 1TG, 2TG, 4TG, 5TG, 9TG-11TG). Los controles en los carriles 2, 3 y 4: agua, control negativo *E. faecalis* y control positivo EHEC (*E. coli* Enterohemorrágica), respectivamente. Peso molecular de *csgA* 210 pares de bases, DNA templado 500 ng, gel 2% de agarosa.

Para determinar la presencia del gen de interés en el contenido intestinal, se realizó una incubación de diluciones de colonias de EHEC en muestras de contenido intestinal de ciego (ver apartado 1.5.2), y se calculó que la concentración mínima de bacterias portadoras del gen *csgA* debe ser de 15,000 bacterias para amplificar el gen (Fig. 16).

Además de haber detectado una banda intensa en 210 pb en las muestras de ciego de ratones inoculados (Fig. 19), está no fue detectada con facilidad en muestras de ratones sin inoculación. Por lo cual, se decidió extraer el DNA de un raspado de las paredes del ciego, ya que se sabe que las fibras curli se insertan en el epitelio para poder invadir el tejido (Zogaj et al., 2003). Después de cuantificar el DNA obtenido de estas muestras, se realizó PCR anidada con 500 ng de templado. La presencia de *csgA* sólo pudo ser detectada en un sujeto TG y uno WT (Fig. 25).



Fig. 25 Gel representativo del producto de PCR anidada de raspado del ciego.

Muestras de los grupos experimentales de 8 meses. Wild type en color azul (n=8: 3WT, 6WT, 8WT, 12-17WT) y en color negro los transgénicos (n=9: 1-2TG, 4-5APP, 7TG, 9TG-12TG). Controles negativos: el carril 2 de agua es de la segunda reacción y el carril 3 de la primera amplificación, y carril 4 *E. faecalis*. Control positivo: carril 5 EHEC. Se observaron dos bandas correspondientes al peso de *csgA*, el sujeto transgénico 4 (4TG) y el wild type 17 (17WT). ADN templado 250 ng. Imagen de gel de agarosa tomado en el ChemiDoc BioRad.

Finalmente, y debido a las dificultades para poder detectar y hacer cuantificable la detección del gen *csgA* por PCR punto final, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) con 50 ng de ADN extraído del raspado de ciego. Se mantuvieron las condiciones recomendadas de amplificación en el equipo de StepOne Real-Time PCR System (Fig. 20). Las melt curve de la qPCR muestran los amplificadores en la reacción, por lo que se espera una sola meseta cercana a T_M del control positivo para verificar que el amplificado es el que se espera (Fig. 26). En qPCR se detectó que la amplificación del *csgA* era poco variable en las C_T de ambos grupos experimentales, por lo tanto, los resultados no muestran diferencia significativa entre la cantidad de *csgA* entre los ratones WT y TG (Fig. 27).

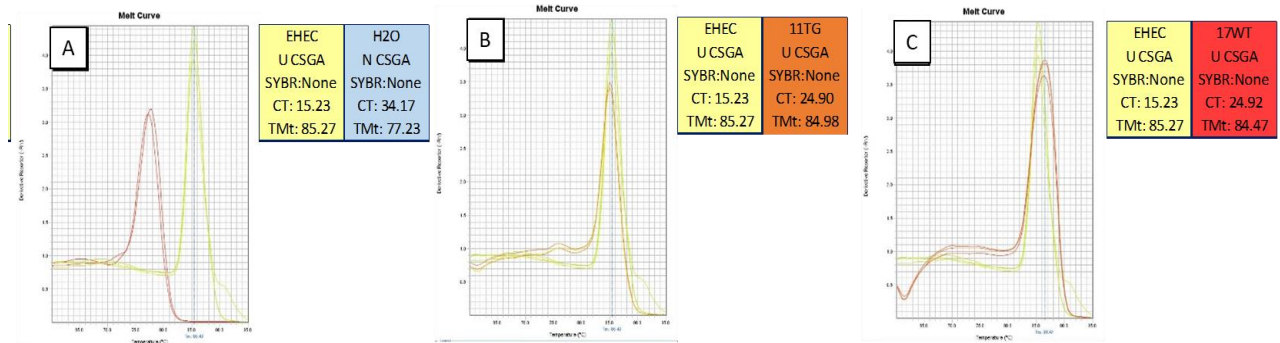


Fig. 26 Melt Curve de qPCR de muestras de raspado de ciego.

Curvas de detección de la amplificación de *csgA*. En el eje de x se observa la temperatura, mientras en y los valores de fluorescencia. En A se observa que las curvas de los controles (EHEC en amarillo y Agua en fucsia) son diferentes entre ellos, ya que tanto la C_T como la T_M son diferentes (C_T de EHEC= 15.23, y C_T del Agua=34.17) y no existe riesgo de tener falsos positivos en la amplificación. En B y C se comparó el control positivo (EHEC) con una muestra de TG y WT, respectivamente. Se observa que ambas muestras cumplen con las características de amplificación de EHEC, y que hay poca variación en sus C_T (24.90 y 24.92, respectivamente). DNA templado 50ng, con NZYSpeedy qPCR Green Master Mix a 40 ciclos.

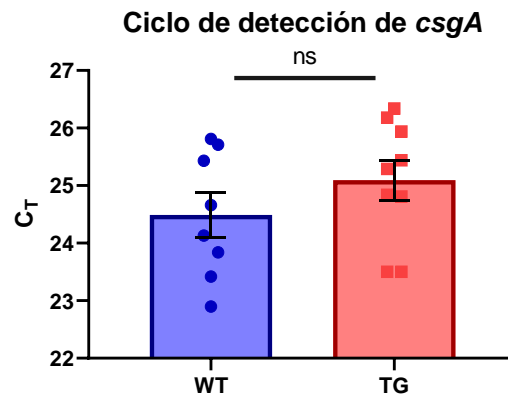


Fig.27 C_T de qPCR de muestras de raspado del ciego.

Muestras de los grupos experimentales de 8 meses. Sujetos WT en color azul (n=8) y en color rojo los TG (n=9). Para el análisis se utilizó el promedio de cada muestra por triplicado. DNA templado 50 ng. Los datos representan la media +/- S.E.M. de cada grupo. Las significancias se consideraron cuando p<0.05. Análisis estadístico t-student no pareada.

7.3. La proteína curli se expresa en mayor cantidad en el ciego de ratones TG

Al cuantificar la cantidad de curli mediante WB en muestras de ciego, se observó que no todos los sujetos mostraban una la banda a 57 kDa. Sin embargo, los promedios por grupo muestran una diferencia significativa en ratones TG en comparación de ratones WT. Esto

quiere decir que, aunque el gen *csgA* se haya detectado en ambos grupos experimentales, solo los ratones TG muestran una alta producción de la proteína curli (Fig. 28).

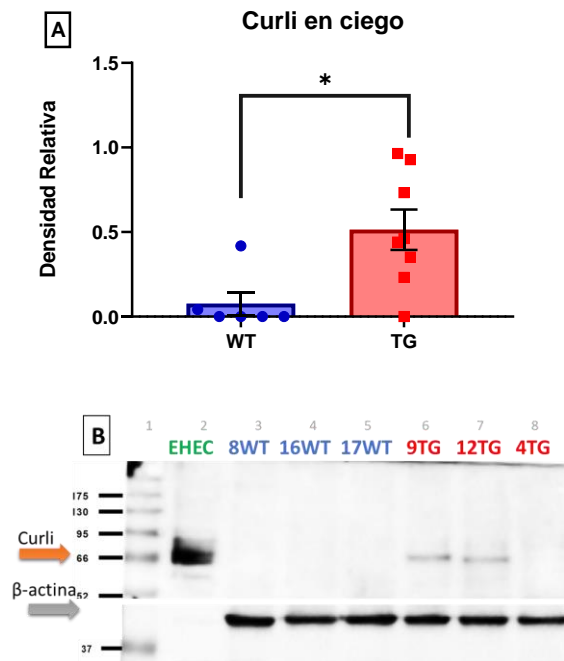


Fig. 28 Niveles de curli en ciego de ratones WT y TG.

(A) Los ratones TG (n=8) muestran una mayor cantidad de curli en el ciego en comparación de sus pares controles (WT, n=7). (B) Membrana representativa donde se muestra la presencia de curli (flecha naranja, 55-66 kDa) y β -actina (flecha gris, 43 kDa) como control de carga. Cada muestra se corrió por triplicado. Como control interno se usó proteína extraída de colonias de EHEC, diluida en PBS estéril. Los datos representan la media \pm S.E.M. de cada grupo. Las significancias se consideraron cuando $p < 0.05$. Análisis estadístico t-student no pareada.

7.4. Marcador de inflamación en el intestino de ratones TG y WT

Se determinó la presencia de TLR4 en el ciego de ratones TG y WT de 8 meses de edad. No se observó ninguna diferencia significativa entre los grupos (Fig. 29). Esto pudiera estar relacionado con la inespecificidad de curli a unirse a TLR4, pero con mayor afinidad por el TLR2 (Das et al., 2022). Sin embargo, en este proyecto no pudimos evaluar TLR2 en las muestras.

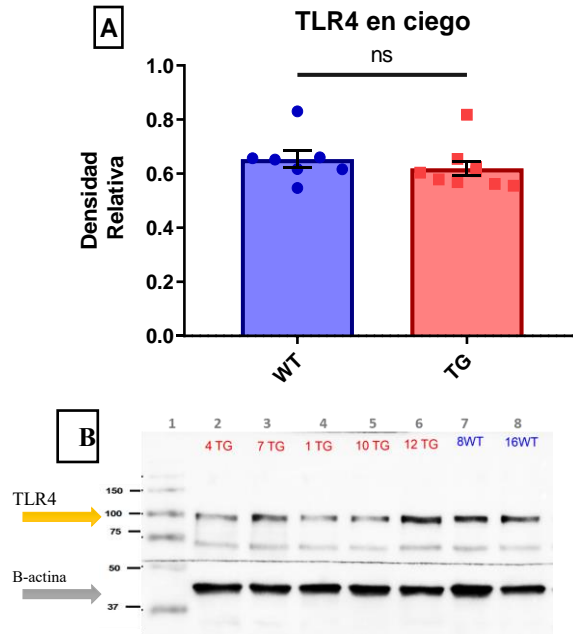


Fig. 29 Niveles de TLR4 en ciego de ratones WT y TG.

(A) No se observa ninguna diferencia en la cantidad de proteína entre los grupos experimentales (TG, n=8, WT=7). (B) Membrana representativa para TLR4 (90-100 kDa) y β -actina (43 kDa) como control de carga. Cada muestra se corrió por triplicado. Los datos representan la media \pm S.E.M. de cada grupo. Las significancias se consideraron cuando $p < 0.05$. Análisis estadístico t-student no pareada.

7.5. Los ratones TG muestran un estado proinflamatorio a nivel cerebral

Al evaluar la presencia de TLR4 en la corteza cerebral de los ratones, se observó un aumento significativo en la densidad relativa de TLR4 en los ratones TG en comparación con los WT (Fig. 30). Esto nos pudiera indicar que el cerebro de los ratones TG se encuentra en un estado proinflamatorio, probablemente respondiendo a la acumulación de placas amiloideas y/o agentes neurotóxicos, como proteínas amiloideas bacterianas (fibras curli).

