



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**“EFECTO DE LA DISBIOSIS INTESTINAL SOBRE LOS ASTROCITOS
HIPOCAMPALES EN UN MODELO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Carlos Ledesma Alonso

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Sofía Y. Díaz Miranda (Instituto de Neurobiología-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Jaime García Mena (CINVESTAV-IPN)

Dra. Hilda Martínez Coria (Facultad de Medicina-UNAM)

Ciudad de México, enero, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

Resumen

1. Introducción
2. Antecedentes
 - 2.1. Enfermedad de Alzheimer (EA)
 - 2.1.1. Generalidades
 - 2.1.2. Epidemiología
 - 2.1.3. Etiología
 - 2.1.4. Hipocampo
 - 2.1.5. Modelo 3xTg-AD
 - 2.1.6. Astrocitos en la EA
 - 2.2. Microbiota y enfermedades neurodegenerativas
 - 2.2.1. Generalidades
 - 2.2.2. Eje Intestino-Microbiota-Cerebro
 - 2.2.3. Disbiosis intestinal
 - 2.2.4. Antibióticos
 - 2.2.5. Neuroinflamación
 - 2.2.6. Antecedentes directos
3. Planteamiento del problema
4. Hipótesis
5. Objetivos
6. Diseño Experimental
 - 6.1 Metodología experimental
 - 6.1.1 Animales
 - 6.1.2 Coctel de antibióticos
 - 6.1.3 Peso corporal
 - 6.1.4 Análisis de la MBI
 - 6.1.5 Genotipificación
 - 6.1.6 Laberinto acuático de Morris
 - 6.1.7 Eutanasia por perfusión

6.1.8 Inmunohistoquímica
- *Inmunodetección de GFAP*
Inmunodetección de BAM-10

6.1.9 Análisis morfométrico

6.1.10 Análisis estadístico

7. Resultados

7.1 Consumo de agua

7.2 Peso corporal

7.3 Laberinto acuático de Morris

7.4 Análisis morfométrico de astrocitos

8. Discusión

9. Conclusiones

10. Perspectivas

11. Bibliografía

12. Anexos (*Standard Operating Procedures*)

Abreviaturas

3xTg-AD	Ratón triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer
ACh	Acetilcolina
ACE	Acetilcolinesterasa
APP	Proteína precursora amiloide
β A	Péptido beta amiloide
BACE1	Beta secretasa 1
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
ChAT	Acetilcolintransferasa
EA	Enfermedad de Alzheimer
EP	Enfermedad de Parkinson
Eje HPA	Eje Hipotálamo Pituitario Adrenal
GABA	Ácido Gamma-Aminobutírico
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
LPS	Lipopolisacárido
MPC-1	Proteína Quimiotáctica de Monocitos-1
MBi	Microbiota intestinal
SNC	Sistema Nervioso Central
SNE	Sistema Nervioso Entérico
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral alfa

Agradecimientos personales

Primero que nada, aunque pueda contener cierto matiz risorio, me gustaría agradecer a los animales de laboratorio que utilicé para este proyecto de tesis que siempre cuidé y traté con respeto.

Agradezco mucho a la Dra. Sofía Díaz que permaneció conmigo de principio a fin en este trayecto, ya que me brindó su laboratorio (espacio y material de trabajo), sus conocimientos, su pasión por el trabajo y una entrañable comprensión. Agradezco a mis amigos y compañeros de laboratorio: Israel Poblano e Isaac Vázquez, que siempre tendieron su mano cuando la necesité y en adición; a mis compañeros de la maestría. También agradezco al ing. Sergio de Anda, cuyo apoyo fue imprescindible y cálido. No omitiré algunas personas que fungieron como fuentes de ignición para iniciar en este viaje: Jessica Rojas y Félix Derbez. A su vez, agradezco con creces a personas que me acompañaron a mitad de camino, pero fueron enormes pilares para poder continuar: Lourdes A. Cornejo y Alejandra Vargas. En adición, agradezco a Viridiana Chávez, por brindarme su ayuda y cariño en la fase final de todo mi trayecto.

Por último, he de agradecer a mi madre, que sin su ingente apoyo incondicional y pasión por lo que ama, nada de esto hubiera sido posible.

Agradecimientos académicos

Agradezco a todo el personal que mantuvo en buenas condiciones a los animales del bioterio: Dra. Alejandra Castilla León y el M.V.Z. Martín García Servín. Agradezco al Dr. Gustavo Pacheco y a la Dra. Alejandra Vargas por su participación en este trabajo de investigación. En adición agradezco a la M. en CF. Azucena Ruth Aguilar Vázquez por su gran apoyo como técnico de laboratorio. También agradezco a la Dra. Deisy Gasca Martínez por su gran ayuda en la Unidad de Análisis Conductual.

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más común; caracterizada por una neurodegeneración ocasionada por la acumulación de placas seniles y la proteína Tau en estado hiperfosforilado. Las investigaciones más recientes han demostrado que existe una asociación entre la EA y una disbiosis de la microbiota intestinal. La microbiota de los organismos está compuesta por bacterias, virus, protozoarios y hongos que conviven en simbiosis con el huésped. La alteración de la microbiota intestinal a través de diversas vías (neural, endocrina, inmune y metabólica) tiene repercusión a nivel cerebral. Por otra parte, el uso de antibióticos durante determinado tiempo puede modificar la diversidad y abundancia bacteriana residente del tracto gastrointestinal. Para el estudio de la EA a nivel experimental, el modelo murino triple transgénico (3xTg-AD) ha sido uno de los más estudiados sobre los mecanismos que subyacen la pérdida de memoria. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar en este modelo el consumo crónico de antibióticos durante 5 meses y su efecto sobre la memoria, así como los cambios en la astrogliosis de subcampo CA1 del hipocampo en animales tratados con el coctel de antibióticos (ampicilina, neomicina, vancomicina y metronidazol), administrado por vía oral de forma crónica después del destete. Los ratones tratados fueron evaluados en la prueba de memoria espacial y de aprendizaje, ambas dependientes del hipocampo, mediante el laberinto acuático de Morris (LAM). Asociado a este efecto, se analizó en los astrocitos la morfología (prolongaciones e intersecciones) y densidad poblacional (software *Fiji ImageJ*®) los cuales fueron marcados para visualizar la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y localizados en el *stratum radiatum* del CA1 del hipocampo. Los animales mostraron cambios conductuales en la memoria espacial de las sesiones del entrenamiento y el número de cruces en la retención, sin ningún déficit motor. El análisis morfométrico mostró astrogliosis en el grupo tratado con antibióticos, sin ninguna alteración en la morfología de los astrocitos. Estos resultados indican que una modificación en la microbiota intestinal ocasionada por el consumo crónico de antibióticos tiene repercusiones a nivel conductual y a su vez, promueve una proliferación de astrocitos en el CA1 del hipocampo.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common dementia; characterized by neurodegeneration caused by the accumulation of senile plaques and the Tau protein in a hyperphosphorylated state. The most recent research has shown that there is an association between AD and a dysbiotic gut microbiota. The microbiota is composed of bacteria, viruses, protozoa and fungi that coexist in symbiosis with the host. The microbiota alteration through various pathways (neural, endocrine, immune and metabolic) has repercussions at the brain level. On the other hand, the use of antibiotics (several authors report 3 days or more) for a specific time can modify the resident bacterial abundance and diversity at the gastrointestinal tract. For the study of AD at an experimental level, the triple transgenic murine model (3xTg-AD) has been one of the most studied mechanisms underlying memory loss. Therefore, the objective of this study was to evaluate in this transgenic model effects of chronic consumption of antibiotics on memory, as well as the changes in the astroglia of the CA1 subfield of the hippocampus in animals chronically treated with the antibiotic cocktail (ampicillin, neomycin, vancomycin, and metronidazole), p.o. administered after weaning. The chronically treated mice have evaluated the spatial memory and learning tests, both dependent on the hippocampus, using the Morris water maze (LAM). Associated to, the morphology (prolongations and intersections) and population density were analyzed in the astrocytes (Fiji ImageJ® software), which were marked to visualize the glial fibrillar acid protein (GFAP) and located in the stratum radiatum of the CA1 of the hippocampus. The animals showed behavioral changes in the training sessions and the number of retention crosses, no motor deficits. The morphometrical analysis showed astrogliosis in the group treated with antibiotics, without any alteration in the morphology of the astrocytes. These results indicate that a modification in the intestinal microbiota caused by chronic antibiotic use has behavioral repercussions and, in turn, promotes astrocyte proliferation in the CA1 of the hippocampus.

Introducción

En el organismo humano la microbiota intestinal (MBi) se compone de virus, hongos, parásitos y bacterias, que viven en simbiosis estableciendo el eje microbiota-intestino-cerebro a través de vías de comunicación: nerviosa, endocrina e inmunológica. En la enfermedad de Alzheimer (EA) existe un desbalance en las poblaciones microbianas por lo que se ha propuesto un papel de las bacterias intestinales comensales en la progresión del deterioro cognitivo en la EA (Kinross, Darzi, & Nicholson, 2011; Jiang, Li, Huang, Liu, & Zhao, 2017). Así se ha propuesto que las bacterias intestinales pueden llegar a modular esta enfermedad neurodegenerativa tomando como un factor, la permeabilidad intestinal (Yarandi et al., 2016). Además y dado que el sistema inmune tiene conexión con el sistema nervioso central (SNC), una disbiosis de la MBi puede estar relacionada con la neuroinflamación central (citocinas proinflamatorias) (Hsiao et al., 2013). Se han evidenciado alteraciones cognitivas (reconocimiento de objetos) en ratones cuando se les induce una disbiosis de la MBi por la ingesta diaria de antibióticos (Desbonnet et al., 2015). Por otra parte, en el modelo 3xTg-AD se ha reportado una alteración de la MBi, en cuanto a abundancia relativa (Syeda et al., 2018).

Tomando en cuenta esta conexión de la MBi con el cerebro, la microglía y los astrocitos juegan un rol importante en esta comunicación (García-Cáceres et al., 2019); porque forman parte de la barrera hematoencefálica y cuya función es proporcionar homeostasis neuronal y participar en eventos de plasticidad sináptica (Wang & Bordey, 2008). Se ha reportado una disminución en el contenido de la proteína glial (GFAP) de los astrocitos del 3xTg-AD, localizados en la corteza entorrinal desde los 30 días de edad (Yeh et al., 2011), y en la corteza cerebral a los 3 meses (Kulijewicz-Nawrot et al., 2012). Sin embargo, no se sabe si estas alteraciones en este modelo se relacionan a un deterioro cognitivo por la disbiosis de la MBi reportada. Así, se espera que al modificar la microbiota en el 3xTg-AD por el consumo de antibióticos podría aminorar el déficit cognitivo en una prueba de memoria espacial. Por lo tanto, se propone la hipótesis acerca de que el déficit

cognitivo (regulado por el hipocampo) del 3xTg-AD, esté asociado a la variación MBI que afecta a los astrocitos.

2. Antecedentes

2.1 Enfermedad de Alzheimer

2.1.1 Generalidades

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más común relacionada con la edad (Oboudiyat et al., 2013; Querfurth & LaFerla, 2010), la cual afecta primordialmente a personas mayores de 70 años. Dado el aumento en la expectativa de vida, el número de personas que padecen la EA es cada vez mayor y esto tiene un fuerte impacto en la economía («2016 Alzheimer's Disease Facts and Figures», 2016; Maresova et al., 2016). Los síntomas notables son la pérdida de memoria, incapacidad para planificar, pérdida del juicio, cambios repentinos de humor, afasias¹ y dificultades para llevar a cabo tareas sencillas (Purves, 2008). Actualmente la etiología para la EA es incierta, ya que es de origen multifactorial.

En noviembre de 1901, en Frankfurt, Alemania, ingresó en un hospital psiquiátrico la paciente de avanzada edad llamada Auguste Deter, con un cuadro clínico muy peculiar, ya que padecía de una pérdida de la memoria, acompañada de alucinaciones, desorientación tiempo-espacial, paranoia, afasias y trastornos conductuales (Maurer, 2006).

En la autopsia del cerebro de la Sra. Deter, realizada por el Dr. Aloisus Alzheimer (1864-1915), su médico psiquiatra, realizó un hallazgo histológico que dio pie a una ingente cantidad de investigaciones con relación a las enfermedades neurodegenerativas. Reveló que la histología del cerebro de la Sra. Deter presentaba placas difusas compuestas por una proteína amiloidea y marañas neurofibrilares compuestas de una proteína asociada a microtúbulos llamada Tau. Presentó estos hallazgos a un reconocido psiquiatra E. Kraepelin (1856-1926) y a otros médicos alemanes, instándoles que su descubrimiento histológico tenía relación con la sintomatología de la mujer y estas evidencias no se habían descrito antes (Hippius & Neundörfer, 2003).

¹ Las afasias son trastornos del lenguaje catalogadas en dos tipos en función al área cerebral afectada. Pueden ser motoras o sensoriales, llamadas afasias de Broca y Wernicke respectivamente.

Los trastornos en la función de la memoria reciente son los síntomas típicos que conducen a la sospecha y al diagnóstico de la EA. Los pacientes repiten sus propias palabras en una conversación, vuelven a realizar las mismas preguntas u olvidan conversaciones recientes (Dickson & Weller, Neurodegeneración 2ª Ed., 2012). Estos trastornos se asocian a las tres alteraciones histopatológicas típicas de la EA que son; la acumulación de placas seniles compuestas por la agregación y mal plegamiento del péptido β A, marañas neurofibrilares; compuestas por una proteína asociada a microtúbulos (Tau) de naturaleza hiperfosforilada y pérdida de neuronas y de materia blanca. A su vez, se manifiestan otras alteraciones asociadas como: angiopatías, neuroinflamación y estrés oxidativo (LaFerla & Green, 2012).

En cuanto al estado cerebral de pacientes con la EA se puede observar de manera macroscópica la atrofia cerebral, la responsable de la disminución del peso y el volumen del encéfalo. Además se ha reportado una dilatación de los ventrículos², adelgazamiento de las circunvoluciones cerebrales, aumento en la profundidad de los surcos y esclerosis hipocampal (van de Pol et al., 2006).

2.1.2 Epidemiología

Según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la demencia afecta cerca de 50 millones de personas. El 60% de esas personas viven en países en vías de desarrollo, y cada año se registran alrededor de 10 millones de casos nuevos. Se prevé que el número total de personas con demencia alcance los 82 millones en 2030 y 152 millones en el año 2050 (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>).

Los estudios de prevalencia e incidencia han mostrado una tasa de demencia mayor en mujeres que en hombres. Por datos como los anteriores la OMS reconoció a la demencia como prioridad de salud pública. La mayoría de los casos son de índole esporádica (99%) y el resto (~1%) son de índole familiar, que es autosómica dominante por la alteración en el gen de la APP (proteína precursora amiloide, por sus siglas en inglés), que se ubica en el brazo largo del

² También conocido como ventriculomegalia.

cromosoma 21 (Mayeux & Stern, 2012). Además, existe otro gen asociado a la aparición de la EA; el de la Apolipoproteína E (APOE) y sus alelos épsilon (ϵ) que está asociada a la aparición temprana de esta patología (Bickeböller et al., 1997).

2.1.3 Etiología

Actualmente la etiología de la EA es desconocida y considerada como multifactorial; sin embargo, se han propuesto varias hipótesis para explicarla: la hipótesis colinérgica para la EA (Francis et al., 1999), la mitocondrial (Swerdlow, 2018), la de la alteración del calcio (Alzheimer's Association Calcium Hypothesis Workgroup, 2017), y la de la cascada amiloide (Hardy & Higgins, 1992; Mucke & Selkoe, 2012). No obstante, de manera reciente también se vincula con trastornos hemodinámicos y nutricionales (de la Torre, 2018; Kinross et al., 2011).

2.1.4 Hipocampo

El hipocampo es una elevación convexa de materia gris dentro del giro hipocampal, ubicada en el interior del asta inferior del ventrículo lateral (Fogwe et al., 2020) y es una estructura cerebral relacionada con la formación de memoria (Battaglia et al., 2011), así como los procesos de la navegación, la memoria espacial y la ansiedad también están asociados con el hipocampo (Bannerman et al., 2014).

Esta estructura consiste en una población heterogénea de neuronas que se distinguen por características morfológicas especiales y por su conectividad (Leuner & Gould, 2010). Está organizada por tres capas de células que reciben aferencias de las áreas de asociación de la neocorteza a través de las cortezas perirrinal, la parahipocampal y la entorrinal (Bartsch & Wulff, 2015). Anatómicamente, el hipocampo consta de tres grandes subcampos (CA1, CA2 y CA3) y forman parte de la formación hipocampal (giro dentado, el subículo y la corteza entorrinal) (Schultz & Engelhardt, 2014).

Se sabe que existe una comunicación bidireccional entre el subículo y el CA1, y esta interacción es crucial en los procesos de reconocimiento de objetos, aprendizaje y memoria (Sun et al., 2019).

Una característica funcional del hipocampo es su hiperexcitabilidad, que le permite mantener un estímulo eléctrico débil en una estimulación prolongada y sostenida, iniciada por un estímulo eléctrico débil, esta capacidad le ayuda a codificar la memoria sensorial (Fogwe et al., 2020), por lo que es considerado como modelo clásico de estudios relacionados con la plasticidad neuronal, que es fundamental en el aprendizaje y la memoria (Bartsch & Wulff, 2015).

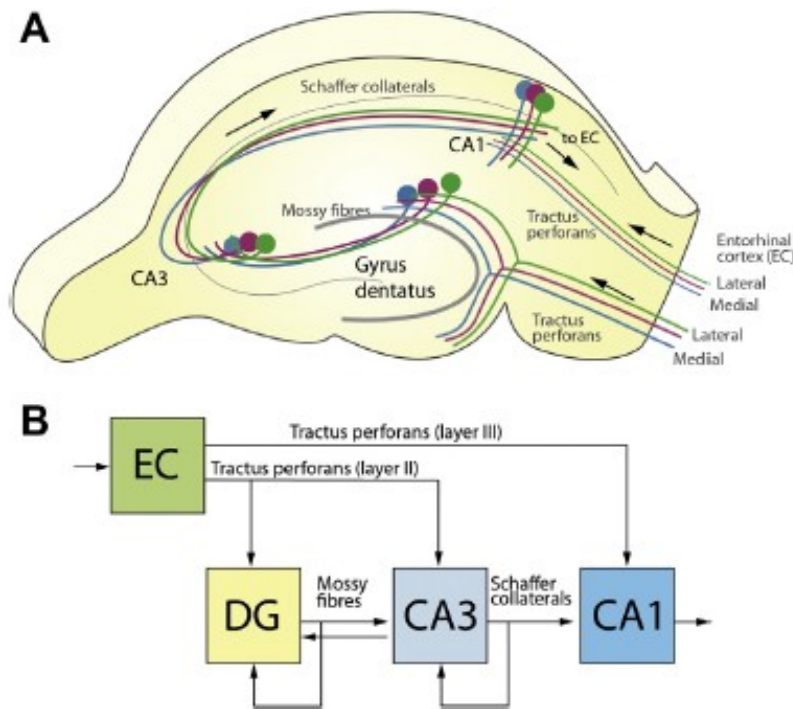


Figura 1. A) Anatomía intrínseca del hipocampo, la vía intra-trisináptica es el principal circuito de retroalimentación relacionado con el procesamiento de información a través del hipocampo. B) Diagrama de flujo de la dirección de información a través del hipocampo destacando el procesamiento paralelo de la información, así como el redes recíprocas asociativas, colaterales de Shaffer, fibras musgosas y la vía perforante de la corteza entorrinal (EC), giro dentado (DG), CA1 y CA3 (Modificado de Bartsch & Wulff, 2015).

En modelos animales murinos se sabe que un daño en el hipocampo provoca un deterioro en la memoria de tipo espacial y de reconocimiento de objetos (Broadbent et al., 2004). Incluso se ha mostrado que, en ratas viejas, el deterioro en el aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris está asociada a una pérdida de sinapsis en el estrato radiado del CA1 (Geinisman et al., 2004).

2.1.5 Modelo triple transgénico para la EA (3xTg-AD)

Para una mayor comprensión sobre la EA, se han utilizado modelos animales que simulan algunas características histopatológicas y, en consecuencia, muestran alteraciones conductuales. Un modelo utilizado es el 3xTg-AD, que es un ratón *Knock-in* transgénico insertado con tres genes humanos (PS1_{M146V}, tau_{P301L}, APP_{Swe}) que codifican el péptido β A (beta amiloide), y la proteína Tau hiperfosforilada (Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003). En adición, la agregación de β A precede a la formación de marañas neurofibrilares (Oddo, Caccamo, Kitazawa, et al., 2003).

En ratones transgénicos para la EA, se ha asociado la aparición de placas β A en diversas áreas del cerebro, a déficits cognitivos, sin embargo, algunos señalan que la falla sináptica precede a la formación de placas y este evento se lo atribuyen al mal plegamiento de los oligómeros solubles del péptido β A, más que las placas *per se* (Brouillette et al., 2012).

Estos modelos transgénicos presentan algunas alteraciones conductuales (Sterniczuk et al., 2010). Por ejemplo, en el laberinto de Hebb-William, donde se evaluó la memoria espacial en ratones hembras y machos (3xTg-AD) de 4 meses, presentaron un déficit cognitivo desde la fase de adquisición (Fertan et al., 2019); sin embargo, las hembras presentaron un peor desempeño en comparación con los machos de 6 meses en el laberinto acuático de Morris (LAM) (Clinton et al., 2007), aunque en ambos estaba patente un déficit cognitivo.