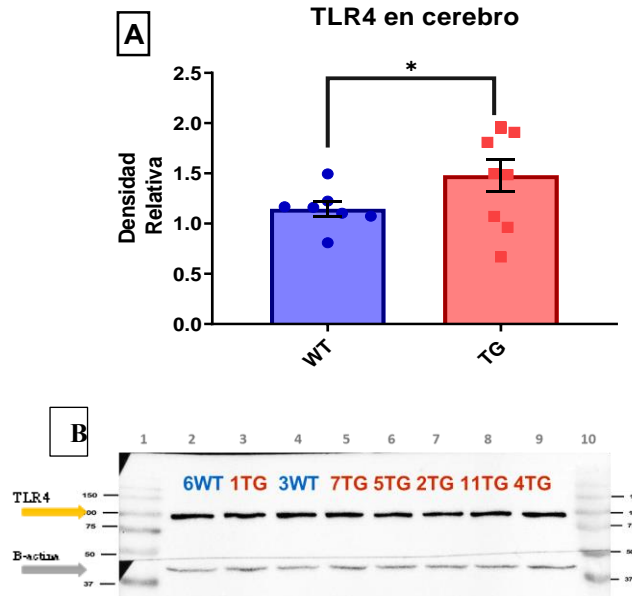


Fig. 30 Niveles de TLR4 en muestras de cerebro de ratones WT y TG.

(A) Se observa un aumento en la densidad relativa de TLR4 en el cerebro de ratones TG (TG, n=9) al comparar con sus pares silvestres (WT=8). ($p < 0.05$). (B) Membrana representativa de TLR4 (90-100 kDa) y β -actina (42 kDa) como control de carga. Cada muestra se corrió por triplicado. Los datos representan la media \pm S.E.M. de cada grupo. Las significancias se consideraron cuando $p < 0.05$. Análisis estadístico t-student no pareada.

7.6. En cerebros de ratones TG se observa una interacción de proteínas de bacterias productoras de curli con las placas $A\beta$

Los resultados conductuales indican la presencia de cognitivo en los ratones TG. Además, observamos una mayor inflamación cerebral (TL4) en este grupo, que se caracteriza por la acumulación de péptidos β -amiloide en hipocampo y corteza (Radde et al., 2006). Para determinar la posible interacción entre la abundancia de curli y disbiosis intestinal con la agregación amiloide se realizó una inmunofluorescencia de las placas amiloideas con el anticuerpo $A\beta$ 1-42. Solo los ratones TG muestran placas amiloideas, tanto del tipo difusas como compactas, en regiones relacionadas con procesos cognitivos, principalmente en el hipocampo (Fig. 31).

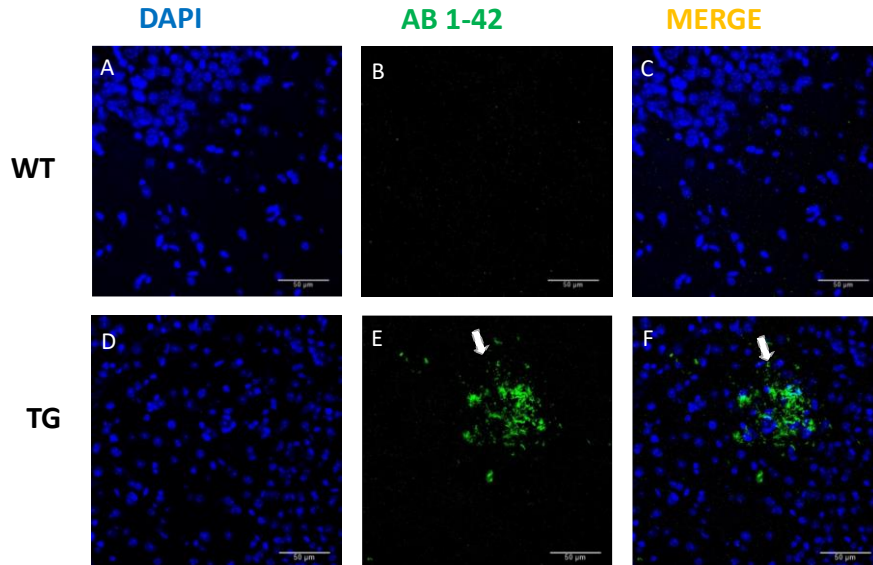


Fig. 31 Imagen representativa de la inmunofluorescencia de placas β -amiloideas en corteza de ratones WT y TG.

Placas positivas a A β 1-42 se muestran en color verde (E) las cuales sólo se encontraron presentes en ratones TG. Barra de escala 50 μ m. Las imágenes fueron capturadas a 40x Oil con zoom 1.0.

Por otra parte, se utilizó el anticuerpo K99 el cual detecta proteínas del pili de *E. coli* (Fig. 32). Nótese que *E. coli* es una bacteria productora de proteína curli, por lo tanto, encontrar la marca de K99 aumenta la posibilidad de detectar las fibras de curli en el tejido.

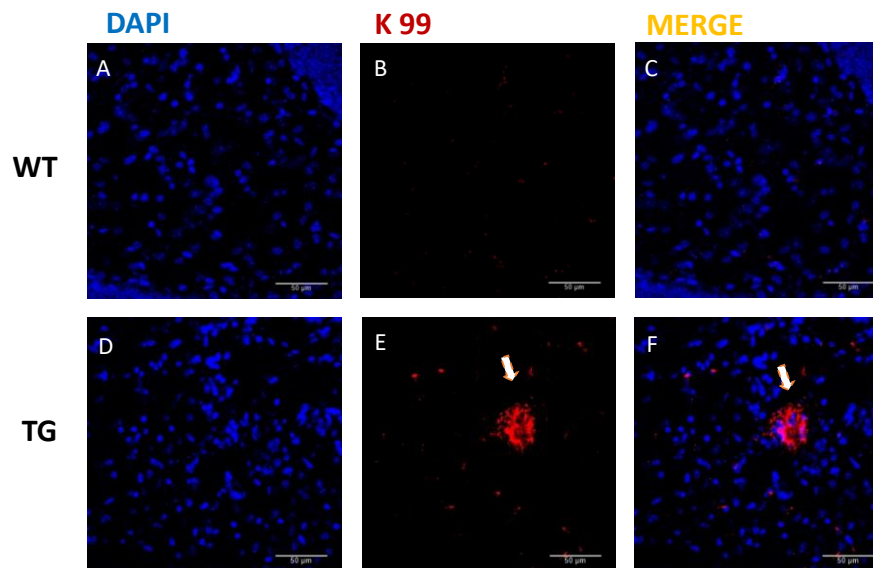


Fig. 32 Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de K99 (proteína del pili de *E. coli*) en rebanadas de hipocampo de ratones WT y TG.

En color rojo se muestra K99. En los sujetos WT la marca de K99 no fue detectable (**B**). En los sujetos TG se pudo detectar la marca de K99 tanto en la corteza como en el hipocampo. Barra de escala 50 μm , las imágenes fueron capturadas a 40x Oil con zoom 1.0.

Para poder determinar una marca positiva de la proteína K99 se consideraron los siguientes criterios:

- Tener un tamaño mayor a 10 μm si se encuentra en forma de agregado proteico.
- No formar parte, ni estar dentro de los capilares.
- No mostrar formas rectangulares, ya que indicaría marcaje inespecífico (ej. acumulación del anticuerpo en la vasculatura).

Se realizó un doble marcaje con anticuerpos específicos para A β 1-42 y K99, para poder determinar la posible colocalización de las placas amiloideas y las proteínas bacterianas. Primero se valoró la especificidad de cada anticuerpo y la ausencia de señal en muestras sin anticuerpo primario (control negativo) (ver sección 6.5.6, Fig. 21).

Las microfotografías del doble marcaje muestran que K99 suele estar cerca de la placas amiloideas, e incluso, K99 puede estar rodeada por las placas, o puede colocalizar con ellas tanto en hipocampo (Fig. 33) como en corteza (Fig. 34) de ratones TG.

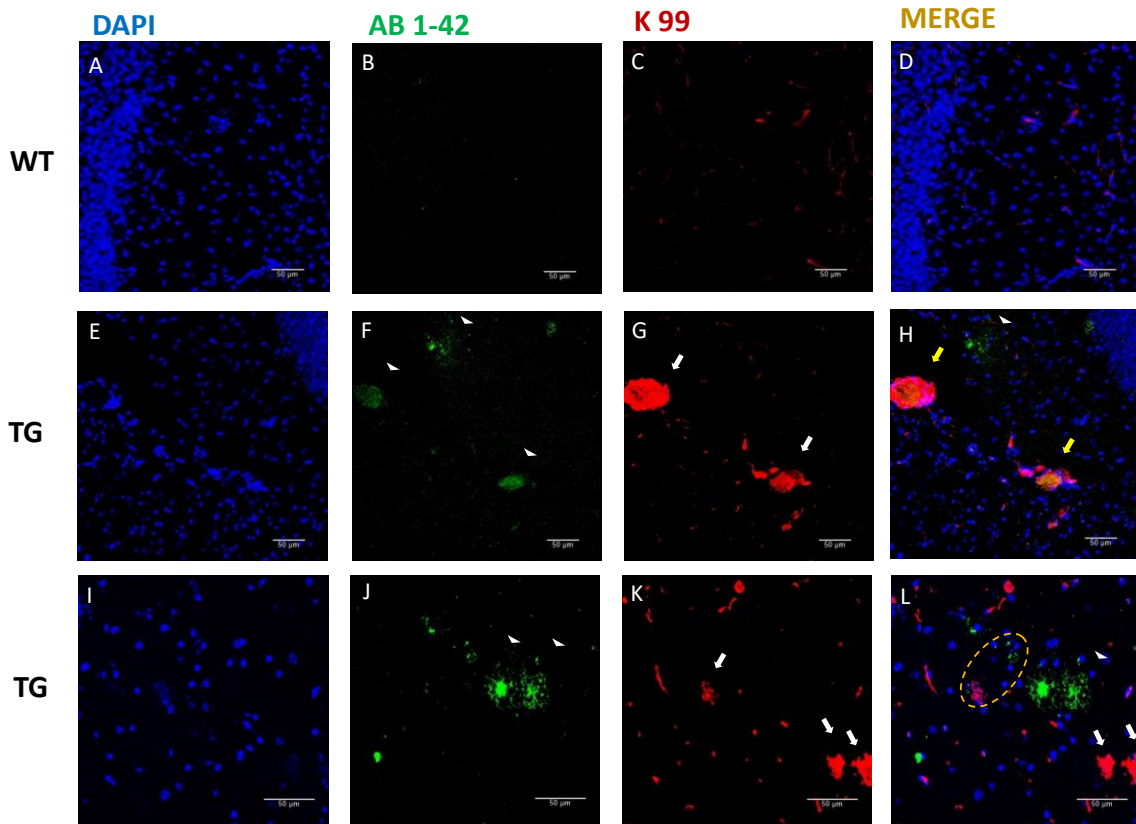


Fig. 33 Inmunofluorescencia de K99 de *E. coli* y A β 42 en hipocampo de los ratones WT y TG.