Así mismo, Billings, Oddo, Green, McGaugh, y LaFerla, (2005), demostraron que hay una acumulación intracelular del péptido β A desde los 4 meses en el hipocampo de estos ratones, no obstante, señalan que el primer deterioro cognitivo en desarrollarse es la retención y no el aprendizaje.

Por otra parte, existen diferencias entre machos y hembras a nivel de sistema inmune; los machos tienen una tasa de mortalidad más elevada que las hembras 3xTg-AD (Stover et al., 2015).

Estas diferencias entre ambos sexos se pueden asociar a los niveles de estrógenos presentes en las hembras en el proestro y la síntesis local de aromatasa en el cerebro y esto puede tener una participación importante en eventos sinápticos (Overk et al., 2013).

2.1.6 Astrocitos en la EA

La astrogliá es un tipo de células del SNC (también conocidas como astrocitos), de origen neuroepitelial, ectodérmico, que proveen homeostasis a las neuronas en el SNC y a su vez, son altamente heterogéneos en su forma y función y tienen una capacidad plástica que define el mantenimiento del SNC en el desarrollo e incluso en la vejez (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). La heterogeneidad de los astrocitos está conferida a grosso modo por su morfología y por proteínas estructurales tales como la GFAP y las proteínas transportadoras de glutamato-aspartato (GLAST, por sus siglas en inglés) (Pestana et al., 2020).

Los astrocitos según su morfología y localización se han clasificado en dos subtipos: los fibrosos que se hallan en la sustancia blanca y los protoplasmáticos, en la sustancia gris. A su vez, existen otras células gliales durante el desarrollo similares a los astrocitos, como las células radiales; también se encuentra la glía de Bergmann en el cerebelo, o la de Müller en la retina que cumplen con funciones parecidas (Matias et al., 2019).

Los astrocitos poseen una amplia gama de funciones en el SNC tales como: síntesis de proteínas de la matriz extracelular, moléculas de adhesión y factores de crecimiento, participan en la angiogénesis y el mantenimiento de la barrera hematoencefálica, captura de neurotransmisores (glutamato y GABA), participan en el soporte metabólico (Wang & Bordey, 2008), también fungen como sensores metabólicos en la ingesta de comida (García-Cáceres et al., 2019), a la vez se comunican con las neuronas, y en la liberación de exosomas por parte de sus prolongaciones que se dirigen a otras células nerviosas con funciones como neuroprotección o expresión de receptores (Venturini et al., 2019) e incluso llegan a participar como células de defensa; ya que expresan el complejo mayor de

histocompatibilidad tipo II y liberan algunas citocinas proinflamatorias como el TNF- α (Dong & Benveniste, 2001).

Dada la participación crucial que tienen los astrocitos en la formación de sinapsis y soporte metabólico poseen una estrecha relación en los procesos cognitivos como la formación de la memoria y la consolidación (Adamsky & Goshen, 2018).

En el hipocampo, en particular en el estrato radiado³ del CA1, los astrocitos marcados con GFAP muestran que su morfología es estelar, son protoplasmáticos y estos procesos astrocíticos generan dominios espaciales (Bushong et al., 2002). Otros estudios con GFAP y técnicas argénticas revelan que estos dominios generados por los astrocitos son discretos y solo se traslapa una pequeña parte de ellos en la periferia (Ogata & Kosaka, 2002).

Sin embargo, estas células también son susceptibles a sufrir distintos daños como consecuencia a sus respuestas o intentos de mantener la homeostasis (Verkhatsky & Nedergaard, 2018).

De hecho, se ha realizado un glosario de astropatología que incluye afecciones propias de los astrocitos tales como: reactividad de astrogliá, atrofia astrocítica, pérdida de la función y remodelación patológica astrogliá (Verkhatsky et al., 2019). En las últimas décadas se ha incrementado el estudio de los astrocitos implicados en las enfermedades neurodegenerativas como la EA, en donde los astrocitos tienden a la degenerarse y atrofiarse (Verkhatsky et al., 2019). En adición, la astrogliosis es una característica morfológica típica en los cerebros con la EA ya que tratan de reemplazar a las neuronas muertas (Blasko et al., 2004).

A la vez, se han realizado numerosos estudios en ratones 3xTg-AD, donde muestran que los astrocitos tienen cambios morfológicos durante el desarrollo de la patología. Así, en ratones (3xTg-AD) de 6 meses de edad, los astrocitos del giro dentado del hipocampo muestran una tendencia clara a reducir la superficie de la proteína fibrilar gliá (GFAP, por sus siglas en inglés) en un 44% y su volumen en un 55% (Olabarria et al., 2010). Esta observación se refiere a que los astrocitos

³ *Stratum radiatum*, en latín.

que rodean las placas beta amiloide (A β) en el CA1 incrementan de manera significativa la superficie del GFAP en comparación con los que se encuentran lejos (Olabarria et al., 2010).

Los astrocitos en la corteza entorrinal de ratones 3xTg-AD, muestran atrofia de sus procesos al mes de edad (Yeh et al., 2011), y a los 3 meses de edad en la capa I de la corteza en este mismo modelo se reduce su área en un 37 % y el volumen en un 48%. Pero hay una atrofia mayor del 50 % en la capa II asociada a una reducción de su volumen (Kulijewicz-Nawrot et al., 2012). Estos estudios son evidencia de que este modelo transgénico muestra alteraciones en los astrocitos.

2.2 Microbiota intestinal y enfermedades neurodegenerativas

2.2.1 Generalidades

A principios del siglo pasado Metchnikoff (1845-1916), un científico ruso que trabajaba en el instituto Pasteur, ya había propuesto la idea de que el microbioma intestinal era dinámico y que las bacterias «negativas» se podían de alguna manera remplazar por bacterias «positivas» (Cresci & Bawden, 2015). William James y Carl Lange introdujeron por primera vez el concepto de comunicación bidireccional entre el SNC y los intestinos (Giau et al., 2018).

Al conjunto de bacterias, hongos, virus y parásitos, junto con sus genes y metabolitos se le conoce como microbioma (Cresci & Bawden, 2015), y el término microbiota general, no incluye genes, ni metabolitos. En el cuerpo del humano, existen alrededor de 10^{14} microorganismos (bacterias en su gran mayoría), unas mil variedades de especies, conviviendo en simbiosis con el huésped (O'Hara & Shanahan, 2006), siendo ese número mayor por 10 o 100 veces al número total de células eucariotas de todo el organismo humano.

Los filos de bacterias más numerosos en el humano son; *Firmicutes*, que contiene 301 filotipos; *Bacteroidetes* con 65, menos numerosos son; *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* y *Verrucomicrobia* (Eckburg et al., 2005).

Algunos análisis revelan que las bacterias de la microbiota intestinal tienen funciones esenciales como el transporte de carbohidratos, lípidos, aminoácidos y iones inorgánicos (Gill et al., 2006), por lo que tienen una participación relevante en el metabolismo del organismo y está relacionada con estados de salud y

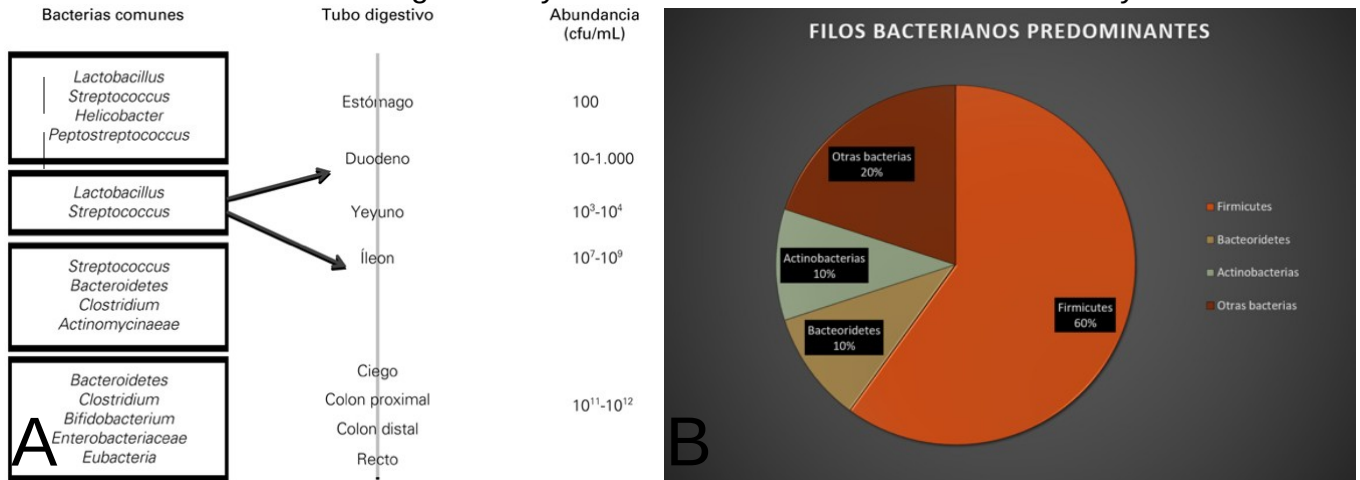


Figura 2. A) Cantidad y variedad de microorganismos a lo largo del tubo digestivo humano. B) Principales filos bacterianos predominantes en la microbiota gastrointestinal humana (Tomado de Gomez-Eguilaz et al., 2019)

enfermedad. Además, se sabe que gran cantidad de serotonina (5-HT) se produce a lo largo del tracto intestinal (Jameson & Hsiao, 2018), por ello se han realizado investigaciones relacionadas con depresión, estrés y ansiedad con ratones libres de gérmenes (Foster & McVey Neufeld, 2013).

Por lo tanto, se sostiene la idea de que la microbiota intestinal y su diversidad taxonómica está fuertemente asociado a múltiples enfermedades como autismo (Vuong & Hsiao, 2017), enfermedad de Parkinson (EP) (Sampson et al., 2016), o la EA (Jiang et al., 2017; Kinross et al., 2011).

En este contexto, se ha llegado a proponer la hipótesis de la *higiene de la EA*, la cual sostiene que nuestra interacción con diferentes microorganismos puede llegar a afectar al sistema inmune asociado a una correlación negativa con una gran diversidad de bacterias y su contra parte, una correlación positiva, vivir en un ambiente sanitizado (Angelucci et al., 2019).

2.2.2 Eje Intestino-microbiota-cerebro

La MBI se comunica con el SNC por tres vías principalmente: la nerviosa (mediada por el par craneal X o nervio vago), la endócrina (hormonas y el eje HPA) y por el sistema inmune (leucocitos, citocinas proinflamatorias) (Quigley, 2017).

El SNC también se comunica con el Sistema Nervioso Entérico (SNE), que está altamente inervado (posee más neuronas que la médula espinal) porque cuenta con dos plexos nerviosos de gran tamaño: mientérico y submucoso, su comunicación es bidireccional e intervienen diversos factores como la permeabilidad intestinal y el estrés (Figura 2) (Yarandi et al. 2016).

Los ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) producidos por las bacterias intestinales, al cruzar la barrera hematoencefálica juegan un papel importante en el mantenimiento de su integridad y por vía vagal cumplen otras funciones metabólicas importantes en distintas células, como astrocitos y microglía (Silva et al., 2020). Por lo tanto, tienen una participación relevante en la homeostasis del SNC.

Además, la información acerca del ambiente luminal del intestino como la hiperosmolaridad, niveles de carbohidratos, distorsión mecánica de la mucosa y productos metabólicos de las bacterias también viajan por medio del nervio vago hasta el SNC (Rhee et al., 2009).

A su vez, las células enterocromafines localizadas a lo largo del tracto entérico, producen péptidos de señalización como CRH (factor liberador de corticotropina, por sus siglas en inglés), somatostatina y colecistocinina, en respuesta a eventos fisiológicos o patológicos, e interactúa de manera paracrina con los nervios aferentes que se hallan cerca de esas células (Rhee et al., 2009), evidencia que hace énfasis en la comunicación bidireccional del SNC con el SNE.

También las bacterias intestinales son reguladores potentes de la mucosa y del sistema inmune, activando células T CD4⁺ con citocinas proinflamatorias (Fung et al., 2017).

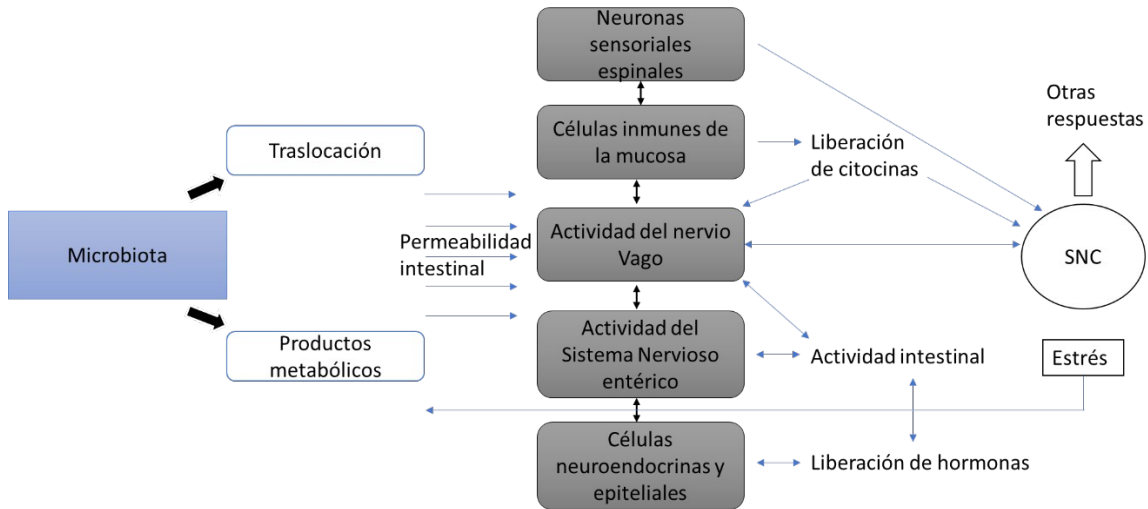


Figura 3. Interacción entre la MBI y el SNC. Diversos factores afectan la comunicación que es de naturaleza bidireccional. Imagen modificada de *Yarandi et al., 2016*.

Además de su participación relevante en eventos fisiológicos, también son susceptibles de participar en patologías. Una gran cantidad de evidencia sugiere que la MBI además de contribuir de manera importante en la homeostasis general del organismo, tiene gran influencia en contribuir al riesgo de producir enfermedades e incluso de padecer ansiedad y trastornos emocionales (Foster & McVey Neufeld, 2013).

El impacto que llega a tener la MBI en el organismo es tal, que un estudio demostró que la microbiota de pacientes con trasplantes alogénicos de tejido hematopoyético tuvo una pérdida de la diversidad bacteriana y esta evidencia predecía el riesgo que tenían de morir (Peled et al., 2020).

En animales como los ratones, la MBI es esencial para el adecuado desarrollo de las interacciones sociales (Desbonnet et al., 2014). Esto puede ser debido a que durante las interacciones sociales hay una liberación de oxitocina por parte del núcleo paraventricular del hipotálamo lo que incrementa la actividad dopaminérgica en el área tegmental ventral. El reforzamiento social se da por la interacción de los neurotransmisores, dopamina, oxitocina y serotonina (Vuong & Hsiao, 2019). Es interesante resaltar que un tratamiento p.o. con *Lactobacillus reuteri* en un modelo murino de autismo que presentaba alteraciones en la oxitocina, mejoró sus interacciones sociales (Sgritta et al., 2019).

2.2.3 Disbiosis intestinal

La proliferación de familias de bacterias que generan estados patológicos y propician un desequilibrio en la composición de una MBI adecuada se le conoce con el nombre de disbiosis (Sekirov et al., 2010).

Además se sabe que la composición de la microbiota en el humano va cambiando en función a la edad; así en la infancia, el filo más numeroso es *Bacteroidetes* en relación al filo *Firmicutes* que es el predominante en la adultez; sin embargo, en la vejez esto se invierte siendo el filo *Bacteroidetes* el más numeroso (Mariat et al., 2009).

Son muchos los factores que intervienen en la variación de la diversidad de las familias de la microbiota, tales como la dieta, el consumo de probióticos y prebióticos, la obesidad, drogas, la región, el genotipo o incluso el género están involucrados (Delzenne & Cani, 2011). No obstante, uno de los factores que más impacta la composición taxonómica de la microbiota son los antibióticos, ya que con tan sólo unos cuantos días de consumo continuo puede modificar la diversidad microbiana (Lange et al., 2016).

Para constatar la importancia del impacto y la relación que tiene la MBI se ha realizado estudios en ratones libres de gérmenes o *Germ Free* (GF, por sus siglas en inglés).

Estos ratones han sido empleados en estudios de enfermedades neurológicas; de plasticidad (neurogénesis, actividad neuronal, transcriptomas); de neuroprotección (permeabilidad de la barrera hematoencefálica, microglía); de neurotransmisión (cantidad de receptores); de síntesis de factores neurotróficos y de estrés (Luczynski, McVey Neufeld, et al., 2016). Los resultados de dichas investigaciones han revelado que los ratones GF, tienen alteraciones en cada uno de ellos.

Incluso hay diferencias sexuales en este tipo de ratones manifestadas en el hipocampo. En ratones macho GF, se ha observado una disminución del mRNA de BDNF pero las hembras presentan el efecto contrario (Clarke et al., 2013).

También se han realizado estudios en ratones transgénicos APPPS₁ (de 3.5 y 8 meses) en comparación con los ratones control cuya población de microbiota

es convencional y una disminución de los niveles de β A (Harach et al., 2017). Estos resultados demuestran que la microbiota está relacionada con la patología de β A en la EA.

En la figura 3 se muestra como ejemplo, la diversidad taxonómica de filos de bacterias de un ratón transgénico.

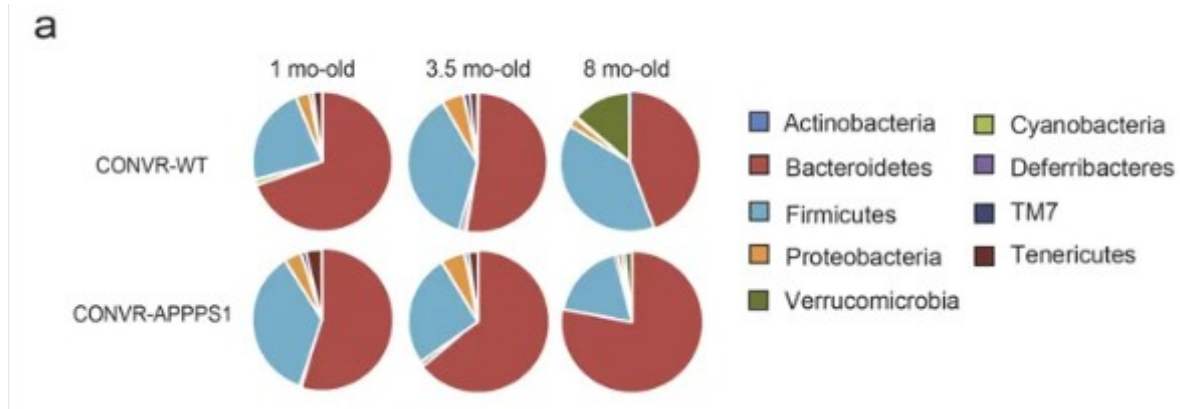


Figura 4. Secuencia de abundancia relativa de la diversidad taxonómica en *Phyla* de la MBI de ratones transgénicos APPPS1 de 1, 3.5 y 8 meses de edad (modificado de Harach et al., 2017).

Por otro lado, se ha demostrado que un trasplante fecal de pacientes con Parkinson a pacientes sin la patología, se modifica la diversidad taxonómica del microbioma, e incluso esto llega a ocasionar deterioro motor (Sampson et al., 2016). Esto sugiere de manera directa, que hay bacterias asociadas a diferentes enfermedades neurodegenerativas. También en pacientes con autismo se ha demostrado que presentan una disbiosis intestinal (Vuong & Hsiao, 2017).

2.2.4 Antibióticos

El uso de antibióticos ha tenido un gran impacto en la salud y ha logrado elevar la longevidad y calidad de vida en animales y humanos. Este descubrimiento lo realizó Alexander Fleming, en 1928, cuando observó en cultivos que el crecimiento de especies de estreptococos se inhibían ante la acción del hongo *Penicillium notatum* (Suárez & Gudiol, 2009).

La acción bactericida de los antibióticos es variada, el principio activo puede interferir con la síntesis de enzimas que actúan a nivel de proteínas, pared celular y ácidos nucleicos.

Sin embargo, dada su gran utilización en muchas áreas de la salud, algunas bacterias han generado resistencia en contra de ellos, sintetizan enzimas que los hidrolizan. Un ejemplo son los antibióticos β -lactámicos; donde las bacterias que han generado resistencia han sintetizado una enzima llamada β -lactamasa que lo degrada (Aminov, 2009).

En este contexto no sorprende que el consumo frecuente de antibióticos puede llegar a modificar la diversidad taxonómica del microbioma intestinal. Además, la disbiosis causada por consumir antibióticos tiene como consecuencia cambios en la interacción microbioma-huésped, entre especies, regulación y en la actividad metabólica (Lange et al., 2016).

En un estudio con ratones, se demostró que un consumo (p.o.) diario de un coctel de antibióticos durante 17 días afectaba la expresión de genes, siendo los más afectados los relacionados con el ciclo celular y la biosíntesis de lípidos, a su vez los genes de respuestas inflamatorias también se encontraban alterados (Reikvam et al., 2011). Incluso un consumo diario de antibióticos durante una semana afecta la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa, llegándose a mejorar la tolerancia a la glucosa en ratones (Rodrigues et al., 2017).

En particular, se ha propuesto que el consumo de antibióticos en pacientes con la EA puede tener resultados positivos, debido a la eliminación de algunas bacterias que favorecen la neuroinflamación (Angelucci et al., 2019).

Desbonnet y colaboradores (2015) realizaron un estudio donde ratones (NIH Swiss) consumían un coctel de antibióticos desde el día posnatal 21 (destete) hasta el día posnatal 80 y encontraron que había alteraciones en la tarea de reconocimiento de objetos, caja luz/oscuridad e interacciones sociales. En apoyo a estos resultados, otros estudios en ratones tratados con antibiótico intragástrico durante 2 semanas para inducir una disbiosis encontraron cambios en la expresión de proteínas de unión, como BDNF, GRIN2B (receptor ionotrópico de glutamato sub. 2B, por sus siglas en inglés), la proteína transportadora de serotonina, la actividad del eje HPA e incluso una reducción sustancial de ácidos grasos volátiles

(Fröhlich et al., 2016). Estas evidencias sugieren que el consumo de antibióticos puede llegar a generar cambios importantes en el SNC.

2.2.5 Neuroinflamación

El sistema inmune de los mamíferos es un órgano dinámico notable que responde, reconoce y se adapta en respuesta a moléculas ajenas y extrañas al organismo siendo un proceso central en la salud y en la enfermedad (Mazmanian et al., 2005).

La neuroinflamación es difícil de definir en relación con las enfermedades neurodegenerativas tipo EA, Parkinson, o en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), porque hay características histopatológicas como reactividad de astrocitos y microglía, acompañado de mediadores inflamatorios del parénquima (Ransohoff, 2016).

Las microglía son células que comprenden el sistema inmune del cerebro, representan del 5 al 12% del total de células en el SNC y cumplen con diversas funciones: censan el entorno del SNC, realizan tareas de limpieza fisiológica y de defensa en contra de agentes modificados propios o ajenos al organismo liberando citocinas proinflamatorias (Hickman et al., 2018).

En este contexto, en ratones 3xTg-AD de tres meses de edad se han hallado niveles altos del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , por sus siglas en inglés) y MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos-1, por sus siglas en inglés) en la corteza entorrinal y se relaciona con un incremento de macrófagos y microglía en esta zona (Janelsins et al., 2005).

Pese a que la microglía es la encargada de procesos inflamatorios, se considera que los astrocitos (que son más numerosos) juegan un papel significativo y continuo en relación con la microglía durante un proceso inflamatorio (Lin et al., 2018). A pesar de toda esta señalización periférica de inflamación, las placas seniles, las marañas neurofibrilares y la neurodegeneración son consideradas la mayor fuente de neuroinflamación en la EA (Akiyama et al., 2000).

En un estudio reciente utilizando ratones transgénicos machos (APP_{SWE}/PS1 Δ E9) tratados con un coctel de antibióticos durante una semana, se

encontró que se redujo la reactividad de los astrocitos marcados con GFAP alrededor de las placas β A (Minter et al., 2016). A su vez, en ausencia de señalización inflamatoria, los astrocitos no expresan BACE1 (enzima que escinde el péptido β A); sin embargo, una vez activados sí la expresan (Hartlage-Rübsamen et al., 2003). Estos hallazgos revelan que los astrocitos interactúan de diferentes maneras con el metabolismo de las placas β A.

Por otra parte, diversas bacterias como: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sero-variedad *typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, y *Mycobacterium tuberculosis*, producen fibras amiloides extracelulares, lo cual también puede contribuir al avance de la EA (Hufnagel et al., 2013).

Además las bacterias enterotoxigénicas de la microbiota también producen endotoxinas y lipopolisacáridos (LPS); moléculas que son capaces de desencadenar respuestas inflamatorias del sistema inmune, fagocitosis, activación de la microglía y mecanismos de desintoxicación, características propias de la neurodegeneración (Lukiw, 2016).

A su vez, el intestino cuenta con su propio sistema inmune: tejido linfoide asociado a intestinos (llamadas placas de Peyer). La segunda barrera física son las células epiteliales de la mucosa intestinal. Las células linfoides innatas localizadas en el epitelio activan citocinas que juegan un importante papel en respuesta a una inflamación (Shi et al., 2017).

Para una mayor comprensión de la neuroinflamación existen modelos murinos transgénicos para la EA en donde se puede observar rasgos característicos de neuroinflamación por la sobreproducción, mal plegamiento y depósito de placas β -amiloide y su interacción con neuronas y glía (Nazem et al., 2015).

2.2.6 Antecedentes directos

Se conocen dos grandes *Phyla* de bacterias que habitan la MBI de ratones: *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Mariat et al., 2009; Zhang et al., 2017). En humanos, se sabe que la relación entre estos los dos grandes filos va cambiando con la edad; así, en los infantes la proporción de *Firmicutes/Bacteroidetes* antes de los

25 años es de 0.4; en la adultez la relación es de 10.4 y vuelve a decrecer a los 70 años a 0.6 (Mariat et al., 2009).

La proporción de las bacterias que reporta Desbonnet y colaboradores, (2015), es un 45% de *Bacteroidetes*, 49% *Firmicutes*, 3% *Derrucomicrobia* y 3% de otros filos en ratones NIH Swiss de 6 meses. En el ratón 3xTg-AD, Syeda y colaboradores, (2018) reportaron en las hembras de 9 meses una abundancia relativa de 51% de *Bacteroidetes*, 41% de *Firmicutes* y 8% de *Proteobacteria*. Por otra parte, Jiang y cols., (2017) reportan en ratones transgénicos para la EA (APP_{SWE}/PS1_{ΔE9}) un porcentaje de 45% en el *phylum Bacteroidetes*, 42% *Firmicutes* y 12% *Proteobacteria*, y su control WT, 49% *Bacteroidetes*, 44% *Firmicutes*, 6% *Proteobacteria*. Estos datos revelan que la población de *Bacteroidetes* está elevada con relación a la edad y a su vez en los modelos transgénicos.

Por otra parte, se sabe que el consumo de antibióticos de manera crónica afecta la MBI, se probó en ratones NIH Swiss que el consumo diario de un coctel de antibióticos durante 6 meses a partir del destete, repercute de manera negativa en tareas conductuales y sociales (Desbonnet et al., 2015).

Como se mencionó, hay evidencia que apoya la comunicación que existe entre la MBI y el SNC y se sabe que una vía de comunicación entre la microbiota y el SNC, es la vía inmune mediada por células inflamatorias y sus citocinas y se sugiere también cómo el sistema inmune es regulado por la MBI (Hsiao et al., 2013).

Además, una investigación en ratones transgénicos machos de 6 meses en donde se comparó la carga del péptido β A tratados con un coctel de antibióticos, esta se redujo con respecto al grupo control (Minter et al., 2016).

3. Planteamiento del problema

Se ha reportado que los ratones 3xTg-AD, tienen una disbiosis de la microbiota gastrointestinal (Bello-Medina et al., 2021; Syeda et al., 2018), porque presentan una variación a la alta o a la baja de ciertos filos de bacterias y aunque no sea causa directa de su alteración conductual, hay evidencias que sugieren

que una disbiosis está relacionada con procesos neuroinflamatorios, y éstos sí pueden estar relacionados con eventos cognitivos (Nazem et al., 2015).

En relación a la neuroinflamación, histológicamente se encuentran leucocitos en la periferia de los vasos sanguíneos y una gliosis debida a un aumento de citocinas proinflamatorias como las interleucinas 1 y 6 (IL-1, 1L-6), factores TNF- α y MPC-1 (Akiyama et al., 2000; Janelins et al., 2005). En ratones 3xTg-AD de tres meses de edad, se ha reportado que hay un aumento de citocinas proinflamatorias en la corteza entorrinal (Janelins et al., 2005), además, desde el mes de edad los astrocitos presentan una atrofia (Yeh et al., 2011). La proteína GFAP de los astrocitos en el giro dentado de ratones 3xTg-AD presentan menor área de superficie en sus prolongaciones y una disminución en el volumen del soma (Olabarria et al., 2010; Verkhtsky et al., 2019). Además, se ha demostrado que en la corteza cerebral existe una atrofia astrocítica, sobre todo en las capas I y II a partir de los 3 meses de edad (Kulijewicz-Nawrot et al., 2012). Esta evidencia de alteración morfológica en los astrocitos en la EA puede estar relacionada a su déficit cognitivo. Por otro lado, Syeda y colaboradores (2018) también reportan un aumento significativo de astrocitos (astrogliosis) en el ratón 3xTg-AD con respecto a los ratones no transgénicos.

Tomando en cuenta la disbiosis intestinal que presentan los ratones 3xTg-AD y que ésta puede estar asociada a un deterioro cognitivo, una ingesta diaria de un coctel de antibióticos durante 5 meses podrá tener influencia en la microbiota, modificando el porcentaje de ciertas familias de bacterias. A su vez, este evento puede estar asociado a un cambio en la conformación morfológica de los astrocitos en el hipocampo (subículo y el CA1), ya que estas células al proporcionar una homeostasis neuronal y formar parte de la barrera hematoencefálica, pueden llegar a ser afectados de manera indirecta a partir de la interacción de la microbiota y sus metabolitos con el sistema inmune. En consecuencia y debido también a la participación crucial que poseen los astrocitos en la formación de nuevas sinapsis, que se generan en el proceso de aprendizaje, estos efectos se podrían valorar por la respuesta en una tarea de memoria espacial regulada por el hipocampo.

4. Hipótesis

Una disbiosis producida por el consumo crónico de un coctel de antibióticos en ratones 3xTg-AD:

- Aminorará su deterioro cognitivo.
- Modificará el número de los astrocitos en el CA1 del hipocampo.
- Modificará las prolongaciones e intersecciones de los astrocitos en CA1 del hipocampo
- Generará alteración en algunos géneros de bacterias de la microbiota intestinal

5. Objetivos

- Observar si el consumo diario de un coctel de antibióticos, en ratones 3xTg-AD machos a partir del día posnatal 30 (destete) hasta el día 180, produce una mejora en el desempeño conductual en el laberinto acuático de Morris.
- Determinar si el consumo diario de un coctel de antibióticos, en ratones 3xTg-AD machos a partir del día posnatal 30 (destete) hasta el día 180, produce cambios en el número y la morfología de los astrocitos del CA1 del hipocampo.

6. Diseño experimental

6.1 Metodología experimental

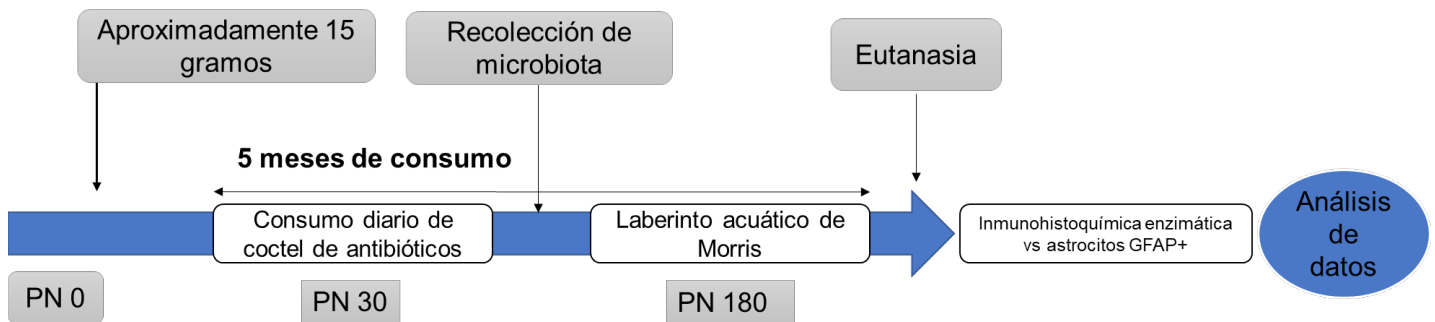


Figura 5. Representación gráfica del diseño experimental, a partir del día del destete hasta el análisis total de datos.

6.1.1 Animales

Todos los animales fueron cuidados bajo la supervisión de un Médico Veterinario, y vigilados bajo los estatutos que marca norma oficial mexicana: NOM-062-ZOO-1999 y el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología. Los ratones transgénicos 3xTg-AD (*Jackson Lab*) fueron mantenidos en un ambiente controlado de microorganismos patógenos, en un lugar adaptado y destinado al cuidado de estos animales bajo estas condiciones. Al cumplir los 30 días después del parto se les colocó en cajas habitación de policarbonato con el número de animales por caja: mínimo dos y el máximo seis. Se pesaron con el fin de alcanzar un mínimo de 15 gramos de peso, considerado adecuado para iniciar el tratamiento.

En el diseño experimental se tuvieron dos grupos de machos (3xTg-AD), cada uno con una n de 7 individuos, con y sin tratamiento de antibióticos donde el tratado consumió el antibiótico disuelto en agua.

6.1.2 Coctel de antibióticos

El coctel de antibióticos consistió en diluir 1 g de ampicilina, 1g de Neomicina, 1 gramo de metronidazol y 0.5 g de vancomicina en 1 litro de agua potable (Ochoa-Repáraz et al., 2009; Reikvam et al., 2011). Para la cuantificación diaria de ingesta de antibiótico y agua por caja de ratones se adaptaron tubos cónicos de 50 ml -tal como se muestra en la figura 5.

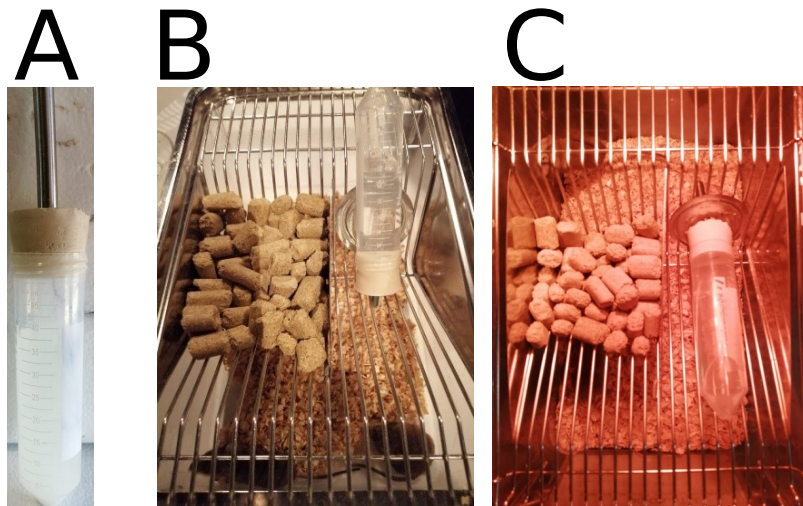


Figura 6. En A, tubo cónico de 50 ml adaptado como bebedero (para cuantificar el consumo de agua y antibiótico). B y C cajas de ratones con el tubo cónico adaptado.

Características de los antibióticos:

- La ampicilina es un antibiótico betalactámico de amplio espectro, cuya función es inhibir la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Es activo frente a enterobacterias gramnegativas (Suárez & Gudiol, 2009).
- La neomicina es un antibiótico de la familia de los aminoglucósidos, cuya función es inhibir la síntesis de proteínas, uniéndose a la subunidad 30s de los ribosomas bacterianos. Muestran una actividad bactericida frente a bacilos aerobios gramnegativos, las enterobacterias.
- La vancomicina es un antibiótico de la familia de los glucopéptidos, que inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana, su espectro es reducido, contra bacterias grampositivas.

- El metronidazol es un antibiótico y antiparasitario de la familia de los nitroimidazoles, rompe la cadena de ADN e inhibe la síntesis de ácidos nucleicos. Es efectiva frente protozoos y bacterias anaerobias (Vicente & Pérez-Trallero, 2010).

6.1.3 Peso corporal

Se registró el peso a partir de que los ratones alcanzaron un peso de entre 13 y 15 gramos, una vez por semana durante todo el tratamiento, es decir, hasta el momento de la eutanasia.

6.1.4 Análisis de la MBI

La colecta de heces fue de manera individual (ver anexos). Se recolectaron de 3 a 6 heces por ratón, se transportaron en hielo seco y se almacenaron en un ultracongelador a una temperatura de -70°C . Para su posterior análisis y secuenciación de ADN y determinar la abundancia relativa por ratón utilizando el método descrito por (Syeda et al., 2018).

6.1.5 Genotipificación

Para corroborar el fondo genético de los ratones 3xTgAD de ambos grupos se realizaron las PCR correspondientes con el fin de identificar la presencia de los transgenes: APP (que su producto mide 500 pb), Tau (con un producto de 350 pb) y PS1 (cuyo producto es de 530 pb). El material genético que se utilizó fue obtenido a partir de la parte distal de la cola de los ratones. Dicho procedimiento se llevó a cabo en las instalaciones de la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología, UNAM.

6.1.6 Laberinto acuático de Morris

Se consideraron 7 ratones por grupo (ver anexo del procedimiento). Se utilizó un tanque de color blanco de 1 m de diámetro, a una temperatura del agua de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y una plataforma de acrílico de 14 cm de diámetro oculta en uno de los

cuadrantes, sumergida 0.5 cm, con una profundidad de 17.5 cm y con señales extra laberínticas.

Se manipularon todos los ratones 3 días previos a la tarea conductual, de 3 a 5 min aproximadamente por ratón, a fin de reducir el estrés adicional.

Se realizaron 4 ensayos por sesión, en total fueron 4 sesiones, una por día, por lo tanto, fueron 16 ensayos en total. Antes del primer ensayo del primer día, todos los ratones fueron colocados 20 s en la plataforma. En cada ensayo, cada ratón fue liberado de manera aleatoria en uno de los cuadrantes, si pasaban 60 s y no encontraban la plataforma, se les guiaba de manera manual y se dejaban 20 s en la plataforma (solo en el primer ensayo de la primera sesión).

Posteriormente se sacaron del tanque y se dejaban en una caja cálida (foco infrarojo) durante 20 s después de cada ensayo. La retención del entrenamiento espacial se evaluó a las 24 h después del último ensayo. Los ratones fueron puestos a nadar durante un lapso de 1 min. sin plataforma. Todos los ratones fueron monitoreados por una cámara ubicada de tal forma que se observara desde arriba del tanque de agua y los videos fueron grabados para su posterior análisis.

Los videos fueron analizados utilizando el software *SMART*® V3.0.05 especializado que cuenta con un sistema de *videotracking* lo que permite detectar y registrar la trayectoria de los ratones dentro del tanque. Se consideraron los siguientes parámetros: tiempo en segundos que estuvieron en los 4 cuadrantes y número de veces que entraron a dichos cuadrantes.

6.1.7 Eutanasia por perfusión

A todos los ratones se les aplicó la eutanasia basada en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 con una dosis de pentobarbital (0.1 ml) vía intraperitoneal para inducir un estado de anestesia. Al verificar que el animal ya no percibía dolor (ej., pinchazo con aguja en el maslo de la cola), se realizó una incisión en la línea media abdominal, se ubicó el proceso xifoides y se cortó por el margen del diafragma para exponer el aparato cardiovascular. Una vez ubicado el corazón, se hizo un corte en la aurícula derecha provocando una hipovolemia por hemorragia, de inmediato se le inyectaron -con ayuda de una bomba de perfusión- 25 ml de PB 0.1 M (pH de 7.40) en el ápice del corazón para penetrar el

ventrículo. Inmediatamente, se le administran otros 25 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% (pH 7.4) para fijar el tejido. Una vez perfundido, se le cortó la cabeza a nivel del axis o el atlas y se expuso el cráneo. Se separan los huesos del cráneo cuya fisura es la interhemisférica y se extrajo el encéfalo para después dejarse inmerso en PFA al 4% durante 24 horas a 4°C y posteriormente se cambió el tejido a una solución con sacarosa al 30 % en tubos cónicos de 15 ml. Se volvió a almacenar por 24 h aproximadamente a 4 °C hasta que el cerebro se precipitara, ya crioprotegido.

Se montó el encéfalo en un soporte con *Tissue-Teck*® en el criostato para ser seccionado por congelación, en cortes coronales cuyo grosor fue de 40 µm.

6.1.8 Inmunohistoquímica

Inmunodetección de GFAP

Se realizaron 3 lavados de las secciones de cerebro en solución PB (solución amortiguador de fosfatos) al 0.1M, durante 10 min cada uno a temperatura ambiente. Se añadió una solución al 10% de agua oxigenada, y 10% de metanol en PB 0.1 M y se dejó en agitación constante durante 30 min, esto con el fin de inactivar la peroxidasa endógena del tejido. En seguida se hicieron 3 lavados de 10 min cada uno con PB 0.1 M para después colocar la solución de bloqueo que consta de suero de caballo al 2%, 50nM de glicina en PB 0.1 M y se dejó 30 min en agitación constante. Posteriormente, se añadió el anticuerpo primario para GFAP (monoclonal Anti-Glial Fibrillar Acidic Protein antibody, anti-mouse, G3893, Sigma Aldrich ®) a una concentración de 1:1000 añadiendo 1% de *triton X-100* y *tween 20* que constaba de suero de caballo al 2% y glicina nM y se dejó incubando durante 24 h a 4°C, en agitación.