En ratones WT no es apreciable ninguna marca (**D**). En ratones TG se observan placas β -amiloideas (puntas de flecha blancas, **F** y **J**) y K99 (flechas blancas, **G** y **K**). Al sobreponer los canales se observa una cercanía (menos de 50 μ m) (circunferencia punteada en naranja, **L**) o colocalización (flechas amarillas, **H**) entre las marcas. En ratones TG las marcas positivas a K99 fueron localizadas cerca (menos de 50 μ m) de las placas amiloideas (**L**). Barras de escala 50 μ m. Las imágenes fueron capturadas a 40x Oil con zoom 0.75 (con zoom 1.0 **I**, **J**, **K**, **L**).

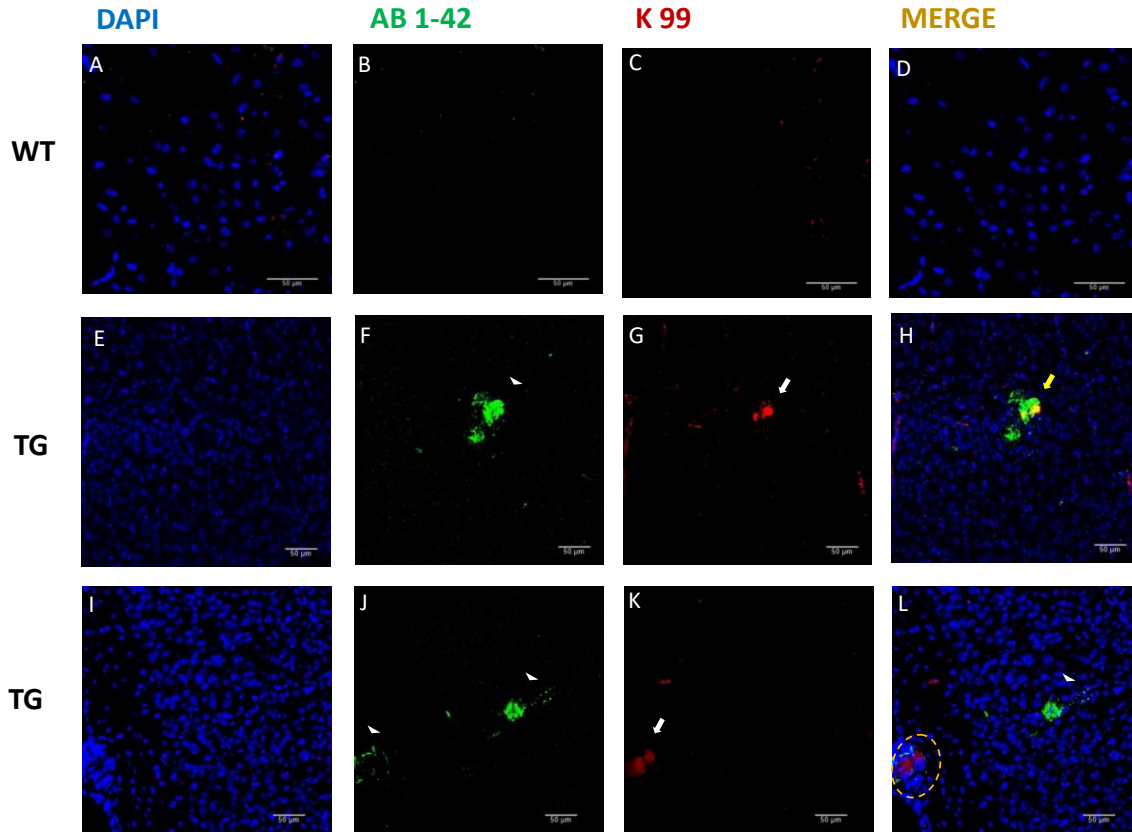


Fig. 34 Inmunofluorescencia de K99 de *E. coli* y A β 42 en corteza cerebral de los ratones WT y TG.

En ratones WT no es apreciable ninguna marca (D). En ratones TG se observan placas β -amiloideas (puntas de flecha blancas, F y J) y K99 (flechas blancas, G y K). Al sobreponer los canales se observa la cercanía (menos de 50 μ m) (circunferencia punteada en naranja, L) o colocalización (flechas amarillas, H) entre los canales. En los ratones TG las marcas positivas a K99 fueron localizadas cerca (menos de 50 μ m) de las placas amiloideas (L). Barras de escala 50 μ m. Las imágenes fueron capturadas a 40x Oil con zoom 0.75 (con zoom 1.0 A, B, C, D).

La cuantificación de la cantidad de placas amiloides que colocalizan o están cercanas a K99, está representado en las siguientes graficas (Fig. 35), donde se observa que en hipocampo hay menor cercanía entre K99 con la placas A β . Por lo que también se analizó la correlación de ambas variables (Fig. 36) y se obtuvo una correlación negativa en la cercanía de K99 con las placas A β en hipocampo, indicando que entre mayor cantidad de placas A β menor presencia de K99, esto podría deberse al efecto antimicrobiano de A β .

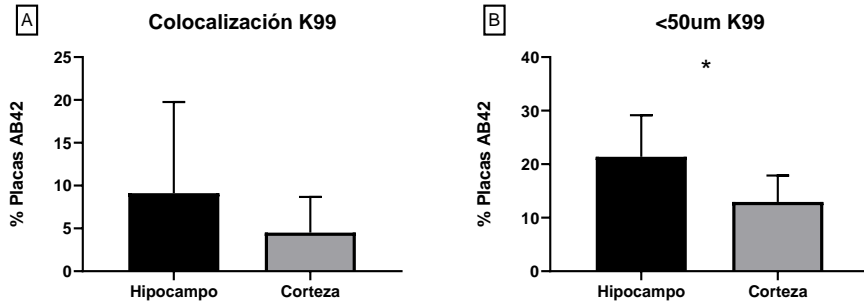


Fig. 35 Porcentaje de colocalización y cercanía de K99 con las placas Aβ.

El porcentaje de colocalización (A) tiende a ser mayor en el hipocampo que en corteza. Se encontró una mayor distancia entre K99 y las placas en el hipocampo que en corteza (B). Los datos representan la media +/- S.E.M. de cada grupo. Las significancias se consideraron cuando $p < 0.05$. Análisis estadístico t-student no pareada, $n=9$, * $p < 0.05$.

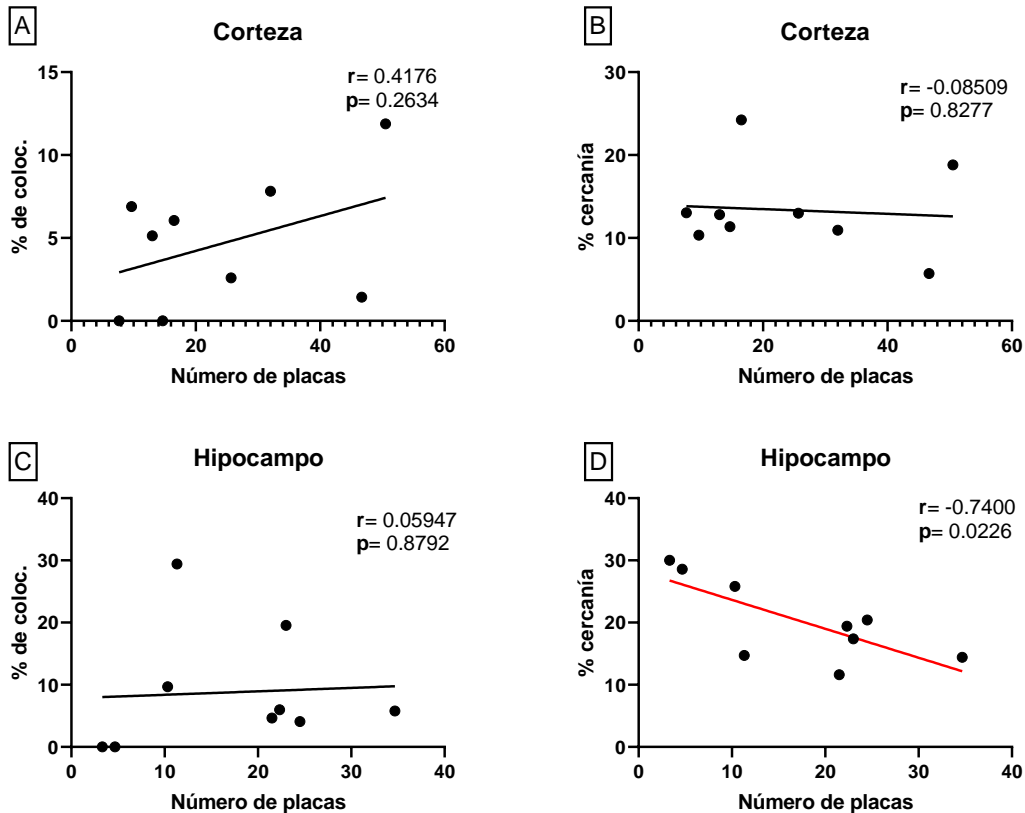


Fig. 36 Correlación entre la cercanía y la colocalización de K99 con el número de placas Aβ42 en hipocampo y en corteza.

(A) Se observó una correlación positiva entre el porcentaje de colocalización de k99 y las placas Aβ en corteza, pero no fue significativa (correlación de Pearson $r=0.4176$, $p=0.2634$). (B) El porcentaje de cercanía entre K99 y las placas Aβ en corteza muestra una correlación negativa ($r= -0.08509$) pero esta no fue significativa ($p=0.8277$). (C) El porcentaje de colocalización de K99 con la placas Aβ en el hipocampo, muestra una correlación positiva ($r=0.05947$) pero sin significancia ($p=0.8792$). (D) El porcentaje de cercanía de K99 con las placas Aβ muestra una correlación negativa ($r=-0.7400$) con diferencia significativa ($p=0.0226$). Regresión lineal en cada gráfica, existe distribución normal. Análisis pareado en GraphPad Prism 8 ($n=9$).

8. Discusión

En los últimos años se ha dado mucha relevancia al estudio de la MI en diversas enfermedades, desde condiciones sistémicas no infecciosas, metabólicas hasta neurológicas y neurodegenerativas (Naseibafrouei et al., 2014; Dinan & Cryan, 2016). La MI se puede modular con relativa facilidad (ej. antibióticos, dieta), lo que permite diseñar estrategias terapéuticas eficaces para trastornos relacionados con disbiosis. Por lo tanto, buscar la relación de la MI con enfermedades de las cuales aún no se conoce su etiología (como la EA), ni un tratamiento eficaz, se considera una opción atractiva para reducir la prevalencia de estas enfermedades. Hoy en día la pirámide poblacional muestra un mayor crecimiento en los sustratos superiores, los adultos mayores, lo que aumenta la posibilidad de que padezcan enfermedades relacionadas con el envejecimiento, siendo de las más relevantes la demencia por la EA.

En pacientes que presentan MCI (del 10-15% se convertirá a EA (Ganguli et al., 2010)) se han observado alteraciones en la MI (Li et al., 2019; Saji, Murotani, et al., 2019; Wu et al. 2021), dando paso a la investigación de la MI en pacientes con EA en estadios tempranos. Debido a la inmensidad de microorganismo presentes en el intestino, se han tomado en cuenta moléculas relevantes que pudieran promover las alteraciones de las funciones cerebrales, como la proteína curli. Champan y cols. (2002, 2005) han sido los primeros en identificar a la proteína curli como un amiloide funcional, por tener estructura β -plegada y la capacidad de agregar a otras proteínas. Este proyecto se planteó determinar la relación entre las alteraciones de la MI, con un perfil proinflamatorio, y la presencia de la proteína curli, así como su posible interacción con proteínas A β en cerebro de ratones TG para la EA.