Al segundo día, se lavaron los tejidos 3 veces durante 10 min con PB 0.1M y se incubó con el anticuerpo secundario diluido en PB 0.1M, se utilizó el anticuerpo secundario Horse anti-mouse IgG BA-2001, Vector® a una concentración de 1:500 durante 1 h y media en agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno en agitación constante con PB 0.1 M y se le añadió una gota de una solución de avidina/biotina

(VECTASTAIN® ABC Kits) y se dejó reposar durante 15 min. En seguida se vuelven a lavar los tejidos con PB 0.1 M para después revelarlos con el método de glucosa oxidasa, utilizando una solución que contiene diaminobencidina 4.7 mM, sulfato de amonio de níquel 95.1 mM disuelto en acetato de sodio pH 6, 0.2 M; Cloruro de amonio 15 mM, D-Glucosa 22.2 mM y una unidad de glucosa oxidasa. Se añadieron 20 µl de esa solución a los tejidos en agitación constante hasta que alcanzaron una coloración morada. Se detuvo la reacción con acetato de sodio al 0.1 M pH 6. Se lavaron con PB 0.1 M durante 10 min y finalmente se montaron en laminillas gelatinizadas con medio de montaje (*Entellan*®, #107960, Merck, millipore).

Inmunodetección de BAM-10

Se realizaron 3 lavados de las secciones de cerebro en solución PB (solución amortiguador de fosfatos) al 0.1M, durante 10 min cada uno a temperatura ambiente. Se añadió una solución al 10% de agua oxigenada, y 10% de metanol en PB 0.1 M y se dejó en agitación constante durante 30 min, esto con el fin de inactivar la peroxidasa endógena del tejido. Después se realizó una incubación por 5 min con ácido fórmico concentrado (98%) en agitación constante y a temperatura ambiente. En seguida se hicieron 3 lavados de 10 min cada uno con PB 0.1 M para después colocar la solución de bloqueo que consta de suero de caballo al 2%, 50nM de glicina en PB 0.1 M y se dejó 30 min en agitación constante. Posteriormente, se añadió el anticuerpo primario para βA, BAM-10 (reconoce los aminoácidos del 1-12) Anticuerpo Monoclonal anti-βA, mouse, A-5213 Sigma Aldrich® a una concentración de 1:500 añadiendo 1% de *triton X-100* y *tween 20* que constaba de suero de caballo al 2% y glicina nM y se dejó incubando durante 24 h a 4°C, en agitación constante.

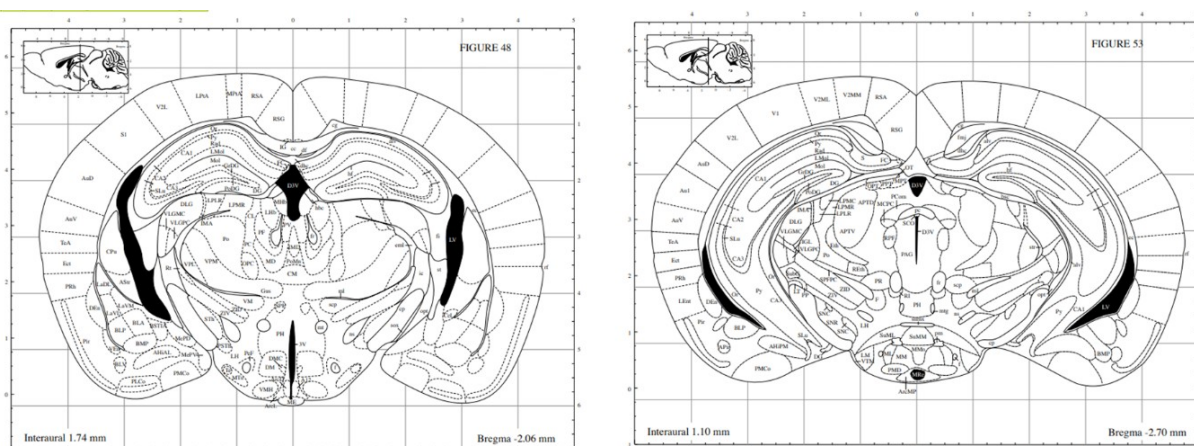
Al segundo día, se lavaron los tejidos 3 veces durante 10 min con PB 0.1M y se incubó con el anticuerpo secundario diluido en PB 0.1M, Donkey anti-mouse IgG H&L (AlexaFluor® 488) *preadsorbed* ab150103 a una concentración de 1:1000 durante 1 h y media en agitación y a temperatura ambiente y protegido de la luz. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno en agitación

constante con PB 0.1 M. Finalmente se montaron los tejidos en laminillas gelatinizadas. Se añadió el medio de montaje VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI –(H-1200-10). Los tejidos se visualizaron en el microscopio de fluorescencia Apotome-Zeiss. Este microscopio tiene una computadora adaptada con el software de captura AxioVision ver. 4.8 por Carl Zeiss.

6.1.9 Análisis morfométrico

Para la morfometría de la astrogía, se tomaron 4 secciones coronales de 40 μ de grosor por individuo (n=4), cada 3 cortes en serie.

El área para analizar fue el hipocampo dorsal, tomando como referencia (figura 6) de bregma -2.06 mm a -2.70 mm (*The Mouse Brain in stereotaxic coordinates*, Paxinos & Franklin, 2001). Se tomaron fotomicrografías con el software NIS-Elements (*Nikon Instruments*®) de las inmunohistoquímicas enzimáticas GFAP con un microscopio óptico (*Nikon*®, Modelo *Eclipse Ci-L*, *Japan*) a 20x y 40x del CA1 del hipocampo (figura 7). La calibración para el campo 40x fue 0.19, la apertura de 0.65 y el índice de refracción de 1. Se analizó el *stratum radiatum* del CA1, ya que se ha reportado que hay una asociación entre una pérdida de sinapsis en esa zona y un deterioro en la memoria espacial en ratas seniles



(Geinisman et al., 2004).

Figura 7. Secciones del hipocampo dorsal para el análisis morfométrico de los astrocitos.

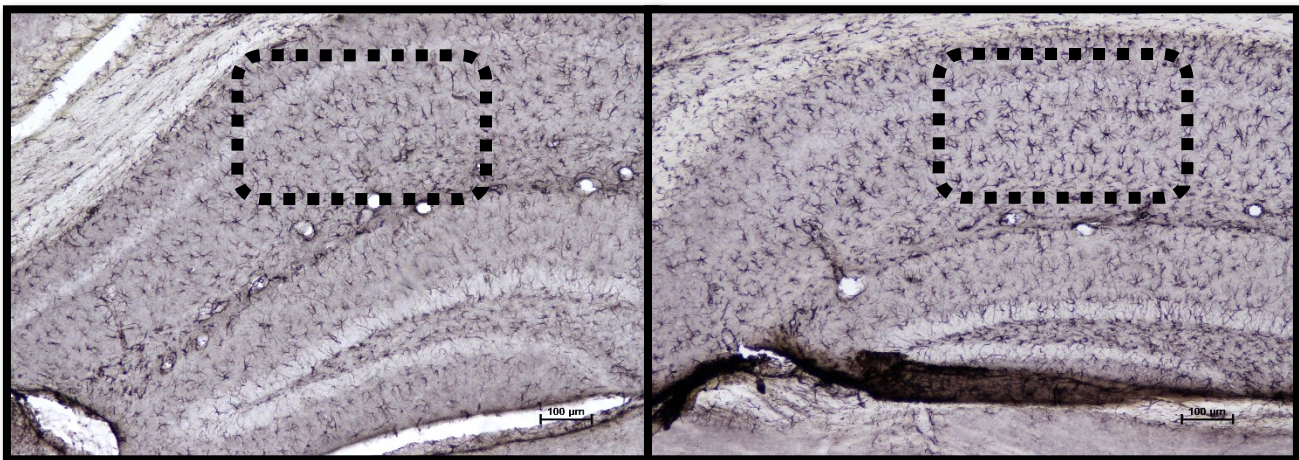


Figura 8. Fotomicrografías representativas del estrato radial del CA1 del hipocampo a 10x de un ratón 3xTg-AD con antibiótico.

El análisis morfométrico del esqueleto de la astroglia se realizó en cuatro fotomicrografías de cada individuo ($n=4$) en los cuatro grupos y fue llevado a cabo con el software *Fiji ImageJ*®, desarrollado por el NIH (National Institute of Health). Fueron varios los comandos a seguir para analizar las imágenes binarias de las fotomicrografías de las inmunohistoquímicas enzimáticas de los astrocitos a 40x. Se analizaron al menos 60 células por individuo y un total de 1590. La imagen para analizar se abre con el software *Fiji ImageJ*®, se transforma en formato 8-bit y se seleccionó el comando para enfocar la imagen. Se ajustó el umbral en función al contraste ya que algunas inmunohistoquímicas presentaron mayor precipitado en el fondo. Se convirtieron las imágenes en formato binario representado con el fondo blanco y la señal en negro y se seleccionó el comando de “*analizar partículas*” para descartar señales de ruido de la imagen.

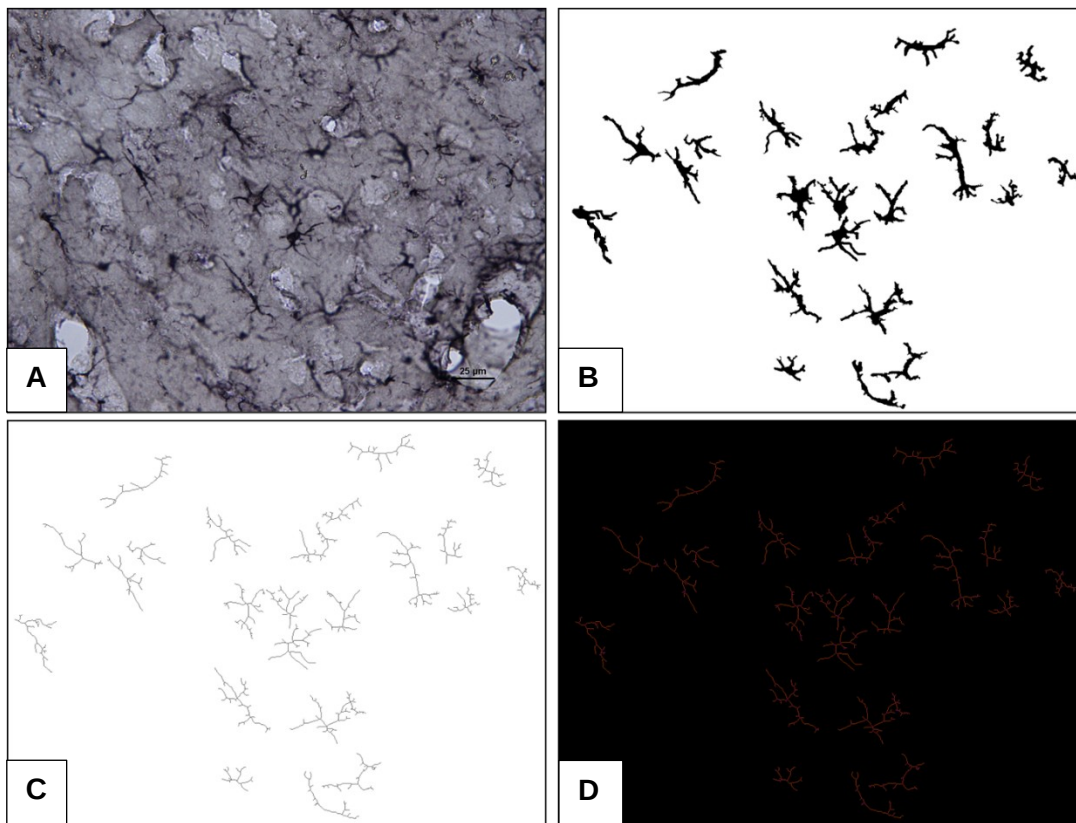


Figura 9. Imágenes que representan el análisis morfológico de los astrocitos hipocámpales por el método de esqueleto utilizando el software *Fiji ImageJ*®. El panel A es la fotomicrografía 40x sin analizar. El panel B es la imagen transformada en formato binario con la función de “analizar partículas” para dejarla limpia. El panel C es la imagen binaria transformada con la herramienta *skeletonize* y el panel D muestra la figura que se analiza utilizando el *plug-in: skeleton 2D/3D*.

Como criterios de inclusión se consideraron las células que: tuvieran un soma definido, que no tocaran los bordes, que tuvieran un dominio de espacio, y que fueran mayores a 700 píxeles (~140 µm de área).

Una vez aplicados dichos criterios, se procesó la imagen con la herramienta “*skeletonize*” y luego se invirtió. Posteriormente se seleccionó el plug-in: *skeleton 2D/3D* para procesar dicha imagen y así obtener la estructura del esqueleto de la célula.

6.1.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico para los datos correspondientes al peso de los animales y la parte del entrenamiento del laberinto acuático de Morris fue ANOVA de dos vías de medidas repetidas. Para la parte de la retención del laberinto acuático de Morris se utilizó ANOVA de dos vías. En cuanto al análisis morfométrico de los astrocitos (número, prolongaciones e intersecciones) se utilizó la prueba *t student* no pareada. Por último, la prueba posthoc de comparaciones múltiples fue la prueba posthoc de Bonferroni. Para la significancia estadística se consideró un p valor < 0.05 y las barras graficadas fueron expresadas en error estándar.

Todos los datos del análisis estadístico fueron desarrollados por el software *GraphPad Prism* versión 7.00.

7. Resultados

7.1 Consumo de agua

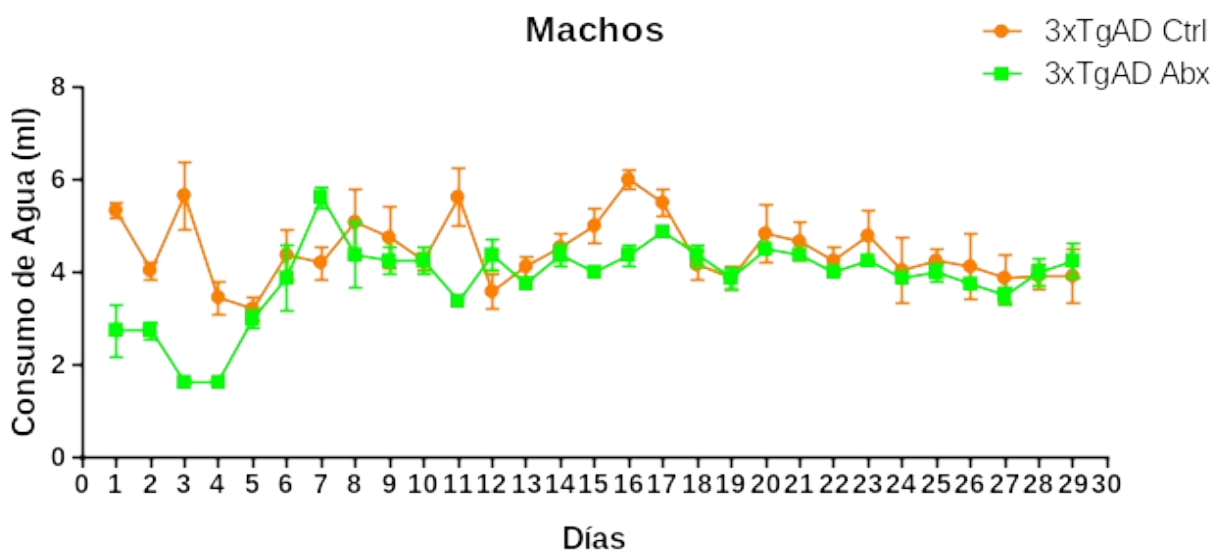
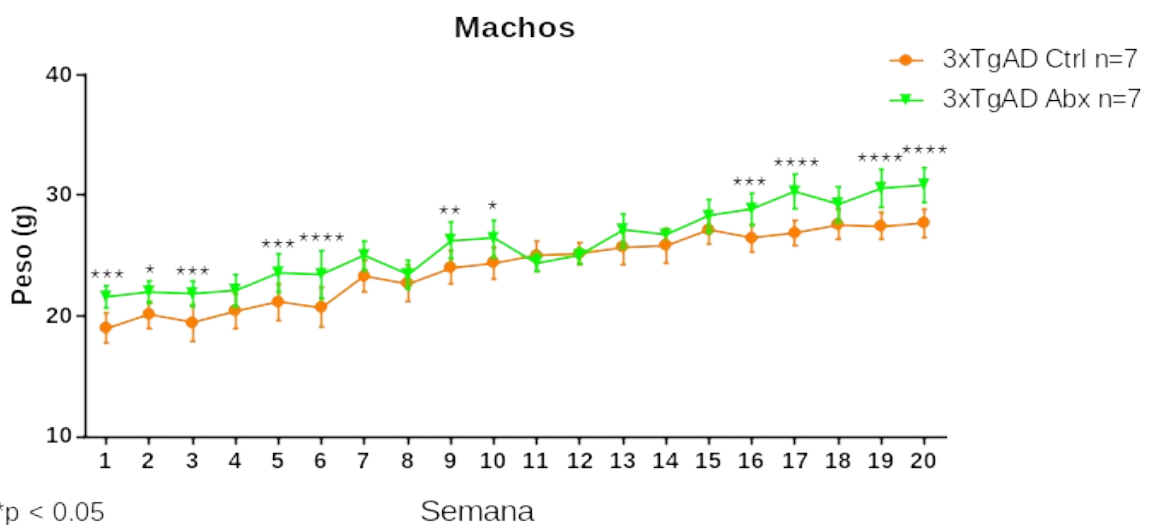


Figura 10. Consumo diario de agua en mililitros (ml) de los grupos de ratones. Grupo 3xTgAD Ctrl o grupo control de transgénicos y el grupo 3xTgAD Abx tratado con antibiótico.

Se puede observar en la gráfica una tendencia por el rechazo (neofobia) del coctel de antibiótico en los primeros 5 días, pasando esos días se observa que se restablece el consumo de agua con antibiótico, sin embargo, se puede asumir de manera cualitativa que el consumo de agua del grupo control con respecto al grupo experimental tiende a ser superior.

7.2 Peso corporal

Sólo fueron estadísticamente significativos el factor tiempo ($F(19,114) = 55.35$ $p < 0.0001$) y en la interacción tratamiento x genotipo ($F(19,114) = 3.54$; $p < 0.0001$). La prueba *post hoc* Bonferroni muestra que el peso en el grupo 3xTgAD Ctrl con respecto al grupo 3xTgAD Abx difiere en semana 1 ($p = 0.0002$), en la semana 2 ($p = 0.0250$), semana 3, 6, 16 ($p = 0.0007$), en la semana 7, 17, 19 y 20 ($p < 0.0001$), en la semana 9 ($p = 0.0017$) y en la semana 10 ($p = 0.0107$). Ambos grupos de manera individual incrementaron de peso significativamente de la semana 1 a la 20 ($p < 0.0001$).



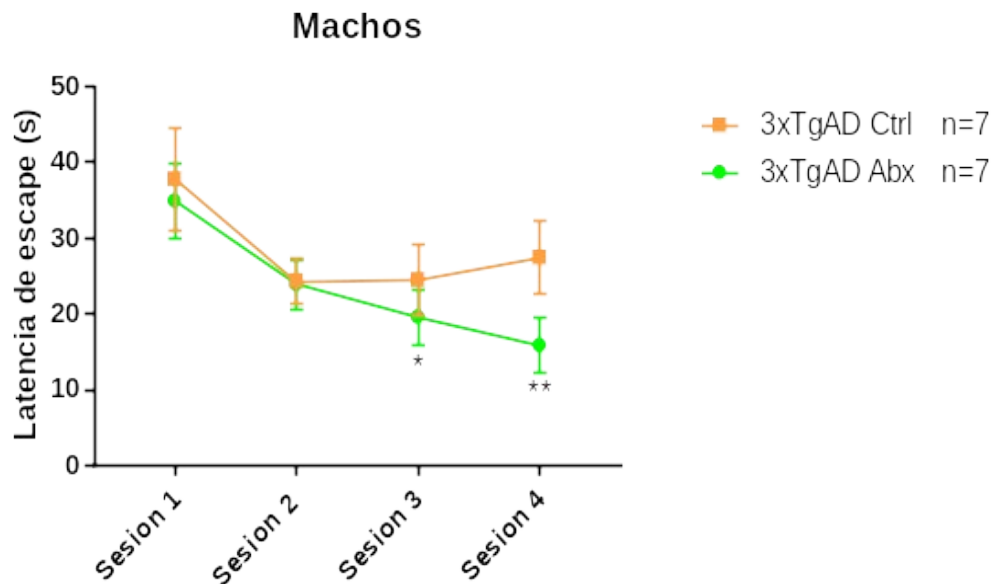
* $p < 0.05$
** $p < 0.01$
*** $p < 0.001$
**** $p < 0.0001$

Figura 11. Peso corporal de ratones macho de las primeras 20 semanas de los grupos: 3xTgAD Ctrl (n=7) o grupo de ratones transgénicos controles y el grupo 3xTgAD Abx o ratones transgénicos con antibióticos (n=7). Se analizaron los datos con el método de ANOVA de dos vías de medidas repetidas y el análisis *post hoc* Bonferroni (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$).