8.1. Los ratones APP/PS1 de 8 meses son adecuados para el estudio de la EA relacionada con la MI

Existen diferentes modelos animales para estudiar la EA (Drummond & Wisniewski, 2017), sin embargo, en este proyecto se utilizó el modelo de ratón doble transgénico APP/PS1, en el cual se observaron alteraciones de conducta, deterioro de la memoria, amiloidosis cerebral y neuroinflamación (Esquerda-Canals et al., 2017) presentes en pacientes con la EA (Serrano et al., 2011). Al evaluar las pruebas conductuales EPM y T-Maze, observamos que en el EPM

(prueba que mide la ansiedad) (Kulkarni et al., 2011), no aumentó la ansiedad en ratones TG, pero sí se alteró el proceso de toma de decisiones, pues los ratones TG pasaron mayor tiempo en la zona de indecisión a diferencia de los WT que exploraron de manera natural el EPM. En el caso del T-Maze, los ratones TG mostraron pérdida de memoria a corto plazo. Estas dos alteraciones son parte de la sintomatología característica de la EA (Scott et al., 2014). Además, se consideró que evaluar los ratones a los 8 meses era análogo a explorar la enfermedad en etapas tempranas de la EA, pues a esta edad ya se encuentran los primeros signos (como deposición de A β , microglía activada y déficit cognitivos en el aprendizaje espacial y en memoria de trabajo) (Radde et al., 2006; Bittner et al., 2012) que provocan la neurodegeneración similar a pacientes (Wallon et al., 2017). Por otra parte, nuestro grupo de investigación ha reportado alteraciones en la MI de esta colonia de ratones TG desde los 6 meses de edad (Cuervo-Zanatta et al., 2020, 2022). Como antecedentes directos a esta tesis, Gonzalez-Magaña (2021) muestra que al sembrar el contenido intestinal en agar MacConckey se observa aumentada la abundancia de bacterias Gramnegativas, indicando un incremento en bacterias de perfil proinflamatorio que a su vez podría activar el sistema inmunitario (Zhang et al., 2022) y ocasionar disminución en las defensas intestinales aumentando la permeabilidad de la barrera intestinal (Haran et al., 2019) y la traslocación de material bacteriano del intestino a diferentes órganos del cuerpo (Giles & Stagg, 2017). En el estudio de Gonzalez-Magaña también se observó que una de las bacterias que incrementaba en el intestino en ratones TG era *E. coli*, bacteria comúnmente comensal pero que puede llegar ser patógena ante un ambiente descontrolado (Gualdi et al., 2008). Demostrando que las diferencias en la MI de los ratones TG utilizados en este proyecto, son comparables a lo observado en pacientes con demencia (Cattaneo et al., 2017; Vogt et al., 2017) y en otros ratones TG (Esquerda-Canals et al., 2017; Bäuerl et al., 2018).

8.2. Los ratones APP/PS1 expresan mayor cantidad de curli y activación de TLR4 en cerebro

Hasta el momento no se ha demostrado la presencia de curli en ratones transgénicos para la EA sin antes inocular la proteína curli en ellos. En este proyecto se determinó la posible causa de la dificultad para encontrar el gen *csgA* y la proteína curli en sujetos sin previa inoculación

o sin purificación de la proteína. Se realizó PCR de punto final y PCR anidada para detectar la presencia de *csgA*, pero debido a la baja cantidad de muestra y nivel de detección de la técnica, no fue posible detectar *csgA* de manera fiable. Se corroboró que se necesitan mínimo de 15,000 bacterias que porten el gen *csgA* en la muestra para amplificar el gen exitosamente. Por lo que se optimizaron los métodos de extracción de DNA, cambiando el Kit a uno más sensible y raspando las paredes del intestino para obtener mayor cantidad de bacterias, pues se sabe que bacterias productoras de curli utilizan esta proteína como parte de la biocapa (Wang & Chapman, 2005) y como mecanismo de protección de la barrera intestinal (Gualdi et al., 2008). Es así como se logró aumentar la posibilidad de amplificar el gen *csgA*. Pero los resultados de la qPCR arrojaron valores similares en la detección de la amplificación de *csgA*, por lo que no se encontró diferencia en los C_T entre los TG y WT. Sin embargo, aunque el gen se encontró en ambos grupos experimentales, la expresión de la proteína curli fue mayor en los ratones TG, lo cual puede estar relacionado con el microambiente intestinal, que permite/promueve el aumento de fibras curli en el modelo de APP/PS1. Al evaluar el TLR4 en intestino no se encontró diferencia entre los grupos experimentales, esto podría deberse a que TLR4 usualmente interacciona tanto con bacterias comensales y patógenas (Miller et al., 2005), que regulan su expresión. Además, Das y cols. (2022) encontraron que la activación de TLR2 era 5 veces mayor que TLR4 en el intestino de ratones TG expuestos a proteína curli. Por lo tanto, es necesario determinar los niveles de TLR2 en muestras de intestino de ratones TG y WT, ya que se sabe que TLR2 aumenta en presencia de PAPMs y bacterias, causando la activación de NF- κ B y la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, IL-17, entre otras (Miller et al., 2021). Estudios previos han mostrado que la exposición de curli en ratones modula las respuestas inflamatorias del huésped tanto en el tracto gastrointestinal como en la periferia (Gallo et al., 2015; Chen et al., 2016; Tursi & Tukel, 2018). Esto apoya nuestros datos sobre una mayor cantidad de TLR4 en cerebro de ratones TG al comparar con sus pares silvestres.

Por lo tanto, nuestros datos muestran que la disbiosis intestinal en ratones TG está asociada con un aumento en la producción de curli, principalmente por *E. coli*. Esto promueve un estado proinflamatorio en el hospedero (TLR4), debido a las interacciones ya demostradas de curli (Barnhart & Chapman, 2006).

Se ha propuesto que curli puede promover la agregación de otras proteínas amiloides como es la α -Syn (Wang et al., 2017). La acumulación de agregados proteicos lleva a la alteración de funciones primordiales en todos los sistemas, por ejemplo, en el cerebro se produce el péptido $A\beta$ que también sería afectado por la presencia de curli por medio de siembra cruzada (Friedland, 2014), pero al momento no se ha reportado su posible interacción con $A\beta$. Por lo que nuestro estudio evaluó la posible relación entre proteínas amiloides bacterianas y $A\beta$ en el cerebro de los ratones de estudio.

8.3. Posible función antimicrobiana del péptido AB ante la presencia de curli en cerebro de ratones TG

La cuantificación del TLR4 en cerebro de ratones TG indicaría que hay un aumento en los procesos de inflamación, lo cual se ha relacionado con activación de la microglía (Palaga et al., 2008) que se encarga de fagocitar a las placas $A\beta$ generadas en los ratones TG. También la activación de la microglía se debe a la presencia de PAMPs, como los elementos bacterianos que pueden llegar a través de sepsis. El modelo APP/PS1 de 8 meses representa un estadio temprano de la enfermedad en el cual no se considera la sepsis para justificar la diseminación de proteínas bacterianas. La vía más estudiada para la traslocación de proteínas amiloides bacterianas es el nervio vago (Gómez et al., 2019), ya que su conexión directa entre el cerebro e intestino, hace más eficiente el traspaso de cuerpo exógenos en menor tiempo y sin presentar alteraciones en el intestino. En el estudio de Das y cols. (2022) se demostró que hay activación del nervio vago por la respuesta a curli, por medio de la detección de niveles altos de PGP9.5 (marcador neuroendocrino) y TLR2 dentro del íleon. Esto fortalece la asociación de la proteína curli con alteraciones en el cerebro, relacionando a la agregación de proteínas con la respuesta neuroinflamatoria presentes en pacientes con neurodegeneración. Como se mencionó anteriormente, la presencia de estos PAMPs promueve la neuroinflamación, por tal motivo, encontrar microorganismos o productos bacterianos se asociaría a la activación del sistema inmune en el cerebro. En un estudio de Pisa y cols. (2019) se probó la posibilidad de infecciones polimicrobianas en cerebros de pacientes con EA. Por inmunofluorescencia se observaron proteínas de hongos y bacterias en la corteza entorrinal e hipocampo, es decir, que los microorganismos pueden llegar al

cerebro. Zhan y cols. (2016) detectaron que el pili K99 se encontraba en el parénquima cerebral de ratones con EA, pero no en WT; además, se encontró K99 cerca de las placas A β y en la mayoría de los vasos sanguíneos. Abriendo pasó a que es posible encontrar en el cerebro proteínas bacterianas relacionadas con las placas A β .

En este proyecto, el análisis de inmunofluorescencia en corteza e hipocampo corrobora la presencia de placas A β únicamente en ratones TG, y que la cantidad de placas A β es mayor en hipocampo, pues es una de las áreas donde inicia la neurodegeneración (Braak & Braak, 1991). Recordando que K99 es parte del membrana de *E. coli* de igual forma que curli, se realizó un doble marcaje para observar la relación de las placas A β con K99, (Beloin et al., 2004; Hung et al., 2013). Observamos la presencia de placas y agregados de K99 en cercanía con las placas A β en hipocampo y corteza, pero también se observó colocalización, indicando una fuerte asociación de las placas A β y las proteínas bacterianas. Realizando la correlación de la cercanía y colocalización, se obtuvo una correlación negativa entre la cercanía de K99 con las placas A β , es decir, que entre mayor cantidad de placas A β menor es la presencia de K99. Lo que sugiere que A β está cumpliendo su papel antimicrobiano (Soscia et al., 2010; Pisa et al., 2017) al disminuir la presencia de K99, por el contrario, si hay menor cantidad de A β no hay impedimento para la acumulación de K99. Esto nos permite proponer que la aparición de placas A β surge de la necesidad de controlar la invasión de bacterias o productos bacterianos en el cerebro (Dando et al., 2014). Esto es congruente con estudios en ratones macho APP/PS1 tratados con antibióticos vía oral, donde se observó reducción de placas A β en el cerebro (Minter et al., 2016; 2017; Dodiya et al., 2019). Además, nuestros datos nos permiten demostrar que el sitio de mayor producción de curli, es el ciego, donde la abundancia de *E. coli* y la producción exacerbada de curli puede relacionarse con los procesos de inflamación y agregación proteica a nivel cerebral. La presencia de curli en el cerebro de ratones TG y la interacción con el A β permite ahondar más en el estudio de esta posible cascada de agregación amiloide, y podría ayudar a descifrar el impacto de las alteraciones de la MI en la salud y en la enfermedad, con especial interés en las condiciones neurodegenerativas como el EA.