En cuanto al peso, el rango de peso de ambos grupos experimentales se mantiene, esto es evidencia de que siguen comiendo de manera habitual, y a su vez, según los datos analizados, subieron de peso desde la semana 1 a la 20, de modo que el tratamiento con antibiótico no interfirió con su condición corporal.

7.3 Laberinto acuático de Morris

Para el análisis estadístico de los datos correspondientes al laberinto acuático de Morris de los machos en cuanto al aprendizaje, se utilizó la prueba de ANOVA de 2 vías de medidas repetidas donde sólo fueron estadísticamente significativos el factor tiempo ($F(3,36) = 6.815$ ** $p < 0.001$) y los sujetos pareados ($F(12,36) = 1.332$ * $p < 0.05$). La prueba *post hoc* Bonferroni muestra que el grupo 3xTgAD Abx difiere de la sesión 1 y la sesión 3 ($p=0.0402$) y de la sesión 1 y la 4 ($p = 0.0060$). El grupo 3xTgAD Ctrl no mostró diferencias entre ninguna sesión.



* $p < 0.05$
 ** $p < 0.01$

Figura 12. Resultados representativos del Laberinto Acuático de Morris de los grupos: Grupo 3xTg-AD Ctrl o grupo control de ratones transgénicos (n=7), grupo 3xTgAD o grupo de ratones transgénicos tratados con antibióticos (n=7). Los datos expresados fueron analizados por el método de ANOVA de dos vías de medidas repetidas, la prueba *post hoc* Bonferroni ($*p < 0.05$ y $**p < 0.01$) y error estándar.

El análisis estadístico arrojó que el grupo tratado con antibiótico mostró diferencias significativas con respecto a las sesiones 1 a la 3 y 4 y se observa una curva de aprendizaje. El grupo control no se observa ninguna curva de aprendizaje en el entrenamiento. Sin embargo, el método de ANOVA de dos vías de medidas repetidas, el factor tiempo fue significativo no siendo así en el factor tratamiento. Por lo tanto, no puede aseverarse de manera estricta que el antibiótico mejoró la memoria de los ratones del grupo tratado.

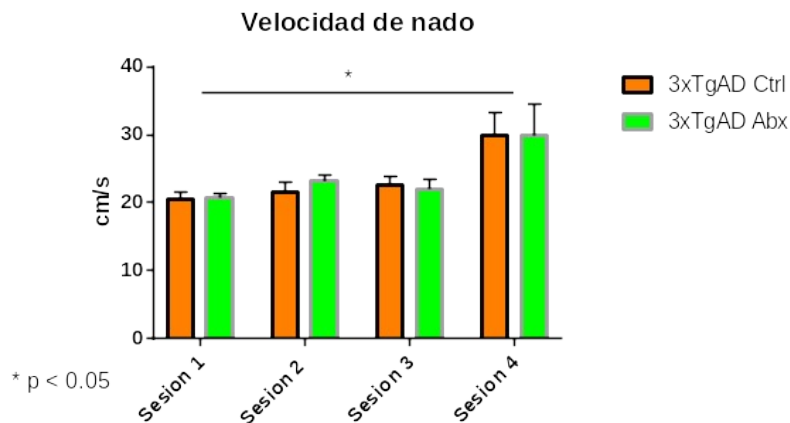


Figura 13. Gráfica que representa la velocidad de nado de los grupos experimentales desde la sesión 1 a la 4 de ambos grupos experimentales. El método de ANOVA de dos vías de medidas repetidas y la prueba *post hoc* fue Bonferroni y las barras fueron expresadas con error estándar.

El análisis estadístico de la velocidad de nado por el método de ANOVA de dos vías de medidas repetidas arrojó que sólo fue estadísticamente significativo el factor

Tiempo ($F(3, 36) = 7.66$, $***p = 0.0004$). El análisis *post hoc* de Bonferroni mostró diferencias entre la sesión 1 y la sesión 4 de ambos grupos ($*p < 0.05$) pero sin diferencias entre ambos grupos. La velocidad de nado se ha reportado

anteriormente en este modelo transgénico a los 6 meses y sin existir variaciones significativamente estadísticas (Belfiore et al., 2019).

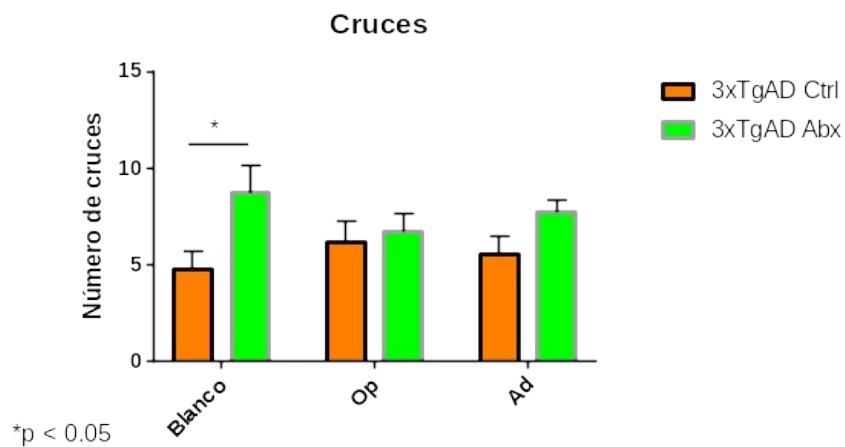


Figura 14. Gráficas representativas del Laberinto Acuático de Morris (retención) del número de cruces en diferentes zonas: cuadrante opuesto (op), cuadrantes adyacentes (ad) y cuadrante donde estaba la plataforma (blanco) de los grupos 3xTg-AD Ctrl o grupo control de ratones transgénicos (n=7) y grupo 3xTg-AD o grupo de ratones transgénicos tratados con antibióticos (n=7). Los datos expresados fueron analizados por el método de ANOVA, la prueba *post hoc* Bonferroni ($*p < 0.05$) y error estándar.

Los resultados analizados demuestran que entre ambos grupos sólo fue estadísticamente significativo el número de veces que los ratones entraron a la zona o cuadrante donde estaba la plataforma ($*p = 0.0418$).

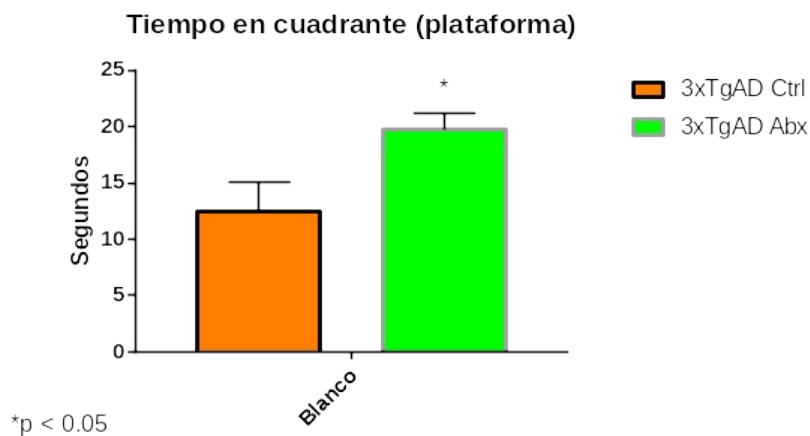


Figura 15. Gráficas representativas de la evaluación de la retención en el laberinto acuático de Morris del tiempo en el cuadrante donde estaba la plataforma (Blanco) de los grupos 3xTg-AD Ctrl o grupo control de ratones transgénicos (n=7) y grupo 3xTg-AD o grupo de ratones transgénicos tratados con antibióticos (n=7). Los datos expresados fueron analizados por el método *t student* no pareada $p=0.033$, las barras son expresadas en error estándar.

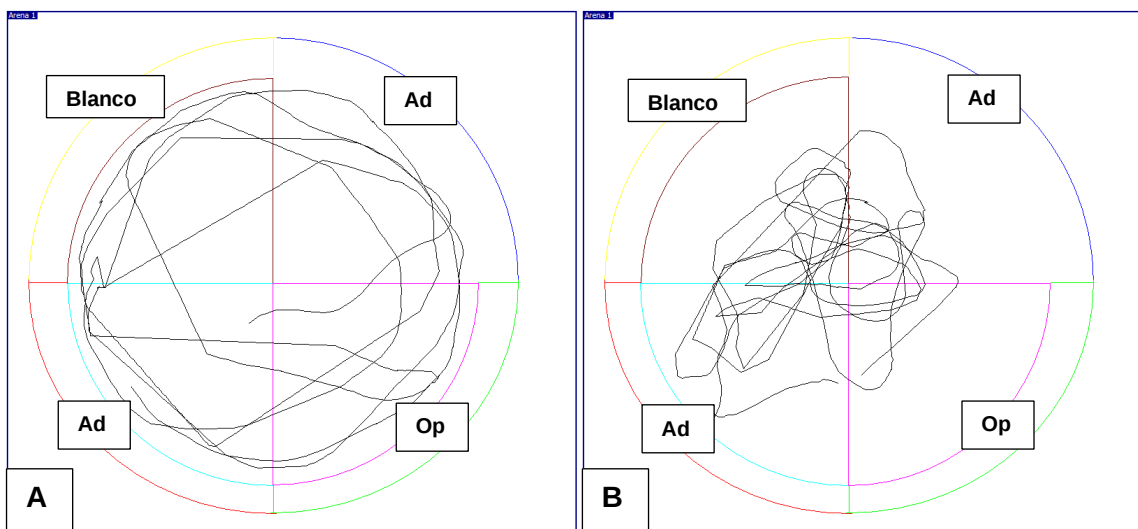


Figura 16. Imágenes de las trayectorias dibujadas por el software SMART© V3.0.05 de ambos grupos experimentales. **A.** Ratón 3xTg-AD del grupo control. **B.** Ratón 3xTg-AD del grupo tratado con antibióticos. El panel A muestra una trayectoria en círculos con una distribución similar entre los cuatro cuadrantes, mientras que, en el panel B la trayectoria está más distribuida en el cuadrante donde estaba la plataforma. Blanco (plataforma), Ad (cuadrantes adyacentes) y Op (cuadrante opuesto).

En el número de cruces, el grupo de ratones 3xTg-AD mostró una diferencia estadística con respecto al grupo control, es decir, cruzaron más veces donde estaba la plataforma. Sin embargo, el análisis estadístico ANOVA de dos vías, no arrojó diferencias significativas en el tiempo que pasaron en el cuadrante de la plataforma. Estos resultados no indican que la memoria del grupo tratado es mejor que la del grupo control, sólo que exploraron con mayor tiempo el cuadrante donde estaba la plataforma.

7.4 Análisis morfométrico de astrocitos por el método de esqueleto

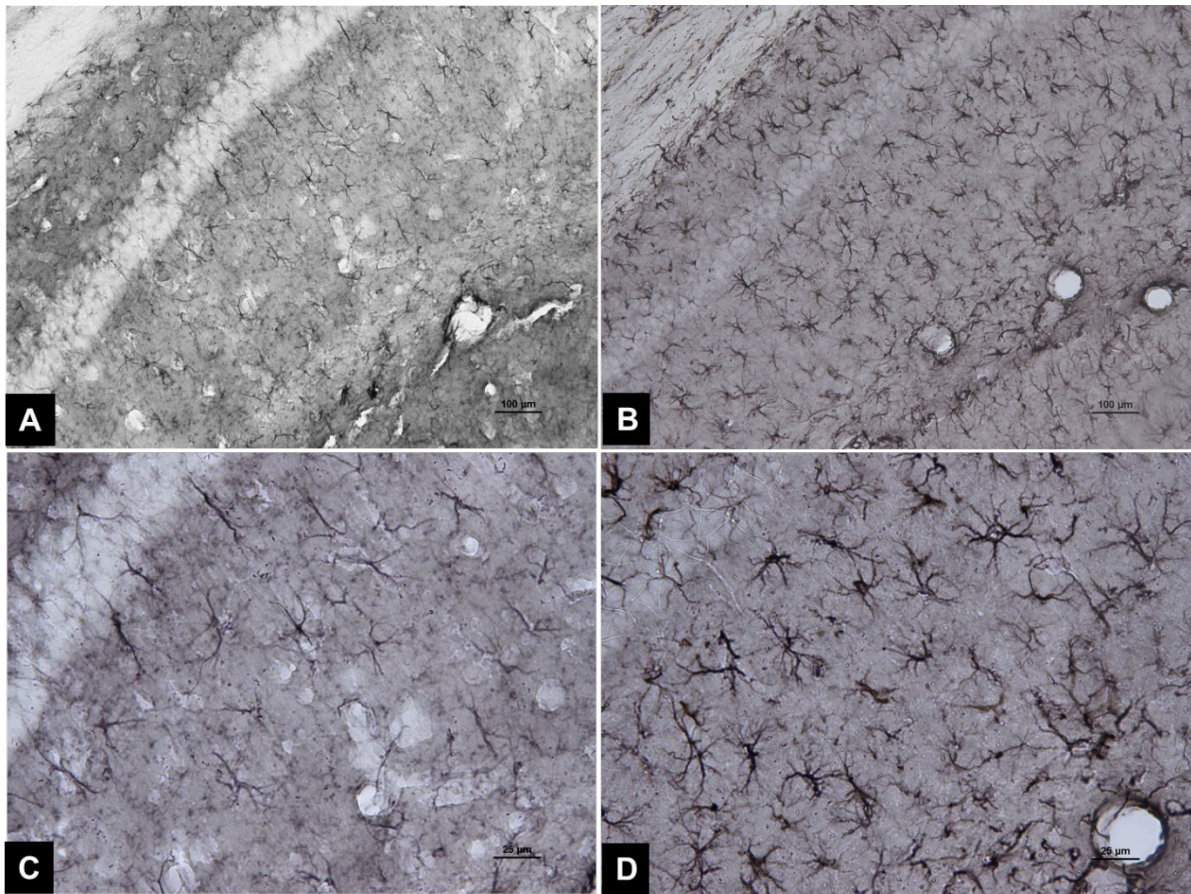


Figura 17. Fotomicrografías de 20x y 60x de inmunohistoquímica enzimática GFAP del hipocampo (estrato radial CA1) de los grupos experimentales (machos) de 6 meses de edad. En los paneles A y B (20x) se observa una población de astrocitos menor con respecto al grupo tratado con antibiótico B y D (60x).

El tratamiento crónico de antibiótico muestra una astrogliosis en el CA1 del hipocampo en el grupo 3xTg-AD. El método de *t student* no pareado muestra un aumento significativamente estadístico en el grupo tratado con antibiótico (** $p=0.0042$).

A pesar de que la astrogliosis es un proceso fisiopatológico que se expresa después de un daño o lesión en el SNC, no necesariamente es un evento

totalmente negativo, puede ser tanto benéfica como perjudicial (Kanemaru et al., 2013), ya que es una respuesta fisiológica del organismo para aminorar un insulto, en este caso, el coctel de antibióticos.

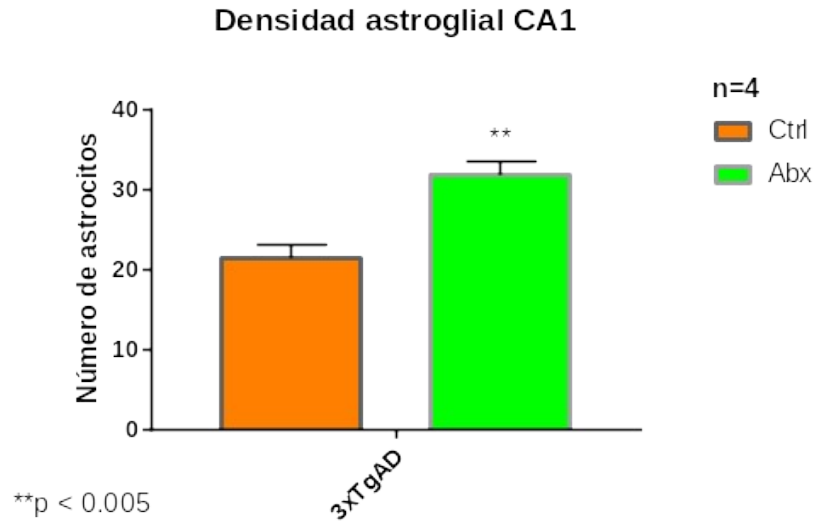


Figura 18. Gráfica de los resultados obtenidos a partir del análisis morfométrico por el método de esqueleto de los astrocitos en la zona *stratum radiatum*, CA1 del hipocampo de ratones macho en los dos grupos experimentales. Análisis cuantitativo de la densidad astrogial en CA1 de los 2 grupos experimentales por el método de *t student* no pareada, n=4, (**p = 0.0042), las barras se expresaron en error estándar.

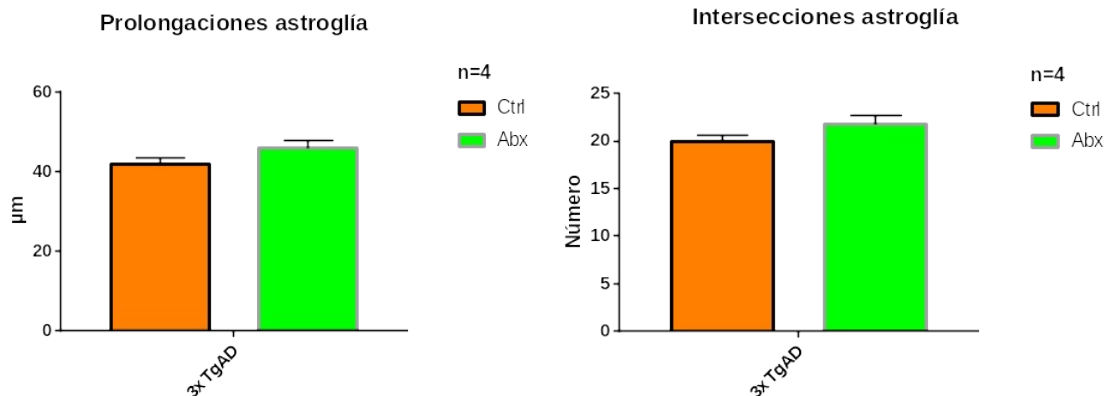


Figura 19. Gráfica de los resultados obtenidos a partir del análisis morfométrico por el método de esqueleto de los astrocitos en la zona *stratum radiatum*, CA1 del hipocampo de ratones macho en los cuatro grupos experimentales. Análisis cuantitativo de las prolongaciones astrogiales de CA1

de los 2 grupos experimentales por el método de *t student* no pareada, $n=4$. Las barras se expresan en error estándar.

El tratamiento crónico de antibióticos en ratones 3xTg-AD no mostró un aumento en la longitud de las prolongaciones astrocíticas con respecto al grupo control ni en las intersecciones (figura 18).

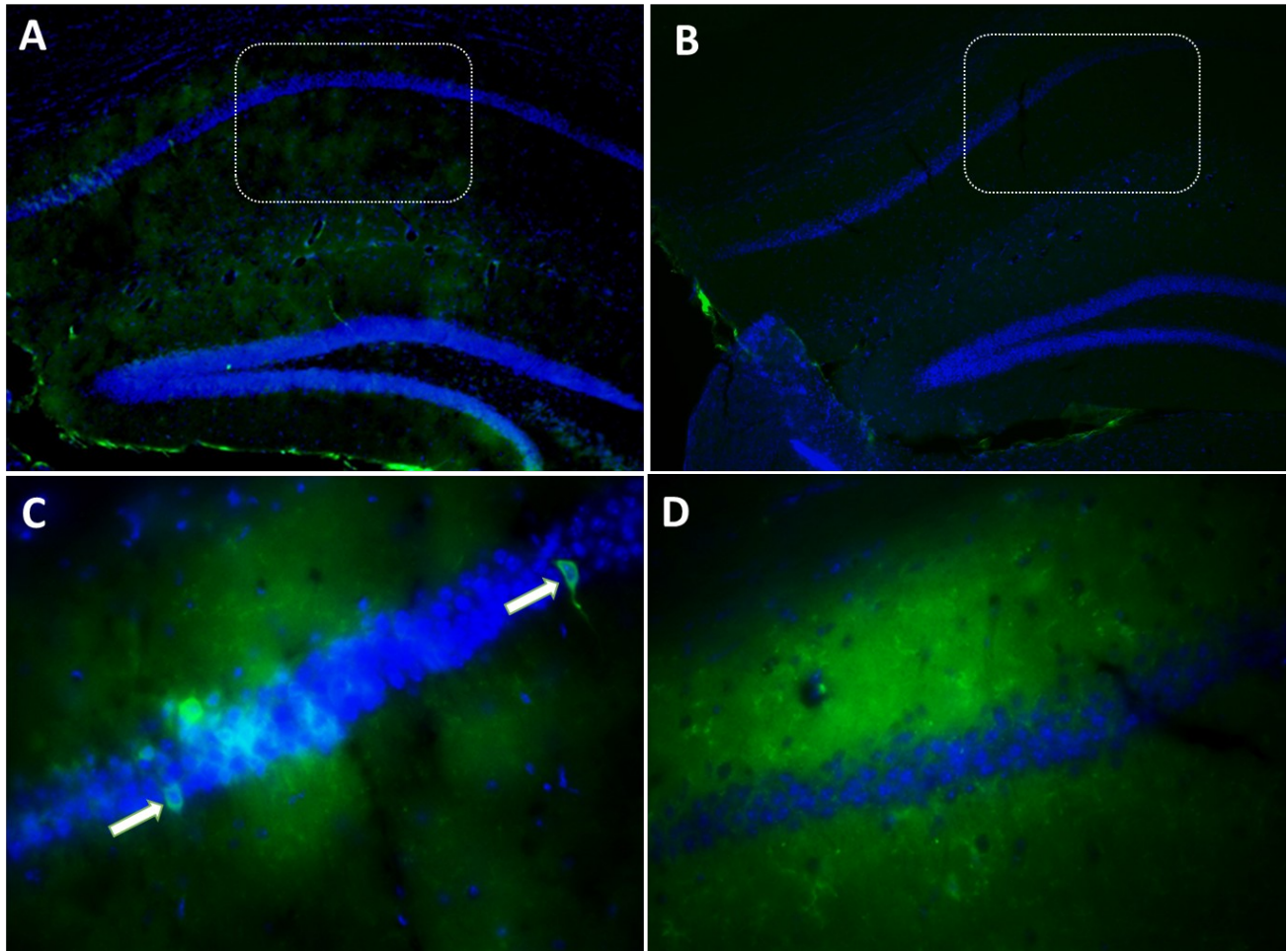


Figura 20. Inmunodetección fluorescente de βA y núcleos (tinción con DAPI) a 10x y 40x del CA1 del hipocampo. En el panel C (10x) se muestra una fotomicrografía en la zona CA1 del hipocampo de un ratón 3xTg-AD control de 6 meses de edad, las flechas indican neuronas con oligómeros de βA intracelulares. En el panel D (20x) se muestra la zona CA1 del hipocampo de un ratón 3xTg-AD con tratamiento de antibióticos, sin embargo, no se encuentran oligómeros visibles como en el control.

En la figura 19, se puede apreciar que el ratón 3xTg-AD control tiene oligómeros intracelulares en las neuronas del estrato hipocampal del CA1 en alguna de las

neuronas. No obstante, en el ratón 3xTg-AD que consumió antibióticos no se visualizan los oligómeros intracelulares de β A.

8. Discusión

En el presente estudio se muestra que un consumo crónico de un coctel de antibióticos provocó un cambio conductual. Además, promovió por algún mecanismo una astrogliosis en el *stratum radiatum* del CA1 hipocampal en ratones 3xTg-AD.

Los resultados previos del consumo de agua y antibiótico muestran que existe una neofobia derivada del sabor amargo del antibiótico.

También se encontró un aumento de peso entre el grupo que consumió antibiótico contra el control. Un efecto contrario fue reportado por Reikvam et al., (2011) con una pérdida de peso a los 4-5 días a partir del consumo de antibiótico. Este evento puede ser derivado de una deshidratación causada en un principio por el sabor amargo del antibiótico; sin embargo, el peso del grupo tratado con antibióticos incrementó significativamente con respecto al control. Cho et al., (2012) discuten la posibilidad de que el microbioma afecte las células pluripotenciales que dan origen a los adipocitos, a su vez, también postulan que al modificarse la MBI con antibióticos, la actividad metabólica basal disminuye. Éstas son razones que pueden explicar el incremento de peso.

Por otro lado, la estadística realizada a partir de los datos de la tarea conductual laberinto acuático de Morris, en la parte del entrenamiento puede observarse que la latencia de escape es estadísticamente significativa en el grupo de ratones transgénicos tratados con antibióticos. A pesar de que hay una curva de aprendizaje, los datos analizados por el método de ANOVA de medidas repetidas arrojaron diferencias significativas únicamente en el factor tiempo, pero no en el factor tratamiento.

Otro grupo de investigación, demostró que la administración de rapamicina encapsulada en el alimento y administrada durante 3 meses en ratones 3xTg-AD de 15 meses de edad no mejoró su déficit cognitivo en el laberinto acuático de

Morris; sin embargo, logró mejorar su déficit cognitivo sólo cuando se administró a partir de los 2 meses (Majumder et al., 2011).

Fröhlich et al., (2016) reportaron que no encontraron ningún efecto en la prueba de memoria espacial laberinto de Barnes, pero sí un déficit cognitivo en las pruebas de reconocimiento de objeto en ratones macho C57BL/6n tratados con un coctel de antibióticos. En la prueba del laberinto de Barnes se ha reportado un déficit cognitivo en ratones 3xTg-AD a los 4 meses de edad (Attar et al., 2013).

A su vez, se ha demostrado que un tratamiento de antibióticos en ratones machos BALB/C durante 7 días incrementó la cantidad de BDNF en el hipocampo y también aumentó su conducta exploratoria (Bercik et al., 2011). El resultado de la conducta exploratoria coincide con los datos mostrados en el presente trabajo, ya que los ratones 3xTg-AD tratados con antibióticos exploraron más tiempo con respecto al control.

Con referencia a los astrocitos, éstos muestran un dominio de espacio, de manera que estos no se superponen justo como se observa en la figura 8. Algunos autores también reportan que las prolongaciones de astrocitos protoplasmáticos marcados con GFAP ocupan dominios definidos (Nag, 2011), en particular, en la zona del estrato radial del CA1 del hipocampo (Bushong et al., 2002).

Otros autores analizaron la morfología de astrocitos retinales marcados con GFAP de ratones *knockout* para distrofina 71, y utilizaron el análisis de esqueleto. Para el presente estudio, también se utilizó el *plug-in skeleton* y así analizar las intersecciones y prolongaciones de astrocitos (Giocanti-Auregan et al., 2016).

Como se sabe, la barrera epitelial del intestino juega un papel fundamental en condiciones homeostáticas, y la permeabilidad intestinal puede ser influenciada por mediadores inflamatorios y por la actividad del sistema nervioso simpático (Osadchiy et al., 2019). A su vez, la dieta, los probióticos, los prebióticos y los antibióticos pueden llegar a modificar el microbioma de manera sustancial (Osadchiy et al., 2019).

En este trabajo de investigación se llevó a cabo un tratamiento crónico de un coctel de antibióticos (disueltos en agua, durante 5 meses), el cual tuvo un

impacto en la cantidad de astrocitos y en una tarea conductual de tipo espacial en ratones transgénicos macho como lo muestran los resultados.

Sin embargo, varios autores señalan que un consumo menos prolongado de antibióticos es suficiente para inducir diferentes cambios. Rodrigues et al., (2017) reportan un consumo de 4 semanas de un coctel de antibióticos disueltos en agua (agua esterilizada con autoclave⁴) en ratones macho, el cual ocasionó un cambio en el metabolismo de la glucosa. Cho et al., (2012) administraron un coctel de antibióticos durante 7 semanas vía oral, y con esto alteraron el microbioma del colon y a su vez el tejido adiposo. Fröhlich et al., (2016), administraron durante 11 días un coctel de antibióticos en ratones macho C57BL6 y observaron cambios en la proteína BDNF, en los ácidos grasos de cadena corta y además un déficit cognitivo en tareas de memoria de trabajo. Reikvam et al., (2011) crearon un protocolo en el cual, suplementaron anfotericina para evitar la proliferación de hongos y posteriormente añadieron los antibióticos durante 3 días en ratones macho y evaluaron cómo se modificó la expresión de diversos genes.

Además, otros autores afirman que tras 3 días de administración de un coctel de antibióticos es suficiente para alterar la composición del microbioma (Cabral et al., 2019; Choo et al., 2017).

Por otro lado, hay algunos estudios que se centran en la morfología astrocítica del modelo 3xTg-AD (Giocanti-Auregan et al., 2016; Hartlage-Rübsamen et al., 2003; Olabarria et al., 2010; Verkhratsky et al., 2019). Como se ha mencionado, los astrocitos cambian su morfología cuando están reactivos y existen muchos marcadores de filamentos intermedios para poder visualizarlos (Carter et al., 2019).

En el presente estudio, se demostró una astrogliosis en la zona *stratum radiatum* del CA1 del hipocampo en ratones 3xTg-AD causada por el tratamiento crónico de antibióticos en el grupo tratado con respecto al grupo control basado en el protocolo establecido para observar la morfología (Young & Morrison, 2018). No obstante, no se mostraron cambios significativos en las prolongaciones ni intersecciones morfología por este método.

⁴ La autoclave es un recipiente metálico con paredes gruesas y cierre hermético utilizado para la esterilización de material con temperaturas superiores a 100 °C.

De acuerdo con la literatura; las alteraciones morfológicas en la astrogliá que residen en un cambio importante se deben en su mayoría a insultos de mayor severidad (isquemia, infartos, neuroinflamación, altos niveles de LPS, etc.) y a su vez, la histopatología de la EA también puede causar cambios morfológicos en la astrogliá (Verkhatsky & Nedergaard, 2018), por ej. la presencia extracelular de péptidos β A (Hartlage-Rübsamen et al., 2003). Sin embargo, en el modelo 3xTg-AD, a la edad de 6 meses, ha sido documentado que la síntesis de péptidos β A se mantiene endógena (Walsh et al., 2000). En adición, una técnica complementaria, como la citometría de flujo, podría confirmar si se trata de un reclutamiento de células en esta región o si la astrogliosis se debe a una proliferación como ocurre en la mayoría de los casos.

Se ha demostrado que las alteraciones en la MBI están asociadas con procesos neurodegenerativos (Giau et al., 2018; Hsiao et al., 2013; Luczynski, Whelan, et al., 2016; Sekirov et al., 2010). En el modelo 3xTg-AD se ha analizado la microbiota a los 5 meses muestra una abundancia relativa en la familias *Fusobacteria* y *Cyanobacteria* (Bello-Medina et al., 2021).

Así, el uso de antibióticos modifica la MBI y tiene como consecuencia alteraciones en los perfiles conductual (Fröhlich et al., 2016), metabólico (Reikvam et al., 2011), fisiológico (Cho et al., 2012) y social (Desbonnet et al., 2014)

Solo en el presente estudio se demostró que hubo un aumento en la población astrogliá en el *stratum radiatum* del CA1 del hipocampo en 3xTg-AD.

Con respecto a la acumulación del péptido β A y su disminución frente al consumo de antibiótico, una posible explicación a este evento puede ser que uno de los roles del NF- κ B (factor transcripcional que activa genes que expresan citocinas proinflamatorias) es la regulación de BACE1, en específico, actúa como represor transcripcional de BACE1, en cultivos neuronales y gliales; sin embargo, en astrocitos reactivos y neuronas expuestas al péptido β A, es un activador de la transcripción (Bourne et al., 2007). Es decir, de alguna manera disminuyendo la cantidad de algunas familias de bacterias como consecuencia se puede aminorar la neuroinflamación.

Es importante mencionar que es necesario realizar el análisis de abundancia y diversidad bacteriana por secuenciación masiva de las heces de estos mismos animales, 3xTg-AD; que fueron utilizados en la prueba de memoria espacial y en donde se hizo el análisis de la morfología de los astrocitos, para hacer una relación, al menos en esta etapa del desarrollo de la patología.

9. Conclusiones

En el presente trabajo se concluye que un consumo crónico de un coctel de antibióticos en el modelo murino 3xTg-AD:

- Produjo un aumento de peso, probablemente derivado de una modificación en el metabolismo basal de los adipocitos.
- Que es probable que la astrogliosis causada por el consumo de antibióticos en este modelo esté relacionada con los cambios conductuales en la memoria espacial, sin embargo, hacen falta más estudios para corroborarlo.
- Que la proliferación de astrocitos, al ser un evento neurofisiológico en respuesta para aminorar algún insulto puede ser un fenómeno que contribuya en contrarrestar el daño en fases tempranas de la histopatología de la EA. Sin embargo, el consumo crónico de antibióticos no tiene efecto sobre cambios morfológicos en estas células.
- Que puede tener un efecto asociado a los diversos filos de bacterias residentes del tracto gastrointestinal, conclusión fundada solamente en los resultados conductuales y de la morfología astrogliar realizados.

10. Perspectivas

El estudio del microbioma que va desde vertebrados hasta invertebrados ha sido un campo en creciente investigación debido a la riqueza misma de sus resultados. En particular, el vínculo que tiene el microbioma con muchos padecimientos como la diabetes, la obesidad, la fenilcetonuria, la EP e incluso el autismo ha dado pie a considerar a los microorganismos como probable etiología.

La modificación de la MBI la puede afectar factores externos (dieta, antibióticos, probióticos y prebióticos) hasta el mismo estado interno del organismo (SNE, estrés y la edad).

A su vez, el uso de animales libres de gérmenes ha brindado una perspectiva nueva con respecto a las bacterias y su relación con la fisiología del organismo. Y nuevas técnicas desarrolladas como el trasplante de la microbiota de un paciente sano a un enfermo, el consumo otro tipo de microbiota o el uso de probióticos para nuevas enfermedades.

El presente estudio se puede someter a nuevas técnicas y métodos para incrementar el número de resultados. El análisis de diversas rutas metabólicas (ácidos grasos de cadena corta), nuevas tareas conductuales (reconocimiento de objetos, laberinto de Barnes, laberinto en *T* y en *Y*, etc.), pruebas motoras (test del *rotarod*⁵), procedimientos quirúrgicos (vagotomías, enterotomías), un perfil de citocinas proinflamatorias, el estudio de los órganos de los sentidos o bien, un metaanálisis del genoma de los hongos.

Para un mayor estudio del análisis morfométrico de astrocitos se requieren otras técnicas como la citometría de flujo, marcadores de filamentos intermedios,

⁵ Es una prueba estandarizada de coordinación motora, fatiga y balance en ratones. Básicamente, los ratones se colocan en un tubo que gira a diferentes velocidades o bajo aceleración continua y se registra el tiempo de latencia para caer desde el tubo giratorio.

marcadores de proliferación celular o incluso un perfil de citocinas proinflamatorias en el SNC.

11. Bibliografía

- 2016 Alzheimer's disease facts and figures. (2016). *Alzheimer's & Dementia*, 12(4), 459-509. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.03.001>
- Adamsky, A., & Goshen, I. (2018). Astrocytes in Memory Function: Pioneering Findings and Future Directions. *Neuroscience*, 370, 14-26. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.033>
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Cooper, N. R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. L., Finch, C. E., Frautschy, S., Griffin, W. S. T., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I. R., ... Wyss-Coray, T. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 21(3), 383-421. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(00\)00124-X](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(00)00124-X)
- Alzheimer's Association Calcium Hypothesis Workgroup. (2017). Calcium Hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging: A framework for integrating new evidence into a comprehensive theory of pathogenesis. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 13(2), 178-182.e17. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.12.006>
- Aminov, R. I. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology*, 11(12), 2970-2988. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01972.x>

- Angelucci, F., Cechova, K., Amlerova, J., & Hort, J. (2019). Antibiotics, gut microbiota, and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, *16*.
<https://doi.org/10.1186/s12974-019-1494-4>
- Attar, A., Liu, T., Chan, W.-T. C., Hayes, J., Nejad, M., Lei, K., & Bitan, G. (2013). A Shortened Barnes Maze Protocol Reveals Memory Deficits at 4-Months of Age in the Triple-Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, *8*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080355>
- Bannerman, D. M., Sprengel, R., Sanderson, D. J., McHugh, S. B., Rawlins, J. N. P., Monyer, H., & Seeburg, P. H. (2014). Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(3), 181-192. <https://doi.org/10.1038/nrn3677>
- Bartsch, T., & Wulff, P. (2015). The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience*, *309*, 1-16.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.084>
- Battaglia, F. P., Benchenane, K., Sirota, A., Pennartz, C. M. A., & Wiener, S. I. (2011). The hippocampus: Hub of brain network communication for memory. *Trends in Cognitive Sciences*, *15*(7), 310-318.
<https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.05.008>
- Belfiore, R., Rodin, A., Ferreira, E., Velazquez, R., Branca, C., Caccamo, A., & Oddo, S. (2019). Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging Cell*, *18*(1).
<https://doi.org/10.1111/acel.12873>
- Bello-Medina, P. C., Hernández-Quiroz, F., Pérez-Morales, M., González-Franco, D. A., Cruz-Pauseno, G., García-Mena, J., Díaz-Cintra, S., & Pacheco-López, G. (2021). Spatial Memory and Gut Microbiota Alterations Are

Already Present in Early Adulthood in a Pre-clinical Transgenic Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 15.

<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.595583>

- Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., Deng, Y., Blennerhassett, P., Macri, J., McCoy, K. D., Verdu, E. F., & Collins, S. M. (2011). The Intestinal Microbiota Affect Central Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Behavior in Mice. *Gastroenterology*, 141(2), 599-609.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.052>
- Bickeböllner, H., Campion, D., Brice, A., Amouyel, P., Hannequin, D., Didierjean, O., Penet, C., Martin, C., Pérez-Tur, J., Michon, A., Dubois, B., Ledoze, F., Thomas-Anterion, C., Pasquier, F., Puel, M., Demonet, J. F., Moreaud, O., Babron, M. C., Meulien, D., ... Clerget-Darpoux, F. (1997). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: Genotype-specific risks by age and sex. *American Journal of Human Genetics*, 60(2), 439-446.
- Billings, L. M., Oddo, S., Green, K. N., McGaugh, J. L., & LaFerla, F. M. (2005). Intraneuronal A β Causes the Onset of Early Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits in Transgenic Mice. *Neuron*, 45(5), 675-688. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.040>
- Blasko, I., Stampfer-Kountchev, M., Robatscher, P., Veerhuis, R., Eikelenboom, P., & Grubeck-Loebenstien, B. (2004). How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: The role of microglia and astrocytes. *Aging Cell*, 3(4), 169-176. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00101.x>
- Bourne, K. Z., Ferrari, D. C., Lange-Dohna, C., Roßner, S., Wood, T. G., & Perez-Polo, J. R. (2007). Differential regulation of BACE1 promoter activity by

nuclear factor- κ B in neurons and glia upon exposure to β -amyloid peptides. *Journal of Neuroscience Research*, 85(6), 1194-1204.
<https://doi.org/10.1002/jnr.21252>

Broadbent, N. J., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(40), 14515-14520. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406344101>

Brouillette, J., Caillierez, R., Zommer, N., Alves-Pires, C., Benilova, I., Blum, D., De Strooper, B., & Buée, L. (2012). Neurotoxicity and Memory Deficits Induced by Soluble Low-Molecular-Weight Amyloid- β 1-42 Oligomers Are Revealed In Vivo by Using a Novel Animal Model. *The Journal of Neuroscience*, 32(23), 7852-7861.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5901-11.2012>

Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., & Ellisman, M. H. (2002). Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains. *Journal of Neuroscience*, 22(1), 183-192.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-01-00183.2002>

Cabral, D. J., Penumutchu, S., Reinhart, E. M., Zhang, C., Korry, B. J., Wurster, J. I., Nilson, R., Guang, A., Sano, W. H., Rowan-Nash, A. D., Li, H., & Belenky, P. (2019). Microbial Metabolism Modulates Antibiotic Susceptibility within the Murine Gut Microbiome. *Cell Metabolism*, 30(4), 800-823.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.020>

Carter, S. F., Herholz, K., Rosa-Neto, P., Pellerin, L., Nordberg, A., & Zimmer, E. R. (2019). Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Trends in*

Molecular Medicine, 25(2), 77-95.

<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.11.006>

Cho, I., Yamanishi, S., Cox, L., Methé, B. A., Zavadil, J., Li, K., Gao, Z., Mahana, D., Raju, K., Teitler, I., Li, H., Alekseyenko, A. V., & Blaser, M. J. (2012).

Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*, 488(7413), 621-626.

<https://doi.org/10.1038/nature11400>

Choo, J. M., Kanno, T., Zain, N. M. M., Leong, L. E. X., Abell, G. C. J., Keeble, J. E., Bruce, K. D., Mason, A. J., & Rogers, G. B. (2017). Divergent Relationships between Fecal Microbiota and Metabolome following Distinct Antibiotic-Induced Disruptions. *mSphere*, 2(1).

<https://doi.org/10.1128/mSphere.00005-17>

Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R. D., Shanahan, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2013). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Molecular Psychiatry*, 18(6), 666-673.

<https://doi.org/10.1038/mp.2012.77>

Clinton, L. K., Billings, L. M., Green, K. N., Caccamo, A., Ngo, J., Oddo, S., McGaugh, J. L., & LaFerla, F. M. (2007). Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice.

Neurobiology of Disease, 28(1), 76-82.

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.06.013>

Cresci, G. A., & Bawden, E. (2015). The Gut Microbiome: What we do and don't know. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American*

Society for Parenteral and Enteral Nutrition, 30(6), 734-746.