9. Conclusión

En este trabajo se demostró que la proteína curli se relaciona con la EA, pues se observó que esta proteína se expresa en mayor cantidad en ratones TG, que presentan daño cognitivo y un estado proinflamatorio a nivel cerebral. Los péptidos A β tienen la característica de ser antimicrobianos, lo cual se relaciona con la baja presencia de K99 en cercanía a las placas amiloides. De esta manera, estos resultados sugieren que las bacterias productoras de proteína curli están ligadas a la agregación de las placas amiloides en cerebro, característica clínica de la EA. Esto da paso al diseño de nuevos tratamientos no invasivos, pues, aunque no se conoce perfectamente el proceso de diseminación de las bacterias o sus productos, se considera que es a través del eje intestino-cerebro. La MI se puede modificar eficazmente con la ingesta de ciertos alimentos o fármacos; al conocer esto, modular la abundancia de las bacterias productoras de péptidos amiloides, por medio de antibióticos, trasplantes fecales o dietas antiinflamatorias, podrían proponerse como tratamientos preventivos o coadyuvantes ante la EA.

10. Perspectivas

Sumar experimentos de inmunodetección del anticuerpo de curli en cerebro durante el curso de la enfermedad (ontogenia) para entender mejor el papel antimicrobiano del A β en cerebro en relación con K99 y otros marcadores de proteínas amiloides bacterianas.

Realizar un triple marcaje en corteza e hipocampo de A β 1-42 vs. curli vs. Iba1; con el objetivo de demostrar la presencia de activación microglial y procesos inflamatorios donde las A β interaccionen con curli.

Determinar la presencia de otros marcadores de inflamación como TLR1/TLR2, IL-1, IL-6, TNF- α entre otros, tanto en intestino como en cerebro, relacionados con la presencia de curli.

Conocer y delinear el mecanismo por el cual curli se transloca del intestino al cerebro.

Por último, una vez que se tengan estos experimentos se puede sugerir evaluar un tratamiento (alimentación, fármacos antimicrobianos, trasplantes fecales o combinación) en ratones TG para observar la relación con curli y la respuesta inflamatoria, y si se tiene éxito extrapolar este estudio en pacientes con EA.

11. Referencias

- Alonso, R., Pisa, D., Marina, A. I., Morato, E., Rábano, A., & Carrasco, L. (2014). Fungal infection in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 41(1), 301–311. <https://doi.org/10.3233/JAD-132681>
- Anstey, K. J., von Sanden, C., Salim, A., & O'Kearney, R. (2007). Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *American journal of epidemiology*, 166(4), 367–378. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm116>
- Akira S. (2009). Innate immunity to pathogens: diversity in receptors for microbial recognition. *Immunological reviews*, 227(1), 5–8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00739.x>
- Barberger-Gateau, P., Raffaitin, C., Letenneur, L., Berr, C., Tzourio, C., Dartigues, J. F., & Alpérovitch, A. (2007). Dietary patterns and risk of dementia: the Three-City cohort study. *Neurology*, 69(20), 1921–1930. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000278116.37320.52>
- Barnhart, M. M., & Chapman, M. R. (2006). Curli Biogenesis and Function. *Annual Review of Microbiology*, 60(1), 131–147. doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142106
- Barrett, E., Ross, R. P., O'Toole, P. W., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2012). γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Journal of applied microbiology*, 113(2), 411–417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05344.x>
- Bäuerl, C., Collado, M.C., Diaz-Cuevas, A., Viña, J., & Pérez-Martínez, G. (2018) Shifts in gut microbiota composition in an APP/PSS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease during lifespan. *Lett Appl Microbiol.* 66(6):464-471. [doi:10.1111/lam.12882](https://doi.org/10.1111/lam.12882)
- Bektas, A., Schurman, S. H., Sen, R., & Ferrucci, L. (2017). Human T cell immunosenescence and inflammation in aging. *Journal of leukocyte biology*, 102(4), 977–988. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RI0716-335R>
- Benson, A. K., Kelly, S. A., Legge, R., Ma, F., Low, S. J., Kim, J., Zhang, M., Oh, P. L., Nehrenberg, D., Hua, K., Kachman, S. D., Moriyama, E. N., Walter, J., Peterson, D. A., & Pomp, D. (2010). Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(44), 18933–18938. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007028107>
- Bernier L. P. (2012). Purinergic regulation of inflammasome activation after central nervous system injury. *The Journal of general physiology*, 140(5), 571–575. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210875>
- Birks J. (2006). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. The Cochrane database of systematic reviews, 2006(1), CD005593. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005593>
- Bishop, G. M., & Robinson, S. R. (2002). The amyloid hypothesis: let sleeping dogmas lie?. *Neurobiology of aging*, 23(6), 1101–1105. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(02\)00050-7](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00050-7)
- Blazer, D. G., Yaffe, K., Liverman, C. T., Committee on the Public Health Dimensions of Cognitive Aging, Board on Health Sciences Policy, & Institute of Medicine (Eds.). (2015). Cognitive Aging: Progress in Understanding and Opportunities for Action. National Academies Press (US).

- Bolkan, B. J., Triphan, T., & Kretzschmar, D. (2012). β -secretase cleavage of the fly amyloid precursor protein is required for glial survival. *Journal of Neuroscience*, 32(46), 16181-16192. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0228-12.2012>
- Bostanciklioğlu, M. (2019). The role of gut microbiota in pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of applied microbiology*. 127(4), 954-967. doi.org/10.1111/jam.14264.
- Bourgade, K., Garneau, H., Giroux, G., Le Page, A. Y., Bocti, C., Dupuis, G., Frost, E. H., & Fülöp, T., Jr (2015). β -Amyloid peptides display protective activity against the human Alzheimer's disease-associated herpes simplex virus-1. *Biogerontology*, 16(1), 85–98. <https://doi.org/10.1007/s10522-014-9538-8>
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., & van Noort, J. M. (2002). Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 61(11), 1013–1021. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.11.1013>
- Bu, X. L., Yao, X. Q., Jiao, S. S., Zeng, F., Liu, Y. H., Xiang, Y., Liang, C. R., Wang, Q. H., Wang, X., Cao, H. Y., Yi, X., Deng, B., Liu, C. H., Xu, J., Zhang, L. L., Gao, C. Y., Xu, Z. Q., Zhang, M., Wang, L., Tan, X. L., ... Wang, Y. J. (2015). A study on the association between infectious burden and Alzheimer's disease. *European journal of neurology*, 22(12), 1519–1525. <https://doi.org/10.1111/ene.12477>
- Cattaneo, A., Cattane, N., Galluzzi, S., Provasi, S., Lopizzo, N., Festari, C., Ferrari, C., Guerra, U. P., Paghera, B., Muscio, C., Bianchetti, A., Volta, G. D., Turla, M., Cotelli, M. S., Gennuso, M., Prella, A., Zanetti, O., Lussignoli, G., Mirabile, D., & Bellandi, D. (2017). Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiology of Aging*, 49, 60–68. doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.019
- Carneiro, K. M. M., Zhai, H., Zhu, L., Horst, J. A., Sitlin, M., Nguyen, M., Wagner, M., Simpliciano, C., Milder, M., Chen, C-L., Ashby, P., Svensson Bonde, J., Li, W., & Habelitz, S. (2016). Amyloid-like ribbons of amelogenins in enamel mineralization. *Scientific Reports*, 6, [23105]. <https://doi.org/10.1038/srep23105>
- Carty, M., & Bowie, A. G. (2011). Evaluating the role of Toll-like receptors in diseases of the central nervous system. *Biochemical pharmacology*, 81(7), 825–837. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.01.003>
- Cevenini, E., Monti, D., & Franceschi, C. (2013). Inflamm-ageing. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 16(1), 14–20. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32835ada13>
- Chen, K., Zhang, L., Huang, J., Gong, W., Dunlop, N.M., & Wang, J. (2008). Cooperation between NOD2 and Toll-like receptor 2 ligands in the up-regulation of mouse mFPR2, a G-protein-coupled A β 42 peptide receptor, in microglial cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 83.
- Chen, S. G., Stribinskis, V., Rane, M. J., Demuth, D. R., Gozal, E., Roberts, A. M., Jagadapillai, R., Liu, R., Choe, K., Shivakumar, B., Son, F., Jin, S., Kerber, R., Adame, A., Masliah, E., & Friedland, R. P. (2016). Exposure to the Functional Bacterial Amyloid Protein Curli Enhances Alpha-Synuclein Aggregation in Aged Fischer 344 Rats and *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep34477>

- Chovatiya, R., & Medzhitov, R. (2014). Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Molecular cell*, 54(2), 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.030>
- Clegg, A., Young, J., Iliffe, S., Rikkert, M. O., & Rockwood, K. (2013). Frailty in elderly people. *Lancet (London, England)*, 381(9868), 752–762. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62167-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62167-9)
- Cribbs, D. H., Berchtold, N. C., Perreau, V., Coleman, P. D., Rogers, J., Tenner, A. J., & Cotman, C. W. (2012). Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study. *Journal of neuroinflammation*, 9, 179. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-179>
- Costa, R., Speretta, E., Crowther, D. C., & Cardoso, I. (2011). Testing the therapeutic potential of doxycycline in a *Drosophila melanogaster* model of Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry*, 286(48), 41647–41655. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.274548>
- Cuervo-Zannatta, D., Garcia-Mena, J. & Pérez-Cruz, C. (2021). Gut microbiota alterations and cognitive impairment are sexually dissociated in a transgenic mice model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 82, S195-S214. Doi: 10.3233/JAD-201367
- Cuervo-Zannatta, D., Perez-Grijalva, B., González-Magaña, E., Hernandez-Acostaa, J., Murugesan D., Garcia-Mena, J. & Perez-Cruz, C. (2021). Modulation of the microbiota-gut-brain axis by bioactive food, prebiotics, and probiotics decelerates the course of Alzheimer's disease. In C. Pérez (Eds.). *Studies in Natural Products Chemistry* (pp.51-86). Elsevier.
- Cummings, J., Aisen, P., Apostolova, L. G., Atri, A., Salloway, S., & Weiner, M. (2021). Aducanumab: Appropriate Use Recommendations. *The journal of prevention of Alzheimer's disease*, 8(4), 398–410. <https://doi.org/10.14283/jpad.2021.41>
- Dando, S. J., Mackay-Sim, A., Norton, R., Currie, B. J., St John, J. A., Ekberg, J. A., Batzloff, M., Ulett, G. C., & Beacham, I. R. (2014). Pathogens penetrating the central nervous system: infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion. *Clinical microbiology reviews*, 27(4), 691–726. <https://doi.org/10.1128/CMR.00118-13>
- Diao, H., Jiao, A. R., Yu, B., Mao, X. B., & Chen, D. W. (2019). Gastric infusion of short-chain fatty acids can improve intestinal barrier function in weaned piglets. *Genes & nutrition*, 14, 4. <https://doi.org/10.1186/s12263-019-0626-x>
- Harach, T., Marungruang, N., Dutilleul, N., Cheatham, V., Coy, K. D., Neher, J. J., Jucker, M., Fåk F., T., Lasser, & Bolmont T. (2015). Reduction of Alzheimer's disease beta-amyloid pathology in the absence of gut microbiota. *arXiv.org arXiv:1509.02273 2015*.
- Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P. A., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., Haapaniemi, E., Kaakkola, S., Eerola-Rautio, J., Pohja, M., Kinnunen, E., Murros, K., & Auvinen, P. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 30(3), 350–358. <https://doi.org/10.1002/mds.26069>
- Murphy, E. F., Cotter, P. D., Healy, S., Marques, T. M., O'Sullivan, O., Fouhy, F., Clarke, S. F., O'Toole, P. W., Quigley, E. M., Stanton, C., Ross, P. R., O'Doherty, R. M., & Shanahan, F. (2010). Composition