<https://doi.org/10.1177/0884533615609899>

de la Torre, J. (2018). The Vascular Hypothesis of Alzheimer's Disease: A Key to Preclinical Prediction of Dementia Using Neuroimaging. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 63(1), 35-52. <https://doi.org/10.3233/JAD-180004>

Delzenne, N. M., & Cani, P. D. (2011). Interaction Between Obesity and the Gut Microbiota: Relevance in Nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 31(1), 15-31. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-072610-145146>

Desbonnet, L., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbiota is essential for social development in the mouse. *Molecular Psychiatry*, 19(2), 146-148. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.65>

Desbonnet, L., Clarke, G., Traplin, A., O'Sullivan, O., Crispie, F., Moloney, R. D., Cotter, P. D., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain, Behavior, and Immunity*, 48, 165-173. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.004>

Dong, Y., & Benveniste, E. N. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia*, 36(2), 180-190. <https://doi.org/10.1002/glia.1107>

Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, 308(5728), 1635-1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>

Fertan, E., Wong, A. A., Vienneau, N. A., & Brown, R. E. (2019). Age and sex differences in motivation and spatial working memory in 3xTg-AD mice

- in the Hebb–Williams maze. *Behavioural Brain Research*, 370, 111937.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111937>
- Fogwe, L. A., Reddy, V., & Mesfin, F. B. (2020). Neuroanatomy, Hippocampus. En *StatPearls*. StatPearls Publishing.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482171/>
- Foster, J. A., & McVey Neufeld, K.-A. (2013). Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in Neurosciences*, 36(5), 305-312. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.01.005>
- Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., & Wilcock, G. K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 66(2), 137-147.
<https://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.137>
- Fröhlich, E. E., Farzi, A., Mayerhofer, R., Reichmann, F., Jačan, A., Wagner, B., Zinser, E., Bordag, N., Magnes, C., Fröhlich, E., Kashofer, K., Gorkiewicz, G., & Holzer, P. (2016). Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain, Behavior, and Immunity*, 56, 140-155.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.02.020>
- Fung, T. C., Olson, C. A., & Hsiao, E. Y. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nature Neuroscience*, 20(2), 145-155. <https://doi.org/10.1038/nn.4476>
- García-Cáceres, C., Balland, E., Prevot, V., Luquet, S., Woods, S. C., Koch, M., Horvath, T. L., Yi, C.-X., Chowen, J. A., Verkhratsky, A., Araque, A., Bechmann, I., & Tschöp, M. H. (2019). Role of astrocytes, microglia, and

- tanycytes in brain control of systemic metabolism. *Nature Neuroscience*, 22(1), 7-14. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0286-y>
- Geinisman, Y., Ganeshina, O., Yoshida, R., Berry, R. W., Disterhoft, J. F., & Gallagher, M. (2004). Aging, spatial learning, and total synapse number in the rat CA1 stratum radiatum. *Neurobiology of Aging*, 25(3), 407-416. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.12.001>
- Giau, V. V., Wu, S. Y., Jamerlan, A., An, S. S. A., Kim, S., & Hulme, J. (2018). Gut Microbiota and Their Neuroinflammatory Implications in Alzheimer's Disease. *Nutrients*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/nu10111765>
- Gill, S. R., Pop, M., Deboy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M., & Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5778), 1355-1359. <https://doi.org/10.1126/science.1124234>
- Giocanti-Auregan, A., Vacca, O., Bénard, R., Cao, S., Siqueiros, L., Montañez, C., Paques, M., Sahel, J.-A., Sennlaub, F., Guillonneau, X., Rendon, A., & Tadayoni, R. (2016). Altered astrocyte morphology and vascular development in dystrophin-Dp71-null mice. *Glia*, 64(5), 716-729. <https://doi.org/10.1002/glia.22956>
- Gomez-Eguilaz, M., Ramon-Trapero, J. L., Perez-Martinez, L., & Blanco, J. R. (2019). [The microbiota-gut-brain axis and its great projections]. *Revista De Neurologia*, 68(3), 111-117.
- Harach, T., Marungruang, N., Duthilleul, N., Cheatham, V., Mc Coy, K. D., Frisoni, G., Neher, J. J., Fåk, F., Jucker, M., Lasser, T., & Bolmont, T. (2017). Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice

- in the absence of gut microbiota. *Scientific Reports*, 7(1), 1-15.
<https://doi.org/10.1038/srep41802>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5054), 184-185.
<https://doi.org/10.1126/science.1566067>
- Hartlage-Rübsamen, M., Zeitschel, U., Apelt, J., Gärtner, U., Franke, H., Stahl, T., Günther, A., Schliebs, R., Penkowa, M., Bigl, V., & Roßner, S. (2003). Astrocytic expression of the Alzheimer's disease β -secretase (BACE1) is stimulus-dependent. *Glia*, 41(2), 169-179.
<https://doi.org/10.1002/glia.10178>
- Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., & Khoury, J. E. (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nature neuroscience*, 21(10), 1359-1369.
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x>
- Hippius, H., & Neundörfer, G. (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 5(1), 101-108.
- Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., McCue, T., Codelli, J. A., Chow, J., Reisman, S. E., Petrosino, J. F., Patterson, P. H., & Mazmanian, S. K. (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, 155(7), 1451-1463.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.024>
- Hufnagel, D. A., Tükel, Ç., & Chapman, M. R. (2013). Disease to Dirt: The Biology of Microbial Amyloids. *PLoS Pathogens*, 9(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003740>

- Jameson, K. G., & Hsiao, E. Y. (2018). Linking the gut microbiota to a brain neurotransmitter. *Trends in neurosciences*, *41*(7), 413-414.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.04.001>
- Janelins, M. C., Mastrangelo, M. A., Oddo, S., LaFerla, F. M., Federoff, H. J., & Bowers, W. J. (2005). Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroinflammation*, *2*, 23. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-23>
- Jiang, C., Li, G., Huang, P., Liu, Z., & Zhao, B. (2017). The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *58*(1), 1-15.
<https://doi.org/10.3233/JAD-161141>
- Kanemaru, K., Kubota, J., Sekiya, H., Hirose, K., Okubo, Y., & Iino, M. (2013). Calcium-dependent N-cadherin up-regulation mediates reactive astrogliosis and neuroprotection after brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(28), 11612-11617. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300378110>
- Kinross, J. M., Darzi, A. W., & Nicholson, J. K. (2011). Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome Medicine*, *3*(3), 14.
<https://doi.org/10.1186/gm228>
- Kulijewicz-Nawrot, M., Verkhratsky, A., Chvátal, A., Syková, E., & Rodríguez, J. J. (2012). Astrocytic cytoskeletal atrophy in the medial prefrontal cortex of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Anatomy*, *221*(3), 252-262. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2012.01536.x>

- LaFerla, F. M., & Green, K. N. (2012). Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006320>
- Lange, K., Buerger, M., Stallmach, A., & Bruns, T. (2016). Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. *Digestive Diseases*, 34(3), 260-268.
<https://doi.org/10.1159/000443360>
- Leuner, B., & Gould, E. (2010). Structural Plasticity and Hippocampal Function. *Annual review of psychology*, 61, 111-C3.
<https://doi.org/10.1146/annurev.psych.093008.100359>
- Lin, L., Zheng, L. J., & Zhang, L. J. (2018). Neuroinflammation, Gut Microbiome, and Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 55(11), 8243-8250.
<https://doi.org/10.1007/s12035-018-0983-2>
- Luczynski, P., McVey Neufeld, K.-A., Oriach, C. S., Clarke, G., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). Growing up in a Bubble: Using Germ-Free Animals to Assess the Influence of the Gut Microbiota on Brain and Behavior. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 19(8).
<https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw020>
- Luczynski, P., Whelan, S. O., O'Sullivan, C., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). Adult microbiota-deficient mice have distinct dendritic morphological changes: Differential effects in the amygdala and hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 44(9), 2654-2666.
<https://doi.org/10.1111/ejn.13291>
- Lukiw, W. J. (2016). Bacteroides fragilis Lipopolysaccharide and Inflammatory Signaling in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Microbiology*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01544>

- Majumder, S., Richardson, A., Strong, R., & Oddo, S. (2011). Inducing Autophagy by Rapamycin Before, but Not After, the Formation of Plaques and Tangles Ameliorates Cognitive Deficits. *PLoS ONE*, *6*(9).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025416>
- Maresova, P., Klimova, B., Novotny, M., & Kuca, K. (2016). Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Expected Economic Impact on Europe-A Call for a Uniform European Strategy. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *54*(3), 1123-1133. <https://doi.org/10.3233/JAD-160484>
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimarães, V., Sokol, H., Doré, J., Corthier, G., & Furet, J.-P. (2009). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology*, *9*, 123.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-123>
- Matias, I., Morgado, J., & Gomes, F. C. A. (2019). Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *11*.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00059>
- Mayeux, R., & Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(8).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006239>
- Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O., & Kasper, D. L. (2005). An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell*, *122*(1), 107-118.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.007>
- 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>
- Mucke, L., & Selkoe, D. J. (2012). Neurotoxicity of Amyloid β -Protein: Synaptic and Network Dysfunction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006338>
- Nag, S. (2011). Morphology and Properties of Astrocytes. En S. Nag (Ed.), *The Blood-Brain and Other Neural Barriers: Reviews and Protocols* (pp. 69-100). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-938-3_3
- Nazem, A., Sankowski, R., Bacher, M., & Al-Abed, Y. (2015). Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 12. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0291-y>
- Oboudiyat, C., Glazer, H., Seifan, A., Greer, C., & Isaacson, R. S. (2013). Alzheimer's disease. *Seminars in Neurology*, 33(4), 313-329.
<https://doi.org/10.1055/s-0033-1359319>
- Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D. W., Ditrio, L. E., Burroughs, A. R., Foureau, D. M., Haque-Begum, S., & Kasper, L. H. (2009). Role of Gut Commensal Microflora in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 183(10), 6041-6050.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900747>
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B. P., & LaFerla, F. M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(8), 1063-1070.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.08.012>

- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & LaFerla, F. M. (2003). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A β and Synaptic Dysfunction. *Neuron*, *39*(3), 409-421. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
- Ogata, K., & Kosaka, T. (2002). Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience*, *113*(1), 221-233. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00041-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00041-6)
- O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, *7*(7), 688-693. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>
- Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhratsky, A., & Rodríguez, J. J. (2010). Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia*, *58*(7), 831-838. <https://doi.org/10.1002/glia.20967>
- Osadchiy, V., Martin, C. R., & Mayer, E. A. (2019). The Gut-Brain Axis and the Microbiome: Mechanisms and Clinical Implications. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, *17*(2), 322-332. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.10.002>
- Overk, C. R., Perez, S. E., Ma, C., Taves, M. D., Soma, K. K., & Mufson, E. J. (2013). Sex steroid levels and AD-like pathology in 3xTgAD mice. *Journal of neuroendocrinology*, *25*(2), 131-144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2012.02374.x>
- Peled, J. U., Gomes, A. L. C., Devlin, S. M., Littmann, E. R., Taur, Y., Sung, A. D., Weber, D., Hashimoto, D., Slingerland, A. E., Slingerland, J. B., Maloy, M.,

- Clurman, A. G., Stein-Thoeringer, C. K., Markey, K. A., Docampo, M. D., Burgos da Silva, M., Khan, N., Gessner, A., Messina, J. A., ... van den Brink, M. R. M. (2020). Microbiota as Predictor of Mortality in Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*, *382*(9), 822-834. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1900623>
- Pestana, F., Edwards-Faret, G., Belgard, T. G., Martirosyan, A., & Holt, M. G. (2020). No Longer Underappreciated: The Emerging Concept of Astrocyte Heterogeneity in Neuroscience. *Brain Sciences*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/brainsci10030168>
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, *362*(4), 329-344. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142>
- Quigley, E. M. M. (2017). Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, *17*(12), 94. <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0802-6>
- Ransohoff, R. M. (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*, *353*(6301), 777-783. <https://doi.org/10.1126/science.aag2590>
- Reikvam, D. H., Erofeev, A., Sandvik, A., Grcic, V., Jahnsen, F. L., Gaustad, P., McCoy, K. D., Macpherson, A. J., Meza-Zepeda, L. A., & Johansen, F.-E. (2011). Depletion of Murine Intestinal Microbiota: Effects on Gut Mucosa and Epithelial Gene Expression. *PLOS ONE*, *6*(3), e17996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017996>
- Rhee, S. H., Pothoulakis, C., & Mayer, E. A. (2009). Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nature reviews*.

Gastroenterology & hepatology, 6(5).

<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2009.35>

Rodrigues, R. R., Greer, R. L., Dong, X., DSouza, K. N., Gurung, M., Wu, J. Y., Morgun, A., & Shulzhenko, N. (2017). Antibiotic-Induced Alterations in Gut Microbiota Are Associated with Changes in Glucose Metabolism in Healthy Mice. *Frontiers in Microbiology*, 8.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02306>

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>

Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the Hippocampal Formation. *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*, 34, 6-17.

<https://doi.org/10.1159/000360925>

Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., & Finlay, B. B. (2010). Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 90(3), 859-904.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>

Sgritta, M., Dooling, S. W., Buffington, S. A., Momin, E. N., Francis, M. B., Britton, R. A., & Costa-Mattioli, M. (2019). Mechanisms underlying microbial-mediated changes in social behavior in mouse models of Autism Spectrum Disorder. *Neuron*, 101(2), 246.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.018>

- Shi, N., Li, N., Duan, X., & Niu, H. (2017). Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Military Medical Research*, 4. <https://doi.org/10.1186/s40779-017-0122-9>
- Silva, Y. P., Bernardi, A., & Frozza, R. L. (2020). The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>
- Sterniczuk, R., Antle, M. C., LaFerla, F. M., & Dyck, R. H. (2010). Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 2. Behavioral and cognitive changes. *Brain Research*, 1348, 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.06.011>
- Stover, K. R., Campbell, M. A., Van Winssen, C. M., & Brown, R. E. (2015). Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 289, 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.012>
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116-129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Sun, Y., Jin, S., Lin, X., Chen, L., Qiao, X., Jiang, L., Zhou, P., Johnston, K. G., Golshani, P., Nie, Q., Holmes, T. C., Nitz, D. A., & Xu, X. (2019). CA1-Projecting Subiculum Neurons Facilitate Object-Place Learning. *Nature neuroscience*, 22(11), 1857-1870. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0496-y>
- Swerdlow, R. H. (s. f.). Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 62(3), 1403-1416. <https://doi.org/10.3233/JAD-170585>

- Syeda, T., Sanchez-Tapia, M., Pinedo-Vargas, L., Granados, O., Cuervo-Zanatta, D., Rojas-Santiago, E., Díaz-Cintra, S., Torres, N., & Perez-Cruz, C. (2018). Bioactive Food Abates Metabolic and Synaptic Alterations by Modulation of Gut Microbiota in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *4*, 1657-1682. <https://doi.org/10.3233/JAD-180556>
- van de Pol, L. A., Hensel, A., Barkhof, F., Gertz, H. J., Scheltens, P., & van der Flier, W. M. (2006). Hippocampal atrophy in Alzheimer disease: Age matters. *Neurology*, *66*(2), 236-238. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000194240.47892.4d>
- Venturini, A., Passalacqua, M., Pelassa, S., Pastorino, F., Tedesco, M., Cortese, K., Gagliani, M. C., Leo, G., Maura, G., Guidolin, D., Agnati, L. F., Marcoli, M., & Cervetto, C. (2019). Exosomes From Astrocyte Processes: Signaling to Neurons. *Frontiers in Pharmacology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01452>
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiological Reviews*, *98*(1), 239-389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
- Verkhatsky, A., Rodrigues, J. J., Pivoriunas, A., Zorec, R., & Semyanov, A. (2019). Astroglial atrophy in Alzheimer's disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *471*(10), 1247-1261. <https://doi.org/10.1007/s00424-019-02310-2>
- Vicente, D., & Pérez-Trallero, E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidás y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *28*(2), 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.10.002>

- Vuong, H. E., & Hsiao, E. Y. (2017). Emerging Roles for the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder. *Biological Psychiatry, 81*(5), 411-423.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.08.024>
- Vuong, H. E., & Hsiao, E. Y. (2019). Gut Microbes Join the Social Network. *Neuron, 101*(2), 196-198. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.12.035>
- Walsh, D. M., Tseng, B. P., Rydel, R. E., Podlisny, M. B., & Selkoe, D. J. (2000). The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry, 39*(35), 10831-10839.
<https://doi.org/10.1021/bi001048s>
- Wang, D. D., & Bordey, A. (2008). The astrocyte odyssey. *Progress in Neurobiology, 86*(4), 342-367.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.09.015>
- Yarandi, S. S., Peterson, D. A., Treisman, G. J., Moran, T. H., & Pasricha, P. J. (2016). Modulatory Effects of Gut Microbiota on the Central Nervous System: How Gut Could Play a Role in Neuropsychiatric Health and Diseases. *Journal of Neurogastroenterology and Motility, 22*(2), 201-212.
<https://doi.org/10.5056/jnm15146>
- Yeh, C.-Y., Vadhvana, B., Verkhatsky, A., & Rodríguez, J. J. (2011). Early astrocytic atrophy in the entorhinal cortex of a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *ASN NEURO, 3*(5).
<https://doi.org/10.1042/AN20110025>
- Young, K., & Morrison, H. (2018). Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ. *Journal of Visualized Experiments: JoVE, 136*.
<https://doi.org/10.3791/57648>

Zhang, L., Wang, Y., Xiayu, X., Shi, C., Chen, W., Song, N., Fu, X., Zhou, R., Xu, Y.-F., Huang, L., Zhu, H., Han, Y., & Qin, C. (2017). Altered Gut Microbiota in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 60(4), 1241-1257. <https://doi.org/10.3233/JAD-170020>

12. Anexos (Standard Operating Procedures)

 <p>INSTITUTO DE NEUROBIOLÓGIA</p>	Standard Operating Procedure	Procedure No.	03
---	---	------------------	----

Title: Antibiotics cocktail preparation		Version: Issue date:	1 05.26.2 1
Prepared by: Carlos Ledesma Alonso	Approved by: Dra. Sofía Y. Díaz Miranda		Approved date:

1. Objective

1.1 Dissolve the tablets of the different antibiotics using a mortar with a pistil for later consumption in water.

2. Scope

2.1 This procedure applies to all students and personnel working at Sofia Diaz's Lab, in the Neurobiology Institute at UNAM.

3. Responsibilities

3.1 It is responsibility of the students the use of all laboratory material (mortar, pistil, liter container and gloves).

4. Materials

- 4.1 1 gr ampicillin tablet
- 4.2 1 gr neomycin tablet
- 4.3 1 gr metronidazole tablet
- 4.4 0.5 gr vancomycin injectable
- 4.5 Mortar with pistil
- 4.6 Glass container 1L
- 4.7 3 ml syringe

5. Equipment

- 5.1 Lab coat
- 5.2 Gloves

6. Procedure


6.1 All the tablets are placed in the mortar and crushed into a powder so that it is easy to dissolve them in water.

6.2 Once they are powdered, dilute them in 950 ml of drinking water

6.3 Finally, for vancomycin, prepare it according to the recipe that comes in the drug box and dilute it in 50 milliliters of distilled water.

6.4 Add the 50 milliliters with vancomycin to the container with the other antibiotics and shake vigorously

7. Support material

	Standard Operating Procedure	Procedure No.	03
Title: Antibiotics cocktail preparation		Version: Issue date:	1 05.26.2 1

Prepared by: Carlos Ledesma Alonso	Approved by: Dra. Sofía Y. Díaz Miranda	Approved date:
--	---	----------------




Figure 1. Tablets, injectable solution, and material to prepare a liter of antibiotic cocktail



Figure 2. Plastic cages with 50 milliliter conical tubes adapted to measure water consumption

8. Bibliography

- Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D. W., Ditrio, L. E., Burroughs, A. R., Foureau, D. M., Haque-Begum, S., & Kasper, L. H. (2009). Role of Gut Commensal Microflora in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 183(10), 6041-6050. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900747>

	Standard Operating Procedure	Procedure No.	04
Title: Mice Euthanasia, intracardiac perfusion and fixation		Version: Issue date:	1 05.26.21
Prepared by: Carlos Ledesma Alonso	Approved by: Dra. Sofía Y. Díaz Miranda		Approved date:

1. Objective

1.1 To apply an appropriate euthanasia and intracardiac perfusion, fixation, and brain dissection to adult mice.

2. Scope

2.1 This procedure applies to all students and personnel working at Sofia Diaz's Lab, in the Neurobiology Institute at UNAM.

3. Responsibilities


3.1 It is responsibility of the students the use of basic safety laboratory equipment (coat, facemask, safety goggles and gloves).