- and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity, and time in mouse models. *Gut*, 59(12), 1635–1642. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.215665>
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., Bienenstock, J., & Cryan, J. F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38), 16050–16055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102999108>
- Eimer, W. A., Vijaya Kumar, D. K., Navalpur Shanmugam, N. K., Rodriguez, A. S., Mitchell, T., Washicosky, K. J., György, B., Breakefield, X. O., Tanzi, R. E., & Moir, R. D. (2018). Alzheimer's Disease-Associated β -Amyloid Is Rapidly Seeded by Herpesviridae to Protect against Brain Infection. *Neuron*, 99(1), 56–63.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.06.030>
- Erdő, F., Denes, L., & de Lange, E. (2017). Age-associated physiological and pathological changes at the blood-brain barrier: A review. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(1), 4–24. <https://doi.org/10.1177/0271678X16679420>
- Ershler, W. B., & Keller, E. T. (2000). Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annual review of medicine*, 51, 245–270. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.51.1.245>
- Evans, M. L., & Chapman, M. R. (2014). Curli biogenesis: Order out of disorder. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Cell Research*, 1843(8), 1551–1558. doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.09.010
- Falony, G., Joossens, M., Vieira-Silva, S., Wang, J., Darzi, Y., Faust, K., Kurilshikov, A., Bonder, M. J., Valles-Colomer, M., Vandeputte, D., Tito, R. Y., Chaffron, S., Rymenans, L., Verspecht, C., De Sutter, L., Lima-Mendez, G., D'hoë, K., Jonckheere, K., Homola, D., Garcia, R., ... Raes, J. (2016). Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6285), 560–564. <https://doi.org/10.1126/science.aad3503>
- Fülöp, T., Itzhaki, R. F., Balin, B. J., Miklossy, J., & Barron, A. E. (2018). Role of Microbes in the Development of Alzheimer's Disease: State of the Art- An International Symposium Presented at the 2017 IAGG Congress in San Francisco. *Frontiers in genetics*, 9, 362. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00362>
- Fülöp, T., Larbi, A., & Pawelec, G. (2013). Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. *Frontiers in immunology*, 4, 271. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00271>
- Gambuzza, M. E., Sofo, V., Salmeri, F. M., Soraci, L., Marino, S., & Bramanti, P. (2014). Toll-like receptors in Alzheimer's disease: a therapeutic perspective. *CNS & neurological disorders drug targets*, 13(9), 1542–1558. <https://doi.org/10.2174/1871527313666140806124850>
- Ghosh, S., Wu, M.D., Shaftel, S.S., Kyrkanides, S., LaFerla, F.M., Olschowka, J.A., & O'Banion, M.K. (2013). Sustained Interleukin-1 β overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an Alzheimer's mouse model. *Journal. Neuroscience* 33, 5053–5064.
- Giau, V., Wu, S., Jamerlan, A., An, S., Kim, S., & Hulme, J. (2018). Gut Microbiota and Their Neuroinflammatory Implications in Alzheimer's Disease. *Nutrients*, 10(11), 1765. doi.org/10.3390/nu10111765

- Gilman, S., Koller, M., Black, R. S., Jenkins, L., Griffith, S. G., Fox, N. C., Eisner, L., Kirby, L., Rovira, M. B., Forette, F., Orgogozo, J. M., & AN1792(QS-21)-201 Study Team (2005). Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*, 64(9), 1553–1562. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000159740.16984.3C>
- Goldstein D. R. (2010). Aging, imbalanced inflammation and viral infection. *Virulence*, 1(4), 295–298. <https://doi.org/10.4161/viru.1.4.12009>
- Goldstein D. R. (2012). Role of aging on innate responses to viral infections. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences, and medical sciences*, 67(3), 242–246. <https://doi.org/10.1093/gerona/glr194>
- Goldstein, L. E., Muffat, J. A., Cherny, R. A., Moir, R. D., Ericsson, M. H., Huang, X., Mavros, C., Coccia, J. A., Faget, K. Y., Fitch, K. A., Masters, C. L., Tanzi, R. E., Chylack, L. T., Jr, & Bush, A. I. (2003). Cytosolic beta-amyloid deposition and supranuclear cataracts in lenses from people with Alzheimer's disease. *Lancet* (London, England), 361(9365), 1258–1265. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12981-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12981-9)
- González KD. Envejecimiento demográfico en México: Análisis comparativo entre las entidades federativas. Mexico City, Mexico: CONAPO; 2016.
- Green, R. C., Cupples, L. A., Go, R., Benke, K. S., Edeki, T., Griffith, P. A., Williams, M., Hipps, Y., Graff-Radford, N., Bachman, D., Farrer, L. A., & MIRAGE Study Group (2002). Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease. *JAMA*, 287(3), 329–336. <https://doi.org/10.1001/jama.287.3.329>
- Green, R. C., Schneider, L. S., Amato, D. A., Beelen, A. P., Wilcock, G., Swabb, E. A., Zavitz, K. H., & Tarenflurbil Phase 3 Study Group (2009). Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*, 302(23), 2557–2564. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1866>
- Gudmundsson, G. H., Agerberth, B., Odeberg, J., Bergman, T., Olsson, B., & Salcedo, R. (1996). The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *European journal of biochemistry*, 238(2), 325–332. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0325z.x>
- Harach, T., Marungruang, N., Duthilleul, N., Cheatham, V., Mc Coy, K.D., Frisoni, G., Neher, J.J., Fåk, F., Jucker, M., Lasser, T. ... (2017). Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Scientific Report*, 7, 41802.
- Harris, S. A., & Harris, E. A. (2015). Herpes Simplex Virus Type 1 and Other Pathogens are Key Causative Factors in Sporadic Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 48(2), 319–353. <https://doi.org/10.3233/JAD-142853>
- Hebert, L. E., Bienias, J. L., Aggarwal, N. T., Wilson, R. S., Bennett, D. A., Shah, R. C., & Evans, D. A. (2010). Change in risk of Alzheimer disease over time. *Neurology*, 75(9), 786–791. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181f0754f>

- Hunt, A., Schönknecht, P., Henze, M.P., Seidl, U.W., Haberkorn, U., & Schröder, J. (2007). Reduced cerebral glucose metabolism in patients at risk for Alzheimer's disease. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 155, 147-154.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Censo Población y Vivienda 2020 [Data]. <https://www.inegi.org.mx/programas/ccpv/2020/#Tabulados>. Mexico City: INEGI; 2021.
- Ishida, N., Ishihara, Y., Ishida, K., Tada, H., Funaki-Kato, Y., Hagiwara, M., Ferdous, T., Abdullah, M., Mitani, A., Michikawa, M., & Matsushita, K. (2017). Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. *NPJ aging and mechanisms of disease*, 3, 15. <https://doi.org/10.1038/s41514-017-0015-x>
- Inyushin M, Zayas-Santiago A, Rojas L & Kucheryavykh L (2020) On the Role of Platelet-Generated Amyloid Beta Peptides in Certain Amyloidosis Health Complications. *Frontiers Immunology*, 11:571083. doi: 10.3389/fimmu.2020.571083
- Inyushin, M. Y., Sanabria, P., Rojas, L., Kucheryavykh, Y., & Kucheryavykh, L. (2017). A β Peptide Originated from Platelets Promises New Strategy in Anti-Alzheimer's Drug Development. *BioMed research international*, 2017, 3948360. <https://doi.org/10.1155/2017/3948360>
- Jack, C. R., Jr, Lowe, V. J., Weigand, S. D., Wiste, H. J., Senjem, M. L., Knopman, D. S., Shiung, M. M., Gunter, J. L., Boeve, B. F., Kemp, B. J., Weiner, M., Petersen, R. C., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2009). Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. *Brain: a journal of neurology*, 132(Pt 5), 1355–1365. <https://doi.org/10.1093/brain/awp062>
- Jacob, R.S. et al. (2018). Amyloids Are Novel Cell-Adhesive Matrices. In: Chattopadhyay, K., Basu, S. (eds) Biochemical and Biophysical Roles of Cell Surface Molecules. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1112. *Springer, Singapore*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3065-0_7
- Joachim, C.L., Mori, H., & Selkoe, D.J. (1989). Amyloid β -protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease. *Nature*, 341, 226-230.
- Joffre, C., Dinel, A. L., Chataigner, M., Pallet, V., & Layé, S. (2020). n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Derivates Reduce Neuroinflammation during Aging. *Nutrients*, 12(3), 647. <https://doi.org/10.3390/nu12030647>
- Kagan, B. L., Jang, H., Capone, R., Teran Arce, F., Ramachandran, S., Lal, R., & Nussinov, R. (2012). Antimicrobial properties of amyloid peptides. *Molecular pharmaceutics*, 9(4), 708–717. <https://doi.org/10.1021/mp200419b>
- Kagan, B. L., Selsted, M. E., Ganz, T., & Lehrer, R. I. (1990). Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(1), 210–214. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.1.210>
- Kawai, T., & Akira, S. (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine*, 13(11), 460–469. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.09.002>

- Kim, D., Kim, M. A., Cho, I. H., Kim, M. S., Lee, S., Jo, E. K., Choi, S. Y., Park, K., Kim, J. S., Akira, S., Na, H. S., Oh, S. B., & Lee, S. J. (2007). A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. *The Journal of biological chemistry*, 282(20), 14975–14983. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607277200>
- Kountouras, J., Gavalas, E., Polyzos, S. A., Deretzi, G., Kouklakis, G., Grigoriadis, S., Grigoriadis, N., Boziki, M., Zavos, C., Tzilves, D., & Katsinelos, P. (2014). Association between *Helicobacter pylori* burden and Alzheimer's disease. *European journal of neurology*, 21(12), e100. <https://doi.org/10.1111/ene.12563>
- Kowalski, K., & Mulak, A. (2019). *Brain-gut-microbiota axis in Alzheimer's disease*. *J Neurogastroenterol Motil*, 25(1), 48-60. doi:10.5056/jnm18087
- Koldamova, R. P., Lefterov, I. M., Lefterova, M. I., & Lazo, J. S. (2001). Apolipoprotein A-I directly interacts with amyloid precursor protein and inhibits A beta aggregation and toxicity. *Biochemistry*, 40(12), 3553–3560. <https://doi.org/10.1021/bi002186k>
- Kumar, D. K., Choi, S. H., Washicosky, K. J., Eimer, W. A., Tucker, S., Ghofrani, J., Lefkowitz, A., McColl, G., Goldstein, L. E., Tanzi, R. E., & Moir, R. D. (2016). Amyloid- β peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. *Science translational medicine*, 8(340), 340ra72. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf1059>
- Kumar, D. K., Eimer, W. A., Tanzi, R. E., & Moir, R. D. (2016). Alzheimer's disease: the potential therapeutic role of the natural antibiotic amyloid- β peptide. *Neurodegenerative disease management*, 6(5), 345–348. <https://doi.org/10.2217/nmt-2016-0035>
- Lagkouvardos, I., Pukall, R., Abt, B., Foessel, B. U., Meier-Kolthoff, J. P., Kumar, N., Bresciani, A., Martínez, I., Just, S., Ziegler, C., Brugiroux, S., Garzetti, D., Wenning, M., Bui, T. P., Wang, J., Hugenholtz, F., Plugge, C. M., Peterson, D. A., Hornef, M. W., Baines, J. F., ... Clavel, T. (2016). Corrigendum: The Mouse Intestinal Bacterial Collection (miBC) provides host-specific insight into cultured diversity and functional potential of the gut microbiota. *Nature microbiology*, 1(11), 16219. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.219>
- Landreth, G. E., & Reed-Geaghan, E. G. (2009). Toll-like receptors in Alzheimer's disease. *Current topics in microbiology and immunology*, 336, 137–153. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00549-7_8
- Lafon, M., Megret, F., Lafage, M. et al. The innate immune facet of brain. *Journal of molecular neuroscience* 29, 185–194 (2006). <https://doi.org/10.1385/JMN:29:3:185>
- Lehnardt, S., Henneke, P., Lien, E., Kasper, D. L., Volpe, J. J., Bechmann, I., Nitsch, R., Weber, J. R., Golenbock, D. T., & Vartanian, T. (2006). A mechanism for neurodegeneration induced by group B streptococci through activation of the TLR2/MyD88 pathway in microglia. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 177(1), 583–592. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.583>
- Le Page, A., Dupuis, G., Frost, E. H., Larbi, A., Pawelec, G., Witkowski, J. M., & Fulop, T. (2018). Role of the peripheral innate immune system in the development of Alzheimer's disease. *Experimental gerontology*, 107, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.12.019>