4. Materials

- 4.10.2 M PB
- 4.20.1 M PB (pH 7.4)
- 4.2 Paraformaldehyde (*Sigma Aldrich*®)
- 4.3 Sodium pentobarbital (*Pisabental, PiSA*®)
- 4.4 Crushed ice
- 4.5 NaOH pearls (*Sigma Aldrich*®)
- 4.6 Sucrose (*Sigma Aldrich*®)

5. Equipment

- 5.1 Blunt tip scissors
- 5.2 Blunt tweezers
- 5.3 Lab coat
- 5.4 Gloves
- 5.5 Facemask
- 5.6 Security goggles
- 5.7 Perfusion pump
- 5.8 Surgical scissors
- 5.9 Distilled water
- 5.10 Micropipettes (*Eppendorf*™)
- 5.11 Micropipette tips


	Standard Operating Procedure	Procedure No.	04
Title: Mice Euthanasia, intracardiac perfusion and fixation		Version: Issue date:	1 05.26.21
Prepared by: Carlos Ledesma Alonso	Approved by: Dra. Sofía Y. Díaz Miranda		Approved date:

- 5.12 1.5 plastic microtubes
- 5.13 Mosquito surgical forceps
- 5.14 15 mL conic plastic tubes
- 5.15 Magnetic stirrer hot plate
- 5.16 Bascule
- 5.17 Pyrex glass material
- 5.18 Thermometer
- 5.19 pH meter
- 5.20 metal grid
- 5.21 plastic rectangular container
- 5.22 laboratory fume hood
- 5.23 insulin syringes

6. Procedure

- 6.1 Preparation of 4% paraformaldehyde solution: weigh 40 g of paraformaldehyde and dissolved in 500 mL of 0.2 M PB heated at 65 °C (measure with a thermometer) and in constant agitation, contained in a 1000 mL Pyrex beaker using a magnetic stirrer hot plate. If a milky appearance of the solution is observed, add one to two NaOH pearls to obtain a total translucent solution. Let cool the solution and measure a 7.4 pH using a pH meter. Set a final volume of 1000 mL with distilled water.
- 6.2 Into a laboratory fume hood set the metal grid over the plastic container to receive blood and solutions from perfusion, set all the surgical material and set the perfusion pump to an adequate pumping velocity and connect all the plastic hoses and make sure the solutions (0.1 M PB and 4% PFA) have no bubbles through the hose.
- 6.3 To a proper mice euthanasia in a separated room from maintenance room and perfusion room anesthetic administration is going to be performed. For every 10 g weight, 30 µL of pentobarbital is going to be intraperitoneally injected. An adequate handling of the mouse is necessary to avoid injuries or distress. Approximately, between 2 or 3 min the mouse in total state of surgical analgesia, it is necessary to

make sure the animal that the animal no longer perceived pain (in., needle prick in the tail mastic).

	Standard Operating Procedure	Procedure No.	04
Title: Mice Euthanasia, intracardiac perfusion and fixation		Version: Issue date:	1 05.26.21
Prepared by: Carlos Ledesma Alonso	Approved by: Dra. Sofía Y. Díaz Miranda		Approved date:


6.4 An incision will be made in the abdominal midline; the xiphoid process is going to be located and cut along the margin of the diaphragm to expose the cardiovascular system. Once the heart is located, a cut will be made in the right atrium causing hypovolemia due to hemorrhage, and immediately 25 ml of 0.1 M PB will be injected into the apex of the heart to penetrate the ventricle. Immediately, another 25 mL of 4% paraformaldehyde is going to be administered to fix the tissue.

6.5 Once the mouse is perfused, the head will be cut off at the level of the axis or the atlas and the skull will be exposed. The bones of the skull whose fissure is the interhemispheric are separated and the brain will be extracted and then left immersed in 4% PFA for 24 hours at 4 ° C and later the tissue was changed to a 0.1 M PB solution with 30% sucrose in a conical tube of 15 ml. It will be re-stored for approximately 24 h at 4 °C until the brain precipitates and is ready for freezing.

6.6 Then all the brains, after all the procedure, are ready to cut them with a cryostat.

7. Bibliography

- NORMA Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres.
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5405210&fecha=26/08/2015
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
<http://publico.senasica.gob.mx/?doc=743>

	Standard Operating Procedure	Procedure No.	01
Title: Mouse feces collection for gut microbiota analysis		Version: Issue date:	1 05.26.21
Prepared by: Carlos Ledesma Alonso	Approved by: Dra. Sofía Y. Díaz Miranda		Approved date:

1. Objective

1.1 To collect feces from mice with the aim of obtaining microbial DNA for microbiota analysis by DNA 16S sequence.

2. Scope

2.1 This procedure applies to all students and personnel working at Sofia Díaz's Lab, in the Neurobiology Institute at UNAM.

3. Responsibilities

3.1 It is the responsibility of the students to use basic safety laboratory equipment (coat, facemask, and gloves). To access the Lab Vivarium, it is necessary to sanitize with 70% alcohol each material, including gloves and equipment before introducing them into the facility.

4. Materials


- 4.1 RNase free 1.5 mL plastic microtubes
- 4.2 70% alcohol
- 4.3 Permanent markers
- 4.4 Dry ice

5. Equipment

- 5.1 Cooler
- 5.2 Freezer operating (-70 °C)
- 5.3 Lab coat
- 5.4 Gloves
- 5.5 Facemask

6. Procedure

- 6.1 This procedure should be performed by trained students with good handling of rodents.
- 6.2 Plastic microtubes should be maintained clean.
- 6.3 Cooler and permanent markers should be sanitized with alcohol before introducing them into the vivarium.
- 6.4 To collect fresh feces, trained students should hold the mouse in one hand during which the mouse can defecate directly in a 1.5 microtube held in the other hand. Approximately, 3 to 6 fresh fecal pellets should be collected.

	Standard Operating Procedure	Procedure No.	01
Title: Mouse feces collection for gut microbiota analysis		Version: Issue date:	1 05.26.21
Prepared by: Carlos Ledesma Alonso	Approved by: Dra. Sofía Y. Díaz Miranda		Approved date:

- 6.5 Sometimes, the collection should be performed during several days in order to collect the necessary number of feces.
- 6.6 Immediately after labeling procedure, microtubes should be kept in dry ice until their transfer to a -70 °C freezer (Revco™) where the samples can be maintained until their DNA microbiota profile analysis.
- 6.7 If the samples require to transfer to another facility for their processing, they should be maintained in dry ice during transportation.

7. Support material



Figure 1.
storage cage


Microtubes of feces and

8. Bibliography

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.



UNAM

	Standard Operating Procedure	Procedure No.	05
Title: Immunohistochemistry for protoplasmic astrocytes by GFAP marker		Version: Issue date:	1 05.26.21
Prepared by: Carlos Ledesma Alonso	Approved by: Dra. Sofía Y. Díaz Miranda		Approved date:

1. Objective

1.1 To identify astrocyte cells in coronal sections of mouse brain tissue.

2. Scope

2.1 This procedure applies to all students and personnel working at Sofia Diaz's Lab, in the Neurobiology Institute at UNAM.

3. Responsibilities

3.1 It is responsibility of the students the use of basic safety laboratory equipment (coat, facemask, safety eyeglasses and gloves).

4. Materials

4.1 PB 0.1 M

4.2 Sodium azide 0.02%

4.3 Tissuetek[®]

4.4 Hydrogen peroxide 30%

4.5 Absolut Methanol

4.6 Horse serum

4.7 Monoclonal Anti-Glial Fibrillar Acidic Protein antibody, anti-mouse, G3893, Sigma Aldrich[®]

4.8 triton X-100

4.9 Tween 20

4.10 Horse anti-mouse IgG BA-2001, Vector[®]

4.11 avidin/biotin (VECTASTAIN[®] ABC Kits)

4.12 diaminobenzidine

4.13 Ammonium sulfate


4.14 Sodium acetate

4.15 Ammonium chloride

4.16 D-Glucose

5. Equipment

5.1 Cryostat

	Standard Operating Procedure	Procedure No.	05
Title: Immunohistochemistry for protoplasmic astrocytes by GFAP marker		Version: Issue date:	1 05.26.21
Prepared by: Carlos Ledesma Alonso	Approved by: Dra. Sofía Y. Díaz Miranda		Approved date:

- 5.2 Refrigerator (4 °C)
- 5.3 Lab coat
- 5.4 Gloves
- 5.5 Facemask
- 5.6 24 well plates
- 5.7 Orbital shaker
- 5.8 Micropipettes
- 5.9 Micropipette tips
- 5.10 Plastic microtubes 1.5 ml

6. Procedure

- 6.1 Dissected mouse brain should be mounted on a cryostat disc plate union the necessary amount of tissuetek[®] and let freeze at -20 °C at least 30 min before starting to slice the tissue.
- 6.2 Each 40 µm coronal brain sections should be kept in a 24 well plate with 0.02 % sodium azide in 0.1 M PB solution and maintained at 4 C until use.
- 6.3 For immunohistochemistry procedure selected tissue sections must be washed in a 24 well plate 3 times with 0.1M PB, in agitation for 10 min each at room temperature (NOTE: for a 24 well plate, in each well fits a maximum of 3 tissue sections, using a volume between 400 to 600 µL).
- 6.4 To inactivate endogenous peroxidase an incubation with a 10 % Hydrogen peroxide and 10 % methanol in PB solution, for 30 min must be done.
- 6.5 Then 3 washes in agitation for 10 min each at room temperature.
- 6.6 Incubation for 30 min at room temperature with blocking solution, containing: 2 % of horse serum, 50 mM of glycine, 1% triton X-100, 1% tween 20, all in 0.1 M PB.
- 6.7 Immediately, primary antibody incubation, for 24 h at 4 °C, in orbital agitation, using a solution containing: 1:1000 of monoclonal Anti-Glial

Fibrillar Acidic Protein antibody, anti-mouse, G3893, Sigma Aldrich ® in 0.1 M PB with 2 % horse serum, 5 mM glycine, 1 % triton X-100 and 1% tween 20.

6.8 Then 3 washes in agitation for 10 min each at room temperature.

	Standard Operating Procedure	Procedure No.	05
Title: Immunohistochemistry for protoplasmic astrocytes by GFAP marker		Version: Issue date:	1 05.26.21
Prepared by: Carlos Ledesma Alonso	Approved by: Dra. Sofía Y. Díaz Miranda		Approved date:

6.9 Later, secondary antibody incubation, for 1 h at room temperature, in orbital agitation, using a solution containing: 1: 500 Horse Anti-Mouse IgG Antibody, rat adsorbed (H+L), Biotinylated BA-2001, Vector ® in 0.1 M PB.

6.10 Then 3 washes with 0.1 M PB in agitation for 10 min each at room temperature.

6.11 Incubation with 50 µL of avidin/biotin (VECTASTAIN® ABC Kits) in 0.1 M PB for 15 min at room temperature and then one wash with 0.1 M PB for 10 min.

6.12 Glucose oxidase as label for the immune staining method will be performed using a solution containing: 4.7 mM diaminobenzidine, 95 mM nickel ammonium sulfate dissolved in 0.2 M sodium acetate pH 6, 15 mM ammonium chloride, 22.2 D-Glucose mM and 1 U of Glucose oxidase. 20 µL of this solution will be added for every 500 µL of PB per well.

6.13 The reaction will be stopped with 0.1 M sodium acetate pH 6.

6.14 Finally, 3 washes with 0.1 PB in agitation for 10 min each at room temperature.

6.15 Brain tissue sections will be mounted on a slide and add the rapid mounting medium Entellan ® and then the coverslip.

7. Support material

7.1 <https://vectorlabs.com/browse/abc-avidin-biotin-complex-kits>


7.2 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2426225/>

7.3 <https://vectorlabs.com/unconjugated-horse-anti-mouse-igg-antibody.html>

7.4 https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/monoclonalantiglialfibrillaryacidicproteingfapcy3antibodyproducedinmouse1234598765?lang=es®ion=MX&gclid=CjwKCAjw47eFBhA9EiwAy8kzNBDPZSLMHiiIcQ52q1CZ2B5FI4jWFB4fAK2LDA640BcT5ml_dHHZnBoC5pIQAvD_BwE

8. Bibliography

- Syeda T, Sanchez-Tapia M, Pinedo-Vargas L, Granados O, Cuervo-Zanatta D, Rojas-Santiago E, Díaz-Cintra SA, Torres N, Perez-Cruz C. Bioactive Food Abates Metabolic and Synaptic Alterations by Modulation of Gut Microbiota in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2018;66(4):1657-1682. doi: 10.3233/JAD-180556. PMID: 30475761.

	Standard Operating Procedure	Procedure No.	06
Morphometric analysis of astrocytes by skeleton methodology		Version: Issue date:	1 05.26.21
Prepared by: Carlos Ledesma Alonso	Approved by: Dra. Sofía Y. Díaz Miranda		Approved date:

1. Objective

1.1 To quantify different parameters of the general morphology (number, branches, and intersections) of hippocampal astrocytes

2. Scope

2.1 This procedure applies to all students that are working at Sofia Diaz's Lab, in the Neurobiology Institute, UNAM.

3. Responsibilities

3.1 It is responsibility of the students the correct use of computer equipment.

4. Materials

4.1 Immunohistochemistry of astrocytes with GFAP marker (*monoclonal Anti-Glial Fibrillar Acidic Protein antibody, anti-mouse, G3893, Sigma Aldrich*®)

4.2 Optic Microscope (*Nikon*®, Model Eclipse Ci-L, Japan)


5. Equipment

5.1 Computer with the software Fiji ImageJ® and the correspond plug-in (skeletonize 2D/3D)

6. Procedure

- 6.1 For the morphometry of the astroglia, 4 coronal sections of 40 μ thickness should be taken per individual (n = 4), every 3 serial sections.
- 6.2 The area to analyze are the dorsal hippocampus from bregma - 2.06mm to -2.70mm¹
- 6.3 Photomicrographs are taken with the NIS-Elements software (Nikon Instruments ®) of the GFAP enzyme immunohistochemistry with an optical microscope at 20x and 40x of the CA1 of the hippocampus.
- 6.4 The field to analyze is the *stratum radiatum* of CA1
- 6.5 There were several commands to follow to analyze the binary images
- 6.6 The threshold is adjusted according to the contrast since some immunohistochemicals showed a greater precipitate in the background
- 6.7 The images are converted into binary format represented with the white background and the signal in black and the command "analyze particles" is selected to discard noise signals from the image

As inclusion criteria, cells that: had a defined soma, did not touch the edges, had a space domain, and are greater than 700 pixels (~ 140 μ m in area) is considered.

	<h3>Standard Operating Procedure</h3>	Procedure No.	06
Morphometric analysis of astrocytes by skeleton methodology		Version: Issue date:	1 05.26.21
Prepared by: Carlos Ledesma Alonso	Approved by: Dra. Sofía Y. Díaz Miranda		Approved date:

- 6.8 Once these criteria are applied, the image is processed with the "skeletonize" tool and then inverted. Subsequently, the plug-in: 2D / 3D skeleton is selected to process said image and thus obtain the structure of the cell skeleton

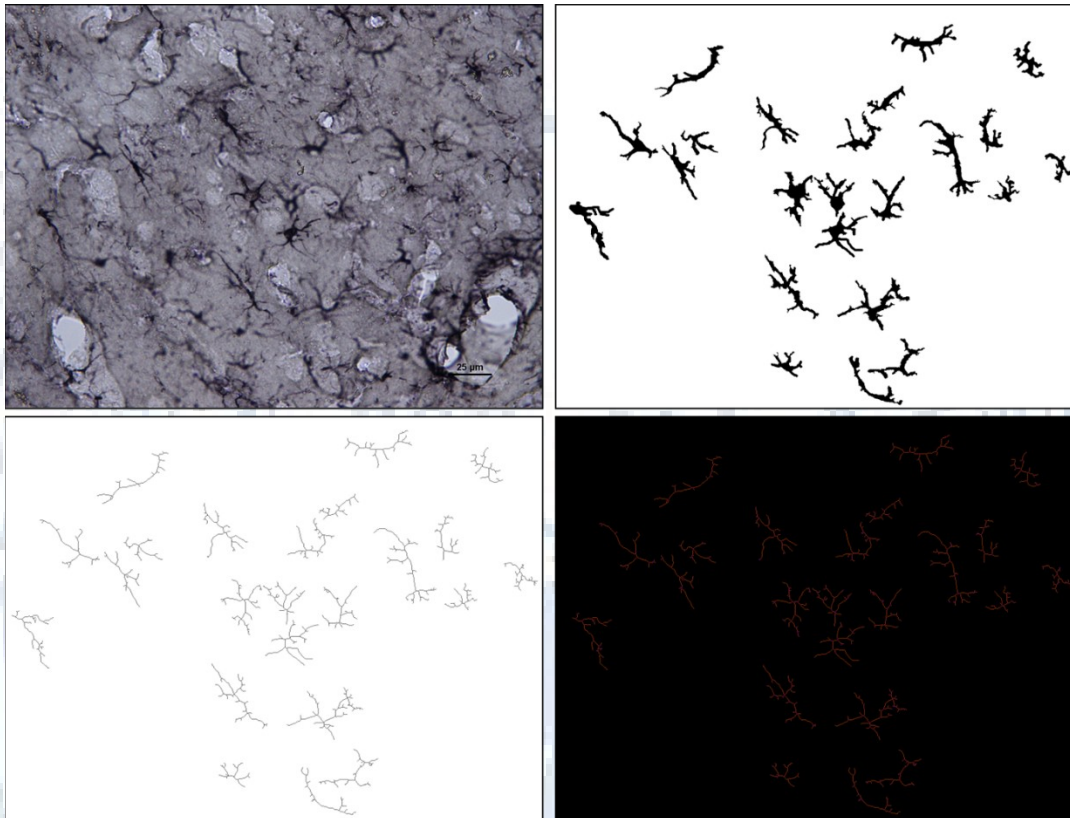




Figure 1. Images representing the morphometric analysis of hippocampal astrocytes by the skeleton method using the Fiji ImageJ® software. Panel A is the unanalyzed 40x photomicrograph. Panel B is the image transformed in binary format with the function of “analyze particles” to make it clean. Panel C is the binary image transformed with the skeletonize tool and panel D shows the figure that is analyzed using the plug-in: skeleton 2D / 3D.

	Standard Operating Procedure	Procedure No.	06
Morphometric analysis of astrocytes by skeleton methodology		Version: Issue date:	1 05.26.21
Prepared by: Carlos Ledesma Alonso	Approved by: Dra. Sofía Y. Díaz Miranda		Approved date:

7. Bibliography

1. The Mouse Brain in stereotaxic coordinates, G. Paxinos & K. Franklin, 2nd Edition, 2001
2. Morrison, H., Young, K., Qureshi, M. et al. Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury. Sci Rep 7, 13211 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13581-z>



	Standard Operating Procedure	Procedure No.	02
Title:	Morris Water Maze	Version: Issue date:	1 05.26.21
Prepared by: Carlos Ledesma Alonso	Approved by: Dra. Sofía Y. Díaz Miranda		Approved date:

1. Objective

1.1 To assess performance of hippocampal-dependent behavioral task (learning and spatial memory)

2. Scope

2.1 This procedure applies to all students that are working at Sofia Diaz's Lab (C0-2 Morphometry and neurodevelopment), in the Neurobiology Institute at UNAM.

3. Responsibilities

3.1 It is responsibility of the students the correct use of the behavioral task room and materials used.

4. Materials

4.1 One hundred centimeters tank filled with water with a depth of 17.5 centimeters

4.2 An acrylic platform

4.3 Labyrinthine signs (figures in the walls)

4.4 Stopwatch

4.5 Acrylic box (20x20x10) with a red spotlight

4.6 Mice

5. Equipment

5.1 Facemask

5.2 Lab coat

5.3 Gloves


6. Procedure

6.1 All mice are handled with a clean, dry towel 3 days prior to the behavioral task, approximately 3-5 min per mouse.

6.2 Before the first test on the first day, all mice are placed on the acrylic platform for 20 s

6.3 In each trial, each mouse is randomly released in one of the quadrants, if 60 s pass and they don't find the platform, they are guided manually and left on the platform for 20 s (only in the first trial of the first session)

6.4 They are subsequently removed from the tank and left in a warm box (red light) for 20 s after each test.

	Standard Operating Procedure	Procedure No.	02
Title:	Morris Water Maze	Version: Issue date:	1 05.26.21
Prepared by: Carlos Ledesma Alonso	Approved by: Dra. Sofía Y. Díaz Miranda	Approved date:	

- 6.5 Four trials are performed per session, in total there are 4 sessions, one per day, therefore, there will be 16 trials in total
- 6.6 Retention of spatial training is assessed 24 h after the last trial
- 6.7 The mice can swim freely for a period of 1 min. without the platform
- 6.8 All mice are monitored by a camera located in such a way that it records from above the water tank and the videos are recorded for later analysis
- 6.9 All videos were analyzed using SMART © software V3.0.05 (specialized software that has a video tracking system which allows detecting and recording the trajectory of the mice inside the tank)
- 6.9.1 The following parameters are considered: time in seconds that they were in the 4 quadrants and number of times they entered said quadrants fig.1.

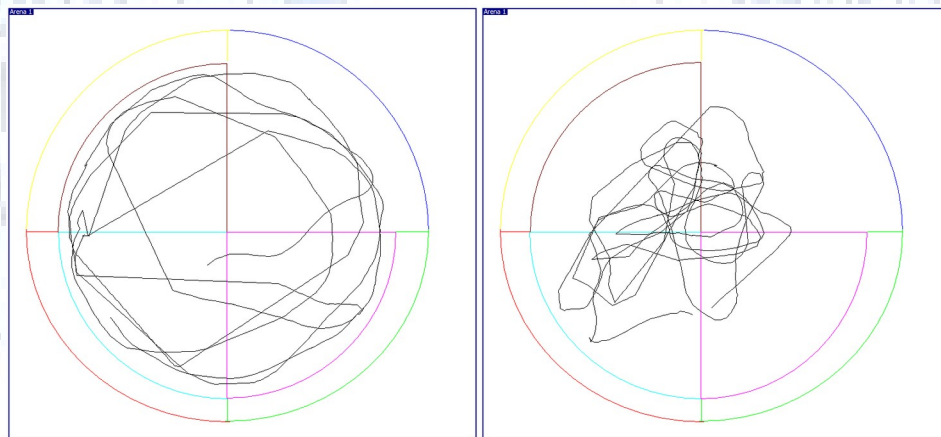


Figure 1. Images of the trajectories drawn by SMART © software V3.0.05 of both experimental groups