- Le, Y., Gong, W., Tiffany, H. L., Tumanov, A., Nedospasov, S., Shen, W., Dunlop, N. M., Gao, J. L., Murphy, P. M., Oppenheim, J. J., & Wang, J. M. (2001). Amyloid (beta)42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(2), RC123. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-02-j0003.2001>
- Lee, M., You, H. J., Cho, S. H., Woo, C. H., Yoo, M. H., Joe, E. H., & Kim, J. H. (2002). Implication of the small GTPase Rac1 in the generation of reactive oxygen species in response to β -amyloid in C6 astrogloma cells. *Biochemical Journal*, 366(3), 937-943. <https://doi.org/10.1042/bj20020453>
- Licastro, F., Candore, G., Lio, D., Porcellini, E., Colonna-Romano, G., Franceschi, C., & Caruso, C. (2005). Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immunity & ageing: I & A*, 2, 8. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-2-8>
- Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Brayne, C., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Costafreda, S. G., Dias, A., Fox, N., Gitlin, L. N., Howard, R., Kales, H. C., Kivimäki, M., Larson, E. B., Ogunniyi, A., Orgeta, V., ... Mukadam, N. (2020). Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet* (London, England), 396(10248), 413–446. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30367-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30367-6)
- Maetzawa, I., Jin, L. W., Woltjer, R. L., Maeda, N., Martin, G. M., Montine, T. J., & Montine, K. S. (2004). Apolipoprotein E isoforms and apolipoprotein AI protect from amyloid precursor protein carboxy terminal fragment-associated cytotoxicity. *Journal of neurochemistry*, 91(6), 1312-1321. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02818.x>
- Maheshwari, P., & Eslick, G. D. (2015). Bacterial infection and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Journal of Alzheimer's disease*, 43(3), 957–966. <https://doi.org/10.3233/JAD-140621>
- Man, A. L., Gicheva, N., & Nicoletti, C. (2014). The impact of ageing on the intestinal epithelial barrier and immune system. *Cellular immunology*, 289(1-2), 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.04.001>
- Mata-Haro, V., Cekic, C., Martin, M., Chilton, P. M., Casella, C. R., & Mitchell, T. C. (2007). The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science* (New York, N.Y.), 316(5831), 1628–1632. <https://doi.org/10.1126/science.1138963>
- Means, T. K., Golenbock, D. T., & Fenton, M. J. (2000). Structure and function of Toll-like receptor proteins. *Life sciences*, 68(3), 241–258. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(00\)00939-5](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(00)00939-5)
- Menzies, F.M., Fleming, A., & Rubinsztein, D.C. (2015). Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 16, 345–357.
- Minter, M. R., Zhang, C., Leone, V., Ringus, D. L., Zhang, X., Oyler-Castrillo, P., Musch, M. W., Liao, F., Ward, J. F., Holtzman, D. M., Chang, E. B., Tanzi, R. E., & Sisodia, S. S. (2016). Antibiotic-induced perturbations in gut microbial diversity influences neuro-inflammation and amyloidosis in a murine model of Alzheimer's disease. *Scientific reports*, 6, 30028. <https://doi.org/10.1038/srep30028>
- Miller, A. L., Bessho, S., Grando, K., & Tükel, Ç. (2021). Microbiome or Infections: Amyloid-Containing Biofilms as a Trigger for Complex Human Diseases. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.638867>

- Miklossy J. (2016). Bacterial Amyloid and DNA are Important Constituents of Senile Plaques: Further Evidence of the Spirochetal and Biofilm Nature of Senile Plaques. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 53(4), 1459–1473. <https://doi.org/10.3233/JAD-160451>
- Mohajeri, M. H., La Fata, G., Steinert, R. E., & Weber, P. (2018). Relationship between the gut microbiome and brain function. *Nutrition reviews*, 76(7), 481–496. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy009>
- Montagne, A., Barnes, S. R., Sweeney, M. D., Halliday, M. R., Sagare, A. P., Zhao, Z., Toga, A. W., Jacobs, R. E., Liu, C. Y., Amezcua, L., Harrington, M. G., Chui, H. C., Law, M., & Zlokovic, B. V. (2015). Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*, 85(2), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.032>
- Molloy, D. W., Standish, T. I., Zhou, Q., Guyatt, G., & DARAD Study Group (2013). A multicenter, blinded, randomized, factorial controlled trial of doxycycline and rifampin for treatment of Alzheimer's disease: the DARAD trial. *International journal of geriatric psychiatry*, 28(5), 463–470. <https://doi.org/10.1002/gps.3846>
- Morales, M., Cuervo-Zanatta, D., Hernandez-Acosta, J., Chacòn, M., Sanchez-Valle, V. & Perez-Cruz, C. (2023). In C. Martin, V. Pastel & V. Preedy (Eds.), *Diet and nutrition in neurological disorders* (pp. 41-64), Elsevier.
- Ogino, E., Manly, J. J., Schupf, N., Mayeux, R., & Gu, Y. (2019). Current and past leisure time physical activity in relation to risk of Alzheimer's disease in older adults. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 15(12), 1603–1611. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.07.013>
- Paris, D., Town, T., Parker, T. A., Tan, J., Humphrey, J., Crawford, F., & Mullan, M. (1999). Inhibition of Alzheimer's beta-amyloid induced vasoactivity and proinflammatory response in microglia by a cGMP-dependent mechanism. *Experimental neurology*, 157(1), 211–221. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7055>
- Parra-Rodríguez, L., González-Meljem, J. M., Gómez-Dantés, H., Gutiérrez-Robledo, L. M., López-Ortega, M., García-Peña, C., & Medina-Campos, R. H. (2020). The Burden of Disease in Mexican Older Adults: Premature Mortality Challenging a Limited-Resource Health System. *Journal of Aging and Health*, 32(7–8), 543–553. <https://doi.org/10.1177/0898264319836514>
- Penninkilampi, R., Brothers, H. M., & Eslick, G. D. (2016). Pharmacological Agents Targeting γ -Secretase Increase Risk of Cancer and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Alzheimer's disease*, 53(4), 1395–1404. <https://doi.org/10.3233/JAD-160275>
- Penninkilampi, R., Brothers, H. M., & Eslick, G. D. (2017). Safety and Efficacy of Anti-Amyloid- β Immunotherapy in Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 12(1), 194–203. <https://doi.org/10.1007/s11481-016-9722-5>
- Pisa, D., Alonso, R., Fernández-Fernández, A. M., Rábano, A., & Carrasco, L. (2017). Polymicrobial Infections in Brain Tissue from Alzheimer's Disease Patients. *Scientific reports*, 7(1), 5559. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05903-y>

- Plant, L.D., Boyle, J.P., Smith, I.F., Peers, C., & Pearson, H.A. (2003). The Production of Amyloid β Peptide Is a Critical Requirement for the Viability of Central Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 23, 5531 - 5535.
- Puig, K. L., Floden, A. M., Adhikari, R., Golovko, M. Y., & Combs, C. K. (2012). Amyloid precursor protein and proinflammatory changes are regulated in brain and adipose tissue in a murine model of high fat diet-induced obesity. *PloS one*, 7(1), e30378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030378>
- Puzianowska-Kuźnicka, M., Owczarz, M., Wieczorowska-Tobis, K., Nadrowski, P., Chudek, J., Slusarczyk, P., Skalska, A., Jonas, M., Franek, E., & Mossakowska, M. (2016). Interleukin-6 and C-reactive protein, successful aging, and mortality: the PolSenior study. *Immunity & ageing: I & A*, 13, 21. <https://doi.org/10.1186/s12979-016-0076-x>
- Radjabzadeh, D., Boer, C. G., Beth, S. A., van der Wal, P., Kieft-De Jong, J. C., Jansen, M. A. E., Konstantinov, S. R., Peppelenbosch, M. P., Hays, J. P., Jaddoe, V. W. V., Ikram, M. A., Rivadeneira, F., van Meurs, J. B. J., Uitterlinden, A. G., Medina-Gomez, C., Moll, H. A., & Kraaij, R. (2020). Diversity, compositional and functional differences between gut microbiota of children and adults. *Scientific reports*, 10(1), 1040. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57734-z>
- Regen, F., Hellmann-Regen, J., Costantini, E., & Reale, M. (2017). Neuroinflammation and Alzheimer's Disease: Implications for Microglial Activation. *Current Alzheimer research*, 14(11), 1140–1148. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170203141717>
- Richard, K. L., Filali, M., Préfontaine, P., & Rivest, S. (2008). Toll-like receptor 2 acts as a natural innate immune receptor to clear amyloid beta 1-42 and delay the cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(22), 5784–5793. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1146-08.2008>
- Robinson, S. R., & Bishop, G. M. (2002). Abeta as a bioflocculant: implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 23(6), 1051–1072. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(01\)00342-6](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(01)00342-6)
- Robinson, S. R., Bishop, G. M., Lee, H. G., & Münch, G. (2004). Lessons from the AN 1792 Alzheimer vaccine: lest we forget. *Neurobiology of aging*, 25(5), 609–615. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.12.020>
- Rodriguez M. A., & Wong R. (2019). Aging in Mexico: Obesity. Mexican Health and Aging Study. https://enasem.org/MHAS_AgingInMexico.pdf
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., & Bazan, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(2), 588–593. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.588>
- Rönnemaa, E., Zethelius, B., Lannfelt, L., & Kilander, L. (2011). Vascular risk factors and dementia: 40-year follow-up of a population-based cohort. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 31(6), 460–466. <https://doi.org/10.1159/000330020>

- Rubino, G., Bulati, M., Aiello, A., Aprile, S., Gambino, C.M., Gervasi, F., et al. (2019). Sicilian centenarian offspring are more resistant to immune ageing. *Aging clinical and experimental research*, 31, 125-133 [10.1007/s40520-018-0936-7].
- Salloway, S., Chalkias, S., Barkhof, F., Burkett, P., Barakos, J., Purcell, D., Suhy, J., Forrester, F., Tian, Y., Umans, K., Wang, G., Singhal, P., Budd Haeberlein, S., & Smirnakis, K. (2022). Amyloid-Related Imaging Abnormalities in 2 Phase 3 Studies Evaluating Aducanumab in Patients with Early Alzheimer Disease. *Journal of the American Medical Association neurology*, 79(1), 13–21. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.4161>
- Salloway, S., Sperling, R., Keren, R., Porsteinsson, A. P., van Dyck, C. H., Tariot, P. N., Gilman, S., Arnold, D., Abushakra, S., Hernandez, C., Crans, G., Liang, E., Quinn, G., Bairu, M., Pastrak, A., Cedarbaum, J. M., & ELND005-AD201 Investigators (2011). A phase 2 randomized trial of ELND005, scyllo-inositol, in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*, 77(13), 1253–1262. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182309fa5>
- Samieri, C., Perier, M. C., Gaye, B., Proust-Lima, C., Helmer, C., Dartigues, J. F., Berr, C., Tzourio, C., & Empana, J. P. (2018). Association of Cardiovascular Health Level in Older Age with Cognitive Decline and Incident Dementia. *Journal of the American Medical Association neurology*, 320(7), 657–664. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.11499>
- Sayegh, R.S.R., Batista, C., Melo R., Riske, K.A., Daffre. S., Montich, G., & da Silva Junior, PI. (2016). Longipin: An Amyloid Antimicrobial Peptide from the Harvestman *Acutisoma longipes* (Arachnida: Opiliones) with Preferential Affinity for Anionic Vesicles. *PLoS One* 11, e0167953-e0167953.
- Sampson, T. R., Debelius, J. W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G. G., Ilhan, Z. E., Challis, C., Schretter, C. E., Rocha, S., Gradinaru, V., Chesselet, M. F., Keshavarzian, A., Shannon, K. M., Krajmalnik-Brown, R., Wittung-Stafshede, P., Knight, R., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*, 167(6), 1469–1480.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018>
- Schiweck, C., Valles-Colomer, M., Arolt, V., Müller, N., Raes, J., Wijkhuijs, A., Claes, S., Drexhage, H., & Vrieze, E. (2020). Depression and suicidality: A link to premature T helper cell aging and increased Th17 cells. *Brain, behavior, and immunity*, 87, 603–609. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.02.005>
- Schneider, L. S., Mangialasche, F., Andreasen, N., Feldman, H., Giacobini, E., Jones, R., Mantua, V., Mecocci, P., Pani, L., Winblad, B., & Kivipelto, M. (2014). Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014. *Journal of internal medicine*, 275(3), 251–283. <https://doi.org/10.1111/joim.12191>
- Schwartz, M., & Deczkowska, A. (2016). Neurological Disease as a Failure of Brain-Immune Crosstalk: The Multiple Faces of Neuroinflammation. *Trends in immunology*, 37(10), 668–679. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.001>
- Shanley, D. P., Aw, D., Manley, N. R., & Palmer, D. B. (2009). An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence. *Trends in immunology*, 30(7), 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.05.001>

- Siddharth, J., Chakrabarti, A., Pannérec, A., Karaz, S., Morin-Rivron, D., Masoodi, M., Feige, J. N., & Parkinson, S. J. (2017). Aging and sarcopenia associate with specific interactions between gut microbes, serum biomarkers and host physiology in rats. *Aging*, 9(7), 1698–1720. <https://doi.org/10.18632/aging.101262>
- Simons, M. P., O'Donnell, M. A., & Griffith, T. S. (2008). Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. *Urologic oncology*, 26(4), 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2007.11.031>
- Serrano-Pozo, Alberto, Matthew P. Frosch, Eliezer Masliah, & Bradley T. Hyman. (2011). “Neuropathological alterations in Alzheimer disease.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 1(1), 1–23.
- Soragni, A., Yousefi, S., Stoeckle, C., Soriaga, A. B., Sawaya, M. R., Kozlowski, E., Schmid, I., Radonjic-Hoesli, S., Boutet, S., Williams, G. J., Messerschmidt, M., Seibert, M. M., Cascio, D., Zatsepin, N. A., Burghammer, M., Riekel, C., Colletier, J. P., Riek, R., Eisenberg, D. S., & Simon, H. U. (2015). Toxicity of eosinophil MBP is repressed by intracellular crystallization and promoted by extracellular aggregation. *Molecular cell*, 57(6), 1011–1021. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.026>
- Soscia, S. J., Kirby, J. E., Washicosky, K. J., Tucker, S. M., Ingelsson, M., Hyman, B., Burton, M. A., Goldstein, L. E., Duong, S., Tanzi, R. E., & Moir, R. D. (2010). The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PloS one*, 5(3), e9505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009505>
- Sperling, R. A., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Bennett, D. A., Craft, S., Fagan, A. M., Iwatsubo, T., Jack, C. R., Jr, Kaye, J., Montine, T. J., Park, D. C., Reiman, E. M., Rowe, C. C., Siemers, E., Stern, Y., Yaffe, K., Carrillo, M. C., Thies, B., Morrison-Bogorad, M., Wagster, M. V., ... Phelps, C. H. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 7(3), 280–292. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.003>
- Sperling, R. A., Jack, C. R., Jr, Black, S. E., Frosch, M. P., Greenberg, S. M., Hyman, B. T., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, W., Bednar, M. M., Black, R. S., Brashear, H. R., Grundman, M., Siemers, E. R., Feldman, H. H., & Schindler, R. J. (2011). Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 7(4), 367–385. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.05.2351>
- Sperry, B.W. y Tang, W.H.W. (2017). Amyloid heart disease: Genetics translated into disease-modifying therapy. *Heart*. 103, 812–817.
- Spitzer, P., Condic, M., Herrmann, M., Oberstein, T. J., Scharin-Mehlmann, M., Gilbert, D. F., Friedrich, O., Grömer, T., Kornhuber, J., Lang, R., & Maler, J. M. (2016). Amyloidogenic amyloid- β -peptide variants induce microbial agglutination and exert antimicrobial activity. *Scientific reports*, 6, 32228. <https://doi.org/10.1038/srep32228>
- Rieder, R., Wisniewski, P.J., Alderman, B.L., & Campbell, S.C. (2017). Microbes and mental health: A review. *Brain Behave. Immunity*. 66, 9–17.

- Steel, A. J., & Eslick, G. D. (2015). Herpes Viruses Increase the Risk of Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *Journal of Alzheimer's disease*, 47(2), 351–364. <https://doi.org/10.3233/JAD-140822>
- Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wilkinson, K., van Gils, J. M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K. J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W. A., Lacy-Hulbert, A., El Khoury, J., Golenbock, D. T., & Moore, K. J. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature immunology*, 11(2), 155–161. <https://doi.org/10.1038/ni.1836>
- Tarasoff-Conway, J. M., Carare, R. O., Osorio, R. S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., Axel, L., Rusinek, H., Nicholson, C., Zlokovic, B. V., Frangione, B., Blennow, K., Ménard, J., Zetterberg, H., Wisniewski, T., & de Leon, M. J. (2015). Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nature reviews. Neurology*, 11(8), 457–470. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2015.119>
- Takeda, K., & Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Seminars in immunology*, 16(1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2003.10.003>
- Tayeb, H. O., Yang, H. D., Price, B. H., & Tarazi, F. I. (2012). Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacology & therapeutics*, 134(1), 8–25. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.12.002>
- Togo, T., Akiyama, H., Iseki, E., Kondo, H., Ikeda, K., Kato, M., Oda, T., Tsuchiya, K., & Kosaka, K. (2002). Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *Journal of neuroimmunology*, 124(1-2), 83–92. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(01\)00496-9](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(01)00496-9)
- Tublin, J. M., Adelstein, J. M., Del Monte, F., Combs, C. K., & Wold, L. E. (2019). Getting to the Heart of Alzheimer Disease. *Circulation research*, 124(1), 142–149. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313563>
- Umeda, T., Ono, K., Sakai, A., Yamashita, M., Mizuguchi, M., Klein, W. L., Yamada, M., Mori, H., & Tomiyama, T. (2016). Rifampicin is a candidate preventive medicine against amyloid- β and tau oligomers. *Brain: a journal of neurology*, 139(Pt 5), 1568–1586. <https://doi.org/10.1093/brain/aww042>
- Underhill D. M. (2007). Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. *Immunological reviews*, 219, 75–87. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00548.x>
- Van de Haar, H. J., Burgmans, S., Jansen, J. F., van Osch, M. J., van Buchem, M. A., Muller, M., Hofman, P. A., Verhey, F. R., & Backes, W. H. (2016). Blood-Brain Barrier Leakage in Patients with Early Alzheimer Disease. *Radiology*, 281(2), 527–535. <https://doi.org/10.1148/radiol.2016152244>
- Vermunt, L., Sikkes, S. A. M., van den Hout, A., Handels, R., Bos, I., van der Flier, W. M., Kern, S., Ousset, P. J., Maruff, P., Skoog, I., Verhey, F. R. J., Freund-Levi, Y., Tzolaki, M., Wallin, Å. K., Olde Rikkert, M., Soinen, H., Spuru, L., Zetterberg, H., Blennow, K., Scheltens, P., ... ICTUS/DSA study groups (2019). Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 15(7), 888–898. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.04.001>

- Vogt, N. M., Kerby, R. L., Dill-McFarland, K. A., Harding, S. J., Merluzzi, A. P., Johnson, S. C., ... Rey, F. E. (2017). *Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease*. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-13601-y
- Watt, J. A., Goodarzi, Z., Veroniki, A. A., Nincic, V., Khan, P. A., Ghassemi, M., Lai, Y., Treister, V., Thompson, Y., Schneider, R., Tricco, A. C., & Straus, S. E. (2021). Comparative efficacy of interventions for reducing symptoms of depression in people with dementia: systematic review and network meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 372, n532. <https://doi.org/10.1136/bmj.n532>
- Wozniak, M. A., Mee, A. P., & Itzhaki, R. F. (2009). Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. *The Journal of pathology*, 217(1), 131–138. <https://doi.org/10.1002/path.2449>
- Wu, W., Brickman, A. M., Luchsinger, J., Ferrazzano, P., Pichiule, P., Yoshita, M., Brown, T., Decarli, C., Barnes, C. A., Mayeux, R., Vannucci, S. J., & Small, S. A. (2008). The brain in the age of old: The hippocampal formation is targeted differentially by diseases of late life. *Annals of Neurology*, 64(6), 698-706. <https://doi.org/10.1002/ana.21557>
- Zanetti M. (2004). Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *Journal of leukocyte biology*, 75(1), 39–48. <https://doi.org/10.1189/jlb.0403147>
- Zhan, X., Stamova, B., Jin, L. W., DeCarli, C., Phinney, B., & Sharp, F. R. (2016). Gram-negative bacterial molecules associate with Alzheimer disease pathology. *Neurology*, 87(22), 2324–2332. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003391>